



**HAL**  
open science

# Approches de thérapies géniques pour des maladies neuromusculaires

Gilles Moulay

► **To cite this version:**

Gilles Moulay. Approches de thérapies géniques pour des maladies neuromusculaires. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Evry-Val d'Essonne, 2010. Français. NNT: . tel-00507450

**HAL Id: tel-00507450**

**<https://theses.hal.science/tel-00507450v1>**

Submitted on 30 Jul 2010

**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.

ÉCOLE DOCTORALE : *DES GÉNOMES AUX ORGANISMES*  
UNIVERSITÉ D'ÉVRY VAL D'ESSONNE

**THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES**

*Mention biologie cellulaire et moléculaire*

***Approches de thérapies géniques pour des  
maladies neuromusculaires***

présentée par

**Gilles MOULAY**

**Soutenue le 9 Juillet 2010 devant le jury composé de :**

<b>Monsieur le Professeur Francis QUÉTIER</b>	<b>Président</b>
<b>Madame le Docteur Florence APPARAILLY</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Monsieur le Professeur Jean-Christophe PAGÈS</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>Madame le Docteur Sabine de La PORTE</b>	<b>Examineur</b>
<b>Monsieur le Docteur Patrick MIDOUX</b>	<b>Examineur</b>
<b>Monsieur le Docteur Antoine KICHLER</b>	<b>Directeur de thèse</b>

*Numéro national de thèse : 2010EVRY0008*

## Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude au docteur Antoine Kichler qui m'a accueilli dans son laboratoire dès fin 2005 pour mon stage de DEA, puis pour m'avoir offert l'opportunité de poursuivre avec une thèse. Je le remercie pour ses conseils, mais aussi pour le juste équilibre entre la grande autonomie qu'il m'a laissée (y compris lors des résultats décevants), et la modération qu'il prescrivait quand je me dispersais dans mon enthousiasme.

J'adresse également mes remerciements les plus chaleureux aux membres de l'équipe, qui par leur sympathie et leurs conseils ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Je pense à Christian pour sa gentillesse et sa disponibilité, mais aussi aux anciens thésards qui m'ont encadré au sens propre (bureau du milieu) : Xavier et Debborah. Debbo, un grand merci à toi en particulier pour m'avoir fait voir la vie en rose (au sens propre aussi), et n'oublie pas : certains tympanes de phénotype Gilles+/Gilles+ ne tolèrent pas le Jean-Jacques à haute dose sous peine de graves effets adverses sur le système nerveux central.

Je souhaite bon courage à Magdalena, et aux thésards que je laisse derrière moi, en leur souhaitant de vivre une expérience aussi enrichissante que la mienne. Xavier et Simon, merci de m'avoir encadré de tant de finesse, que dis-je, de raffinement (toujours le bureau tampon du milieu).

Je tiens également à remercier Pascal Bigey pour ses plasmides et ses conseils lors de l'initiation du projet TNFR ; un grand merci aussi à Carole pour ses réponses à mes multiples questions, et à Karine qui mieux que personne sait enseigner la prod AAV aux jeunes effrontés.

Merci également à Bérangère, Christine, Samia, Christel, Diana, Sylvie, Philippe, David, Virginie, Ludivine et à l'espiègle Maurice (Fanny) pour leur agréable compagnie à la pause déjeuner.

Merci aux services de Généthon grâce à qui j'ai pu avancer aussi vite et dans la bonne humeur durant cette thèse : Guillaume et Nicolas pour l'évaluation fonctionnelle, Cyril pour l'aide en production d'AAV, Émilie, Christophe Georger, Simon pour les coupes et colorations, et enfin Béatrice, Séverine, Angélique et Laetitia pour leur précieuse aide lors des protocoles de double injection IV.

Je ne saurais oublier ma famille et Steve qui m'ont encouragé sur cette voie et durant la phase difficile qu'est l'écriture de thèse, un grand merci à Sophie pour la relecture du manuscrit.

Enfin, j'adresse ma gratitude aux chercheurs, techniciens, thésards et étudiants de Généthon que j'ai côtoyé ces 4 ans.

# SOMMAIRE

## Partie I - Modification de la biodistribution du vecteur AAV injecté par voie intraveineuse .....1

<b>Introduction</b> .....	1
1. La thérapie génique.....	1
2. Le vecteur AAV.....	2
2.1. Le virus sauvage.....	2
2.2. Caractéristiques et production du vecteur AAV .....	5
2.3. Les différents sérotypes AAV .....	7
2.4. Récepteurs des AAV .....	8
2.5. Mécanismes de transduction du vecteur AAV .....	10
2.6. Le devenir des génomes AAV recombinants dans les cellules.....	11
2.7. Tropisme des différents sérotypes AAV .....	13
3. Voie d'administration et immunogénicité du vecteur AAV .....	15
3.1. Voie d'administration locale .....	15
3.2. Voie d'administration vasculaire.....	16
3.3. Immunogénicité suite à une administration intraveineuse.....	18
4. Stratégies d'amélioration de la transduction du vecteur AAV.....	20
4.1. Facteurs endogènes et exogènes influençant la transduction AAV par voie systémique .....	20
4.2. Modification de la capsid AAV .....	21
4.3. Approches pharmacologiques et adjuvants .....	23
4.4. Transduction à l'échelle du corps entier .....	25
<b>Objectifs</b> .....	29
<b>Résultats</b> .....	30
1. Adjuvants modifiant la biodistribution du vecteur AAV.....	30
1.1. Évaluation <i>in vitro</i> de différents polymères chargés.....	30
1.2. Polymères cationiques .....	32
a) Poly-L-lysine et transduction AAV <i>in vivo</i> .....	32
b) Effet dose de l'adjuvant pK2 sur la transduction systémique de l'AAV2.....	35
c) Influence du degré de polymérisation de la pK .....	36
d) Comparaison de pK2 et pK4 et influence du temps entre l'injection de pK et de vecteur .....	38
e) Influence de la dose de vecteur et du sexe sur l'effet de la pK4 .....	40
f) Augmentation de la transduction musculaire de l'AAV2 avec l'adjuvant pK4 .....	43
g) Effet de la pré-injection de pK sur d'autres sérotypes AAV .....	48
1.3. Polymères anioniques .....	53
a) Acide polyinosinique .....	53
b) Sulfate de dextran .....	57
2. Facteurs sanguins modulateurs de l'infection par l'AAV.....	58
2.1. Facteurs dépendants d'ions métalliques bivalents .....	58
2.2. Le complément.....	60
2.3. Facteurs de coagulation .....	63
3. Facteurs exogènes et procédure d'administration .....	66
3.1. Shunt hépatique.....	66
3.2. Administration de l'AAV par voie sous-cutanée.....	67
3.3. Mise à jeun.....	70
<b>Conclusion et discussion</b> .....	73

## Partie II - Étude dans un modèle dystrophique : utilisation du muscle *mdx* comme producteur de protéine transgénique sécrétée TNFR-Is/mlgG1 .....80

<b>Introduction</b> .....	81
1. La dystrophie musculaire de Duchenne.....	81
1.1. Historique .....	81
1.2. Signes cliniques.....	82
1.3. Traitements .....	84
1.4. La dystrophine.....	85

a) Gène <i>DMD</i> et isoformes de la dystrophine.....	85
b) La dystrophine et ses protéines associées .....	86
1.5. Pathophysiologie des dystrophies musculaires de Duchenne et Becker.....	89
1.6. Modèle murin <i>mdx</i> .....	91
1.7. Stratégies de thérapie génique pour la dystrophie musculaire de Duchenne.....	94
a) Approche correctrice : la dystrophine.....	94
b) Approches palliatives.....	97
2. Thérapie génique du muscle squelettique.....	98
2.1. Immunobiologie du muscle sain ou inflammé.....	98
a) Cellules de l'immunité présentes dans le muscle.....	98
b) Capacités immunes de la cellule musculaire .....	100
2.2. Réponse immune induite lors d'une injection intramusculaire.....	104
a) Réponse immune dirigée contre le vecteur.....	104
b) Réponse immune contre la protéine transgénique .....	106
2.3. Immunobiologie du muscle dystrophique et thérapie génique .....	108
2.4. Le muscle en tant que sécréteur.....	109
2.5. Électrotransfert du muscle.....	110
2.6. Transduction du muscle par l'AAV.....	112
3. Inflammation, TNF et DMD.....	114
3.1. Le facteur de nécrose tumorale.....	114
a) Historique, gène et protéine.....	114
b) Production du TNF.....	115
c) Régulation de la synthèse et de la sécrétion du TNF.....	116
d) Rôle physiologique.....	117
e) Inhibiteurs du TNF .....	119
3.2. Hypothèse de pathophysiologie DMD : signalisation via le DGC.....	121
3.3. Rationnel des stratégies anti-inflammatoires pour DMD.....	123
a) Dérégulation de la signalisation de l'inflammation dans le muscle dystrophique .....	123
b) Traitements anti-inflammatoires actuellement utilisés ou en recherche pré-clinique pour DMD	126
3.4. Récepteur du TNF et dérivés.....	128
a) Les récepteurs du TNF.....	128
b) Inhibiteurs biologiques du TNF dérivés des TNFR.....	130
<b>Objectifs</b> .....	<b>132</b>
<b>Résultats</b> .....	<b>133</b>
1. Transfection du muscle dystrophique pour la sécrétion de chimères du récepteur I du TNF .....	133
1.1. Électrotransfert de plasmides codant la chimère hTNFR-Is/mIgG1 .....	133
a) Étude cinétique chez la souris <i>mdx</i> .....	133
b) Évaluation des anticorps anti-hTNFR-Is.....	135
c) Immunogénicité du squelette plasmidique .....	136
1.2. Vectorisation du hTNFR-Is dans un AAV .....	137
a) Administration intramusculaire .....	137
b) Administration intraveineuse .....	138
1.3. Construction et caractérisation d'une chimère murine.....	139
a) Test de l'activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 .....	139
b) Électrotransfert du plasmide codant le mTNFR-Is/mIgG1 .....	141
c) Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit <i>in vivo</i> et analyse histologique du muscle transfecté.....	144
d) Expression du TNF et du TNFR-Is chez la souris <i>mdx</i> .....	147
1.4. Cinétique de sécrétion et réponse immune contre les TNFR-Is/mIgG1 lors d'une injection d'AAV dans le muscle dystrophique .....	150
a) Expression d'un transgène sécrété non immunogène.....	150
b) Expression des transgènes TNFR-Is/mIgG1 dans le muscle.....	151
c) Cinétique de sécrétion des transgènes TNFR-Is/mIgG1 par le muscle .....	153
d) Caractérisation de la réponse immune contre le hTNFR-Is/mIgG.....	157
e) Dissémination du vecteur AAV6 après une injection intramusculaire.....	160
f) Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit par le vecteur AAV6.....	161
2. Évaluation du potentiel thérapeutique du transfert de gène mTNFR-Is/mIgG1 chez la souris <i>mdx</i> .....	162
2.1. Protocole d'électrotransfert.....	162
a) Protocole .....	162

b) Expression du transgène et du TNF au cours du protocole .....	164
c) Évaluation fonctionnelle .....	168
d) Évaluation de l'atteinte membranaire et histologie du muscle dystrophique .....	170
2.2. Protocole utilisant l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 .....	174
a) Pic de nécrose de la souris <i>mdx</i> .....	174
b) Traitement AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 précédant le pic de nécrose de la souris <i>mdx</i> .....	176
<b>Conclusion et discussion</b> .....	<b>179</b>
<b>Partie III - Matériels et méthodes</b> .....	<b>187</b>
1. Biologie moléculaire.....	187
1.1. Plasmides et clonages .....	187
1.2. Quantification de génomes viraux dans les organes par PCR en temps réel .....	188
2. Production et purification des vecteurs AAV .....	189
2.1. Production des vecteurs .....	189
2.2. Purification des vecteurs AAV.....	190
2.3. Titrage de la production de vecteur AAV .....	192
3. Expérimentation animale.....	193
3.1. Souris.....	193
3.2. Anesthésie.....	193
3.3. Injections.....	193
3.4. Aduvant et produits injectés .....	194
3.5. Electrotransfert <i>in vivo</i> .....	196
3.6. Shunt hépatique.....	196
3.7. Mise à jeûn.....	197
3.8. Sacrifices et prélèvements.....	198
a) Prélèvement de sang .....	198
b) Prélèvement et préparation des organes.....	198
3.9. Évaluation fonctionnelle.....	198
a) Étude <i>in vivo</i> .....	198
b) Étude <i>in vitro</i> .....	200
4. Dosages et mesure d'activité biologique.....	204
4.1. Dosage de la mSeAP .....	204
4.2. Titration des anticorps neutralisant le vecteur AAV.....	204
4.3. Dosage de l'activité luciférase.....	205
4.4. Mesure d'activité du complément .....	205
4.5. Mesure du temps de coagulation .....	206
4.6. Production de milieux conditionnés h et mTNFR-Is/mIgG1 par transfection .....	207
4.7. Dosage par ELISA du hTNFR-Is, mTNFR-Is et mTNF.....	207
4.8. Évaluation de l'activité biologique de la protéine TNFR-Is/mIgG1 .....	208
4.9. Analyse d'IgG par ELISA.....	208
4.10. Dosage de la créatine kinase plasmatique .....	209
5. Histologie .....	210
5.1. Préparation des échantillons.....	210
5.2. Coloration HPS .....	210
5.3. Marquages histo-enzymatiques .....	211
a) Révélation de la mSeAP.....	211
b) Révélation de la $\beta$ -galactosidase.....	211
5.4. Immunomarquages .....	212
a) TNFR-Is et CD8 .....	212
b) Myosine lente.....	212
5.5. Observation du bleu Evans.....	213
6. Acquisition et analyse d'images de microscopie .....	213
a) Acquisition.....	213
b) Analyses morphométriques .....	214
7. Statistiques .....	214
<b>Partie IV - Bibliographie</b> .....	<b>187</b>
<i>Publications / Communications scientifiques</i>	

## ABRÉVIATIONS

<b>Aa</b>	Acide aminé
<b>AAV</b>	Virus associé à l'adénovirus
<b>Ad</b>	Adénovirus
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ADNc</b>	ADN complémentaire
<b>AMM</b>	Autorisation de mise sur le marché
<b>AMPc</b>	Adénosine monophosphate cyclique
<b>AP-1</b>	Protéine activatrice 1
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>B10</b>	Souris de fond génétique C57BL/10ScSn
<b>BMD</b>	Dystrophie musculaire de Becker
<b>CaM</b>	Calmoduline
<b>CAM</b>	Molécules d'adhésion cellulaire
<b>CHO</b>	Cellules d'ovaire de hamster chinois
<b>CK</b>	Créatine kinase
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CPA</b>	Cellule présentatrice d'antigènes
<b>CRE</b>	Cyclic adenosine monophosphate response element
<b>Da</b>	Dalton
<b>DGC</b>	Dystrophin-glycoprotein complex
<b>DMD</b>	Dystrophie musculaire de Duchenne
<b>DMEM</b>	Dulbecco's medium Eagle modified
<b>DO</b>	Densité optique
<b>Dp</b>	Degré de polymérisation
<b>EDTA</b>	Acide éthylènediamine tétraacétique
<b>EMEA</b>	Agence européenne des médicaments
<b>Epo</b>	Érythropoïétine
<b>FDA</b>	Food and drug administration
<b>FGFR</b>	Récepteur du facteur de croissance des fibroblastes
<b>FVC</b>	Facteur de venin de cobra
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>GCR</b>	Glucocorticoid receptor
<b>GFP</b>	Green fluorescent protein
<b>GMPc</b>	Guanosine monophosphate cyclique
<b>Grb2</b>	Growth factor receptor-bound protein 2
<b>HEK-293</b>	Cellules embryonnaire humaines de rein clone 293
<b>HepG2</b>	Cellules de carcinome hépatique humain
<b>HGFR</b>	Récepteur du facteur de croissance des hépatocytes
<b>HLA</b>	Human leukocyte antigen
<b>HSPG</b>	Protéoglycane héparane sulfate
<b>HSV</b>	Virus de l'herpès simplex
<b>IA</b>	Intra-artérielle
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interféron gamma

<b>IL</b>	Interleukine
<b>IM</b>	Intramusculaire
<b>IP</b>	Intrapéritonéale
<b>ITR</b>	Internal terminal repeat
<b>IV</b>	Intraveineuse
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>KO</b>	Souris transgénique knock-out
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>LT</b>	Lymphocyte T
<b>LTC</b>	Lymphocyte T cytotoxique
<b>LTh</b>	Lymphocyte T helper
<b>MAPK</b>	Mitogen activated protein kinase
<b>MCK</b>	Promoteur de la créatine kinase musculaire
<b>MMP</b>	Métalloprotéase matricielle
<b>MOI</b>	Multiplicité d'infection
<b>MRC5-V2</b>	Fibroblastes de poumon de fœtus humain transformés par le SV40
<b>mSeAP</b>	Phosphatase alcaline sécrétée murine
<b>NFAT</b>	Nuclear factor of activated T cell
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Nuclear factor $\kappa$ B
<b>NK</b>	Cellule natural killer
<b>nNOS</b>	Monoxyde d'azote synthétase de type neuronal
<b>NO</b>	Monoxide d'azote
<b>Ova</b>	Ovalbumine
<b>PBS</b>	Tampon Phosphate buffered saline »
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PDGFR</b>	Récepteur du facteur de croissance des plaquettes
<b>PEG</b>	Polyéthylène glycol
<b>PEI</b>	Polyéthylèneimine
<b>PI3K</b>	Phosphatidylinositide-3'-kinase
<b>pI</b>	Acide polyinosinique
<b>pK</b>	Poly-L-Lysine
<b>PM</b>	Polymyosite
<b>PR</b>	Polyarthrite rhumatoïde
<b>pR</b>	Poly-L-arginine
<b>QPCR</b>	PCR quantitative en temps réel
<b>RBS</b>	Rep binding site de l'ITR
<b>RLU</b>	Relative light unit
<b>ROS</b>	Radicaux libres
<b>SAC</b>	Stretch-activated channel
<b>SVF</b>	Sérum de veau foetal
<b>TA</b>	Muscle tibial antérieur
<b>TACE</b>	TNF convertase enzyme
<b>TLR</b>	Récepteur de type toll
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor $\alpha$
<b>TNFR</b>	Récepteur du TNF
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>vg</b>	Génomés viraux
<b>3'UTR</b>	Région 3' non transcrite



# INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

## Par ordre d'apparition :

Figure 1 – Obstacles au transfert d'ADN dans la cellule.....	1
Figure 2 – Thérapie génique <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> .....	2
Figure 3 – Le virus adéno-associé (AAV).....	3
Figure 4 – Génome de l'AAV sauvage.....	3
Figure 5 – Schémas du modèle de réplication du génome simple brin des AAV.....	4
Figure 6 – Production de vecteur AAV par tri-transfection.....	6
Figure 8 – Arbre phylogénétique des AAV.....	8
Tableau 1 – Récepteurs de différents sérotypes AAV.....	9
Figure 9 – Schéma de l'infection de l'AAV2.....	10
Figure 10 – Vecteur AAV double brin.....	12
Figure 11 – Tropisme des sérotypes AAV.....	14
Figure 12 – Administration loco-régionale de vecteur de thérapie génique.....	17
Figure 13 – Schéma de vecteur AAV à capsid modifiée.....	22
Figure 14 – Modèles du trafic nucléaire de l'AAV : voie d'accumulation et de mobilisation.....	24
Figure 15 – Visualisation de l'activité luciférase <i>in vivo</i> après l'injection IV de vecteur AAV de sérotype 1 à 9.....	25
Figure 16 – Transduction musculaire systémique par injection intraveineuse de vecteur AAV.....	26
Tableau 2 – Polymères utilisés.....	30
Figure 17 – Transduction de l'AAV2 <i>in vitro</i> en présence de différents polymères.....	31
Figure 18 – Concentration plasmatique de mSeAP : pré-injection de pK2.....	33
Figure 19 – Analyse de l'expression de mSeAP dans les organes.....	34
Figure 20 – Pré-injection de doses croissantes de pK2.....	35
Figure 21 – Influence du degré de polymérisation de la pK.....	36
Figure 22 – Pré-injection de poly-L-arginine.....	37
Figure 23 – Toxicité des pK.....	37
Figure 24 – Comparaison de pK2 et pK4.....	38
Figure 25 – Impact du temps de pré-injection de pK2 et pK4.....	39
Figure 26 – Influence de la dose d'AAV2 sur l'effet de l'adjuvant pK4.....	40
Figure 27 – Analyse détaillée de la transduction et de la biodistribution.....	41
Figure 28 – Transduction systémique de l'AAV2 en fonction du sexe et effet de la pK chez les souris mâles.....	42
Figure 29 – Sécrétion muscle-spécifique de mSeAP lors de l'injection d'AAV2 et d'adjuvant pK.....	43
Figure 30 – Transduction du cœur et du diaphragme de souris pré-injectées avec la pK4.....	45
Figure 31 – Cardiotropisme du vecteur AAV9.....	46
Figure 32 – Colocalisation du marquage des fibres lentes et des fibres transduites par l'AAV2 suite en présence d'adjuvant pK4.....	47
Figure 33 – Effet de la pré-injection de pK sur différents sérotypes AAV.....	49
Figure 34 – Analyse détaillée de la biodistribution des vecteurs AAV1, 6 et 9 ± pK4.....	51
Figure 35 – Effet de la pK4 sur une dose supérieure d'AAV6.....	53
Figure 36 – Impact d'une pré-injection de pI sur la transduction systémique de différents sérotypes AAV.....	54
Figure 37 – Formation d'anticorps neutralisants suite à la pré-injection de pI et d'AAV.....	55
Figure 38 – Dose optimale de pI inhibant la formation d'anticorps neutralisant l'AAV2.....	56
Figure 39 – Impact du sulfate de dextran sur la transduction de l'AAV2.....	58
Figure 40 – Impact de l'EDTA sur la transduction systémique des vecteurs AAV2 et AAV9.....	59
Figure 41 – Test du facteur de venin de cobra dans la souche Balb/c.....	61
Figure 42 – Transduction systémique de l'AAV2 chez les souris déplétées en complément.....	62
Figure 43 – Impact de la warfarine sur la transduction systémique du vecteur AAV9.....	64
Figure 44 – Marquage de la mSeAP sur coupes histologiques du protocole warfarine.....	65

Figure 46 – Marquage de coupe histologique du site d’injection sous-cutanée d’AAV.....	68
Figure 47 – Sécrétion de mSeAP dans le sang des souris injectées en sous-cutanée.....	69
Figure 48 – Biodistribution de l’AAV6 et de l’AAV9 après une injection sous-cutanée.....	69
Figure 49 – Impact du jeûne sur la transduction du vecteur AAV.....	71
Figure 50 – Biodistribution chez les souris transduites par l’AAV après une période de jeûne.....	71
Figure 51 – Signes cliniques de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	81
Figure 52 – Coupe histologique de muscle de patient atteint de DMD.....	83
Figure 53 – Organisation du gène de la dystrophine humaine.....	85
Figure 54 – Domaines protéiques de l’isoforme musculaire de la dystrophine humaine.....	86
Figure 55 – Complexe des protéines associées à la dystrophine (DGC).....	87
Figure 56 – Immunomarquage de la dystrophine et de l’utrophine dans le muscle dystrophique.....	89
Figure 57 – Immunomarquage de la dystrophine dans le muscle de la souris <i>mdx</i> .....	92
Figure 58 – Mini- et micro-dystrophines.....	95
Figure 59 – Saut de l’exon 51 de la dystrophine humaine.....	96
Figure 60 – Anatomie du muscle squelettique.....	98
Figure 61 – Séquence des infiltrations inflammatoires dans le muscle blessé.....	99
Figure 62 – Immunocompétence du muscle.....	101
Figure 63 – Avantage de la thérapie génique comparé à une protéothérapie.....	109
Tableau 3 – Essais cliniques de thérapie génique administrant un vecteur AAV en intramusculaire.....	113
Figure 64 – Structure du TNF trimérique : mise en évidence de sa forme conique.....	115
Figure 65 – Différentes stratégies anti-TNF.....	119
Figure 66 – Protéines de signalisation cellulaire associées au DGC.....	122
Figure 67 – Hypothèse de la dérégulation des voies de survie cellulaire en l’absence de dystrophine.....	124
Figure 68 – Modèle d’inhibition de la nécrose des fibres musculaires par un anti-TNF lors de l’initiation de la pathologie chez la souris <i>mdx</i> .....	127
Figure 69 – Voies de signalisation du TNF par les récepteurs TNFR-I et TNFR-II.....	129
Figure 70 – Différentes classes de molécules liant et neutralisant le TNF.....	130
Figure 71 – Schémas du hTNFR-Is/mIgG1.....	133
Figure 72 – Expression de hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris <i>mdx</i> transfectées avec le plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1.....	134
Figure 73 – Analyse des anticorps anti hTNFR-Is/mIgG1 du protocole de transfection du plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1.....	135
Figure 74 – Cinétique de sécrétion du hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris transfectées avec le plasmide pCOR-hTNFR-Is/mIgG1.....	136
Figure 75 – Sécrétion du hTNFR-Is/mIgG1 et anticorps anti-hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris transduites avec le vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 en intramusculaire.....	137
Figure 76 – Cinétique de sécrétion du hTNFR-Is/mIgG1 chez la souris <i>mdx</i> transduite avec le vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 en intraveineuse.....	139
Figure 77 – Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit <i>in vitro</i> .....	140
Figure 78 – Sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1 et anticorps anti mTNFR-Is chez les souris C57BL10 électrotransférées avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.....	141
Figure 79 – Sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1 et anticorps anti mTNFR-Is chez les souris <i>mdx</i> électrotransférées avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.....	142
Figure 80 – Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 plasmatique.....	144
Figure 81 – Infiltration inflammatoire et nécrose dans le muscle tibial antérieur des souris <i>mdx</i> électrotransférées avec pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.....	145
Figure 82 – Expression du mTNFR-Is dans le muscle dystrophique électrotransféré par pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.....	146
Figure 83 – Expression endogène du TNF et du récepteur I dans le muscle dystrophique.....	147
Figure 84 – Niveau endogène du récepteur I du TNF chez les souris <i>mdx</i> et B10 adultes.....	149
Figure 86 – Expression des TNFR-Is/mIgG1 dans le muscle sain et dystrophique.....	151
Figure 87 – Analyse de la sécrétion de hTNFR-Is/mIgG1 et de la réponse humorale.....	153
Figure 88 – Analyse de la sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 et de la réponse humorale.....	155
Figure 89 – Réponse humorale contre la capsid AAV6.....	156

Figure 90 – Réponse IgG2A et IgG2B contre le hTNFR-I. ....	157
Figure 91 – Analyse histologique des muscles injectés par l’AAV6-hTNFR-Is/mIgG1. ....	158
Figure 92 – Dissémination du vecteur injecté dans le muscle dystrophique. ....	160
Figure 93 – Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit par transduction <i>in vitro</i> . ....	161
Figure 94 – Protocole d’évaluation fonctionnelle de la souris <i>mdx</i> électrotransférée avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1. ....	162
Figure 95 – Gain de masse au cours du protocole d’évaluation fonctionnelle. ....	163
Figure 96 – Expression du mTNFR-Is et réponse humorale chez les souris <i>mdx</i> électrotransférées avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1. ....	164
Figure 97 – Détail de la réponse humorale chez 6 souris du protocole d’électrotransfert. ....	166
Figure 98 – Dosage du mTNFR-Is et du TNF dans le muscle injecté et son controlatéral. ....	167
Figure 99 – Variation de la force mesurée lors des tests d’agrippement. ....	168
Tableau 4 – Paramètres mécaniques des muscles. ....	169
Figure 100 – Créatine kinase plasmatique. ....	171
Figure 101 – Perméabilité du diaphragme au bleu Evans. ....	173
Figure 102 – Créatine kinase plasmatique chez les jeunes souris <i>mdx</i> . ....	175
Figure 103 – Coloration HPS du muscle tibial antérieur chez les jeunes souris <i>mdx</i> . ....	176
Figure 104 – Protocole d’évaluation de l’injection intramusculaire d’AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 chez des souris <i>mdx</i> nouveaux-nés. ....	176
Figure 105 – Expression du mTNFR-Is après une injection intramusculaire d’AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 chez des souris <i>mdx</i> nouveaux-nés. ....	177
Figure 106 – Aire pathologique dans le muscle dystrophique des souris nouveaux-nés du protocole d’injection de l’AAV6-mTNFR-Is/mIgG1. ....	178
Tableau 5 – Plasmides. ....	188
Tableau 6 – Sondes et amorces de QPCR. ....	189
Figure 107 – Dot blot. ....	191
Tableau 7 – Titre des vecteurs AAV. ....	192
Figure 108 – Schéma de l’électrotransfert. ....	196
Figure 109 – Shunt hépatique. ....	197
Figure 110 – Test échappement. ....	199
Figure 111 – Test d’agrippement. ....	199
Figure 112 – Bande isolée du diaphragme pour évaluation fonctionnelle <i>in vitro</i> . ....	200
Figure 113 – Dispositif expérimental de mesure des propriétés mécaniques du muscle isolé. ....	201
Figure 114 – Secousse musculaire. ....	202
Figure 115 – Myogramme des tests <i>in vitro</i> sur muscle isolé. ....	203
Figure 116 – Voie extrinsèque de coagulation. ....	206

# PRÉAMBULE

Le traitement des dystrophies musculaires par thérapie génique nécessite une approche systémique afin de toucher l'ensemble de la musculature. Les travaux présentés dans cette thèse abordent deux approches visant à traiter le corps entier chez le modèle murin :

- La première approche, présentée dans la **partie I**, vise à transduire les muscles en administrant le vecteur viral AAV par voie intraveineuse. Nous avons exploré les facteurs influençant la biodistribution de l'AAV, et nous proposons des stratégies adjuvantes pour améliorer le niveau de transduction musculaire.
- La seconde approche présentée dans la **partie II** consiste à transformer un muscle en organe exocrine sécrétant une protéine transgénique thérapeutique dans le sang. Nous avons appliqué cette approche au muscle dystrophique, et nous avons évalué le potentiel thérapeutique d'une protéine transgénique sécrétée inhibitrice de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$ .

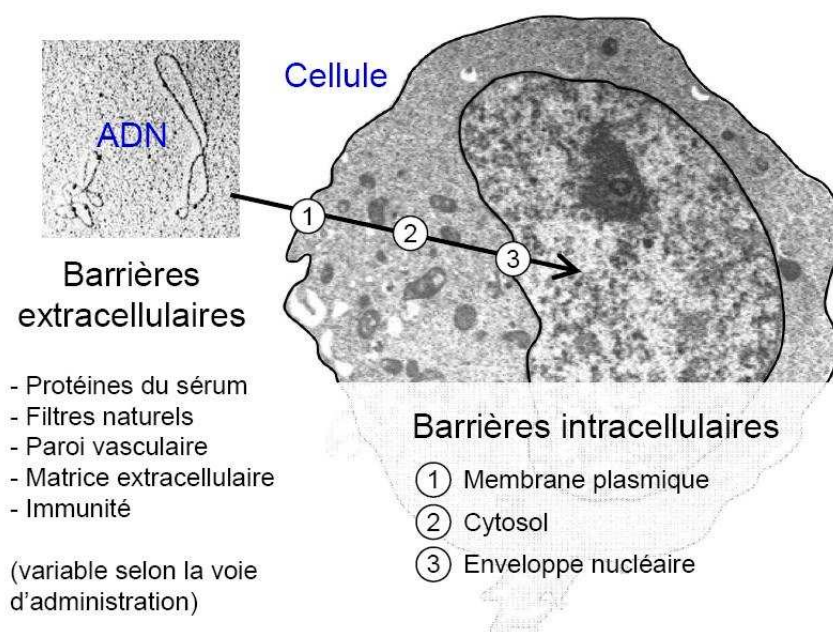
**Partie I - Modification de la biodistribution du vecteur  
AAV injecté par voie intraveineuse**

# Introduction

## 1. La thérapie génique

La thérapie génique consiste à transférer des acides nucléiques dans des cellules cibles afin d'obtenir un effet thérapeutique. Le concept de départ de la thérapie génique était le transfert « additif » d'une copie saine d'un gène endogène afin de restaurer l'expression qualitative ou quantitative d'une protéine déficiente dans le cadre de maladies monogéniques. Mais ces approches se sont diversifiées et concernent également le transfert de gènes codant des protéines thérapeutiques dont le but est de vacciner, ou encore de détruire sélectivement des cellules cancéreuses ou infectées. Plus récemment, le transfert d'acide nucléique a également été développé pour effectuer de la réparation génique, plutôt que de la supplémentation. Il est également possible de moduler l'expression génique endogène en agissant sur l'ARN, soit afin de rétablir une expression (saut d'exon) [1], soit pour le dégrader (ARN interférence, ribozymes) [2].

Le transfert d'acides nucléiques dans les cellules nécessite un transporteur - ou vecteur. En effet, le contexte de transfection est pour le moins défavorable sans une vectorisation car l'ADN seul est une macromolécule fragile qui est peu internalisée par les cellules du fait de nombreuses barrières (*fig. 1*).



**Figure 1 – Obstacles au transfert d'ADN dans la cellule.**

Les techniques de vectorisation qui ont été développées au cours de ces deux dernières décennies peuvent être divisées en deux grandes catégories, à savoir les vecteurs viraux et non viraux. Parmi les stratégies non virales, on peut distinguer celles basées sur des techniques physiques, celles utilisant des molécules non chargées et celles utilisant des composés cationiques. Les principaux vecteurs viraux utilisés en thérapie génique sont dérivés des virus suivants : adénovirus (Ad), virus de l'herpès simplex (HSV), virus adeno associé (AAV), et les rétrovirus (MLV, HIV et SIV). Les vecteurs viraux sont déficients pour la réplication, et débarrassés du maximum de séquences virales possibles.

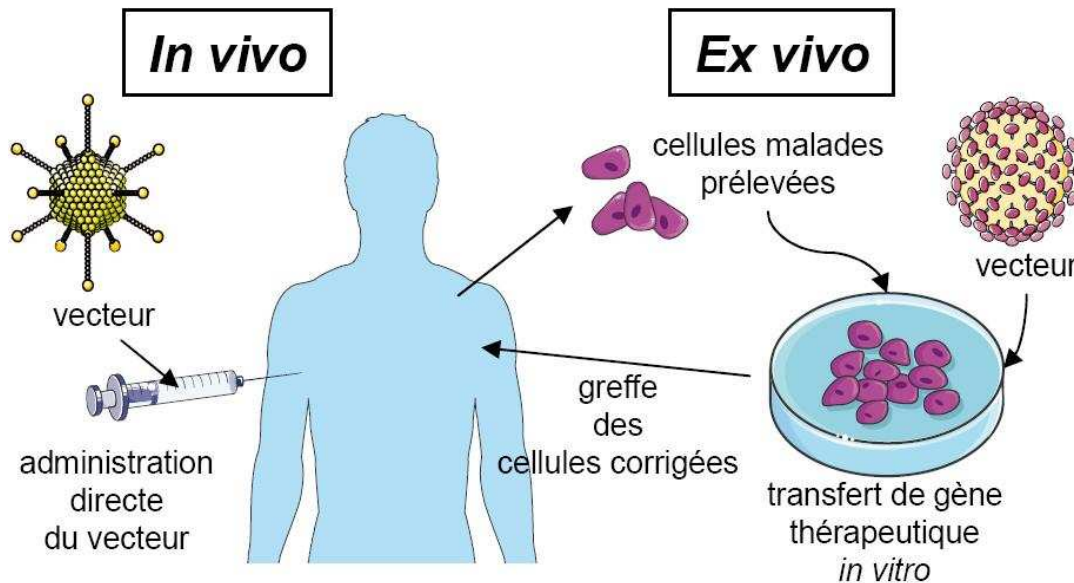


Figure 2 – Thérapie génique *in vivo* et *ex vivo*.

Il existe deux modes d'utilisation d'une thérapie génique (**fig. 2**) :

- soit *in vivo*, c'est-à-dire en administrant le vecteur directement au patient,
- soit *ex vivo* en transfectant des cellules du patient en dehors de son corps avant de les lui greffer, ce qui d'un point de vue immunologique correspond à une autogreffe.

En terme de quantité de vecteur nécessaire, il est plus aisé d'effectuer une thérapie génique *ex vivo*, la quantité de vecteur nécessaire *in vivo* étant d'autant plus importante que la cible est vaste et complexe.

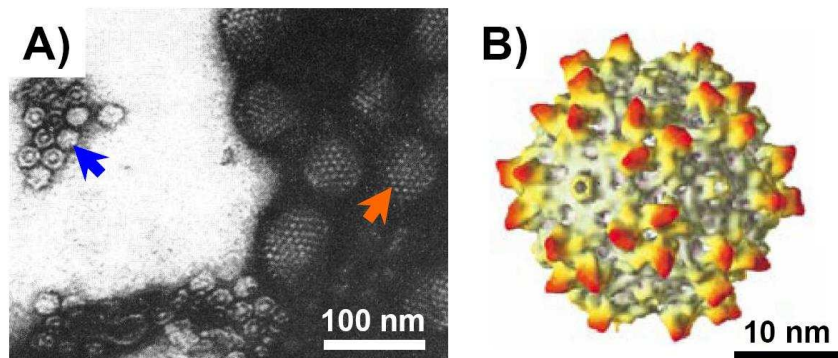
Nous nous focaliserons dans cette première partie sur le vecteur AAV avec lequel nous avons mené notre étude.

## 2. Le vecteur AAV

### 2.1. Le virus sauvage

Le virus adéno associé (ou AAV pour Adenoviral associated virus) a été découvert et décrit en 1965 dans des préparations adénovirales [3, 4] (**fig. 3A**). L'AAV est un membre de la famille des *parvovirus*, du genre *dependovirus*. Les termes *dependovirus* et « adénoviral

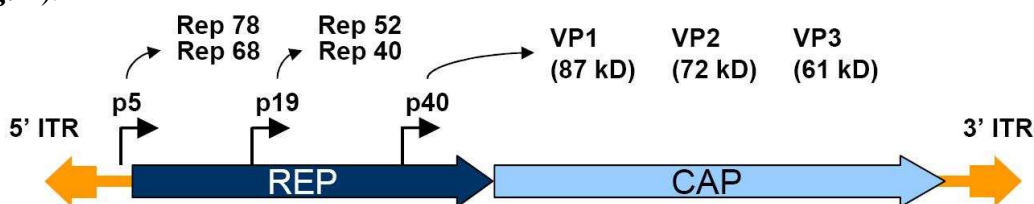
associés » viennent du fait que l'AAV ne peut se répliquer ni former sa capside dans la cellule infectée sans l'aide d'un autre virus auxiliaire co-infectant la cellule comme l'adénovirus, ou encore le virus de l'herpès ou de la vaccine ; on parle de fonctions « helper ». Le premier sérotype AAV sauvage caractérisé fut l'AAV humain de type 2 (AAV2).



**Figure 3 – Le virus adéno-associé (AAV).**

**A)** Photographie de microscopie électronique d'une préparation d'adénovirus humain après coloration par l'acide phosphotungstique. On peut y voir des particules d'adénovirus (flèche orange) ainsi que des particules AAV d'environ 24 nm de diamètre (flèche bleue). Adapté de Melnick et coll. [4]. **B)** Reconstitution en 3D de la capside vide de l'AAV2 à la résolution de 1,05 nm d'après des clichés de cryo-microscopie électronique. D'après Kronenberg et coll. [5].

L'AAV est un virus non enveloppé à capside icosaedrique d'environ 24 nm de diamètre (*fig. 3b*). Il est non pathogène et infecte probablement l'homme par les voies respiratoires, sa seroprévalence\* augmente avec l'âge durant l'enfance (montré pour le sérotype 2) [6]. L'AAV possède un petit génome d'ADN simple brin de 4,7 Kb constitué de deux séquences terminales inversées-répétées (ITRs) de 145 nucléotides, et de deux gènes. Ces deux gènes utilisent différents sites d'initiation de la traduction ainsi que l'épissage alternatif pour coder plusieurs protéines ; le gène *rep* code quatre protéines Rep impliquées dans le cycle viral, et le gène *cap* code trois protéines de structure Cap nécessaires à l'encapsidation du génome viral [7] (*fig. 4*).



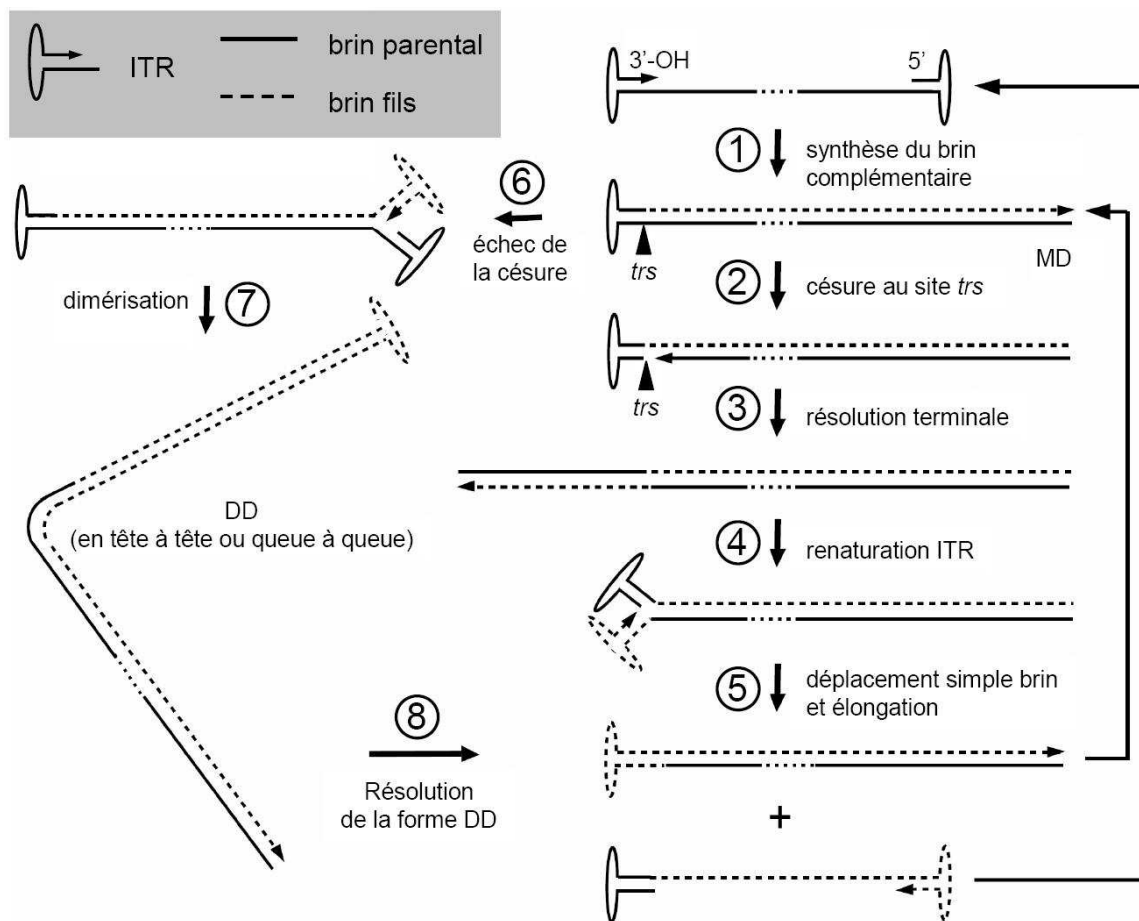
**Figure 4 – Génome de l'AAV sauvage.**

Représentation du génome de l'AAV sauvage. En bleu foncé : cadre ouvert de lecture exprimant les 4 protéines de répliation (Rep 78, 68, 52 et 40) à partir des promoteurs p5 et p19 en utilisant l'épissage alternatif. En bleu clair : cadre ouvert de lecture à partir duquel sont exprimés les 3 protéines de capsides (VP1, 2 et 3) depuis le promoteur p40 en utilisant des codons d'initiation de traduction différents et de l'épissage alternatif. Le génome est encadré par 2 régions inversées répétées terminales (ITR).

\* Proportion d'individus séropositifs dans une population.



Au cours de l'infection, le génome est converti en une structure double brin permettant l'expression des gènes viraux et la production de nouveaux génomes viraux simple brin. En l'absence d'un virus auxiliaire l'AAV rentre en phase de latence de son cycle viral. Cette phase est caractérisée par l'absence d'expression des gènes viraux et la persistance du génome viral sous une forme double-brin épisomal\* ou intégré (provirus). L'intégration a lieu préférentiellement dans le chromosome 19 humain dans un locus nommé AAVS1 en présence des protéines virales Rep78 et Rep68 qui se lient au site AAVS1 et aux ITRs [8]. Cette intégration spécifique a été caractérisée *in vitro*, et il semble qu'elle soit moins fréquente *in vivo*, le génome viral restant alors surtout épisomal [9].



**Figure 5 – Schémas du modèle de réplication du génome simple brin des AAV.**

(1) L'extrémité 3'-OH de l'ITR sert d'amorce à la synthèse d'un brin complémentaire (pointillé) formant un monomère de duplex (MD). (2) Les protéines Rep 78/68 clivent alors le brin parental au niveau du site *trs*. (3) L'extrémité 3'-OH générée permet la synthèse du brin complémentaire de l'ITR. (4) Les 2 ITR peuvent alors se renaturer, ce qui fait apparaître une nouvelle extrémité 3'-OH. (5) L'élongation à partir de ce site conduit au déplacement du néosynthétisé et à la libération de 2 monomères de polarité inverse. Ceux-ci peuvent à nouveau servir de substrat en amont du processus de réplication. (6) Quand le clivage du *trs* n'a pas lieu, la renaturation des ITR à l'opposé du *trs* permet la synthèse du brin complémentaire (7) en formant un dimère de duplex (DD). (8) Cette forme peut réintégrer le processus de réplication après une étape de résolution. Adapté de Goncalves et coll. [10].

\* Épisome : matériel génétique extra-chromosomal.

En présence de virus auxiliaire l'AAV rentre dans sa phase répliquative, avec l'excision du provirus. Durant cette phase le génome viral est transcrit et les protéines Rep (Rep78, 68, 52, 40) et Cap (VP1, VP2, VP3) sont produites. Ces protéines permettent la répllication du génome viral à partir de la forme double brin. La répllication (**fig. 5**) est initiée par les protéines Rep 78/68 se fixant au Rep Binding Site (RBS) des ITR, et clivant les ITR grâce à leur activité endonucléase au niveau du Site Terminal de Résolution (*trs*). Les polymérase cellulaires peuvent alors synthétiser des nouveaux brins d'ADN à partir de l'extrémité 3'OH libre. Les protéines Rep 78/68 possèdent une activité hélicase qui permet de dérouler et de séparer les deux brins d'ADN formés après la répllication. Ainsi, des brins d'ADN monocaténaire de polarités contraires appelés brin « + » et brin « - » sont générés. Les protéines Rep52/40 participent à l'empaquetage à part égale de ces deux types de brins dans les capsides virales [10]. La particule virale mature formée dans le noyau est libérée de la cellule par l'effet lytique du virus auxiliaire.

## 2.2. Caractéristiques et production du vecteur AAV

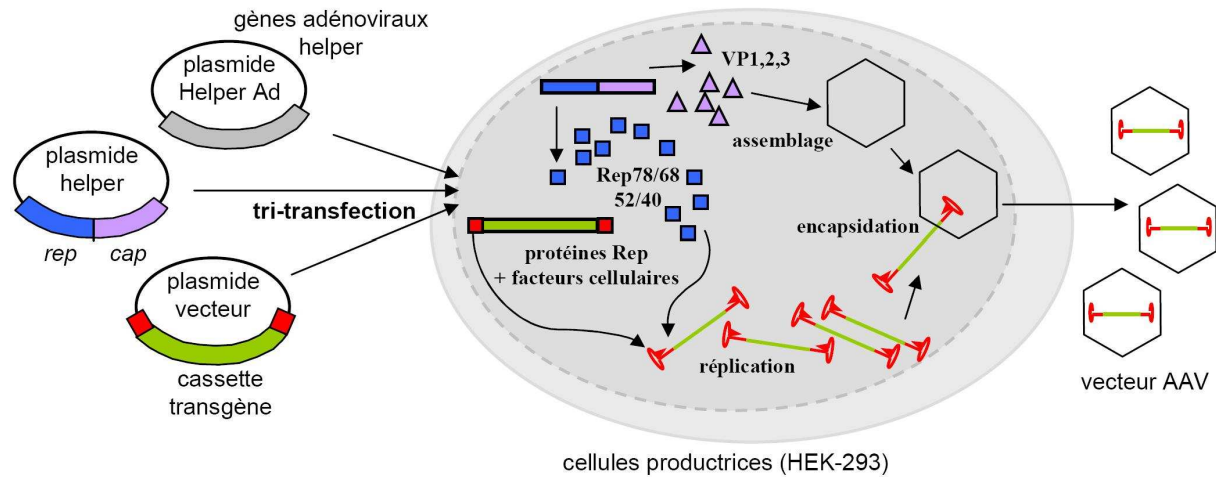
Les virus sont des vecteurs idéaux pour le transfert de gène puisqu'ils ont évolué de manière à infecter efficacement des populations cellulaires ciblées. L'AAV s'est avéré un candidat de choix pour la vectorisation de cassettes thérapeutiques du fait des nombreux sérotypes et variants génomiques disponibles. Mais ce vecteur possède aussi des caractéristiques ayant participé à sa large utilisation par rapport à d'autres vecteurs viraux. Il se distingue du vecteur adénoviral par sa faible immunogénicité, et contrairement aux rétrovirus il n'est pas intégratif, sans que cela n'empêche d'exprimer durablement le transgène. De plus, il peut infecter efficacement des cellules qui ne se divisent pas. Le caractère intégratif non maîtrisé d'un vecteur peut être responsable de mutagénèses insertionnelles. Cela peut conduire à une « génotoxicité » dans le cas où les séquences promotrices de la cassette activent l'expression de gènes aux alentours du point d'intégration. De tels événements sont en effet apparus chez des patients atteints de déficit immunitaire combiné sévère (SCID-X1\*), avec le développement de leucémies suite à l'activation du proto-oncogène *LMO2* dans les cellules CD34+ greffées après leur transduction *ex vivo* par un vecteur rétroviral [11, 12]. En théorie une intégration peut également inactiver un gène en interrompant sa séquence, or il semble que les vecteurs rétroviraux montrent des profils d'intégration dans des zones transcrites [13]. Quant aux vecteurs non intégratifs comme l'AAV ou les vecteurs non viraux, il reste toujours possible qu'ils s'intègrent au génome à l'occasion d'une cassure de l'ADN double brin, mais la fréquence d'un tel événement est très faible.

Le vecteur AAV ne possède plus aucun gène viral, il est donc déficient pour la répllication, et seuls les ITR encadrant la cassette d'expression sont conservés. La taille de la capsid AAV

---

\* Severe combined immunodeficiency syndrome.

implique une faible taille du génome recombinant du vecteur. On considère que la taille limite de séquence exogène que l'on peut incorporer est de l'ordre de 4,5 Kb [10]. Il est possible d'aller au-delà mais le rendement de production et l'infectiosité du vecteur baisse alors.



**Figure 6 – Production de vecteur AAV par tri-transfection.**

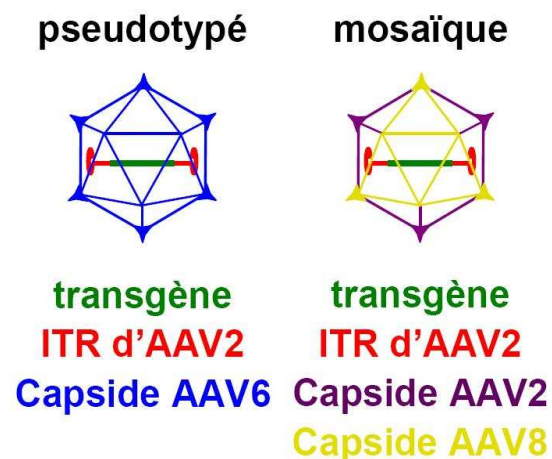
La production du vecteur AAV dans les laboratoires est en général faite par triple transfection de cellules HEK-293 (human embryonic kidney clone 293). Un des trois plasmides transférés contient le génome AAV recombinant, c'est-à-dire la cassette d'expression encadrée par les seules séquences nécessaires en *cis* pour la production du vecteur : les ITR. Le but étant de produire un vecteur déficient pour la réplication, il est nécessaire d'apporter en *trans* les gènes qui ont été excisés de la séquence du vecteur AAV. Le deuxième plasmide contient donc les gènes *rep* et *cap*, et le troisième contient les gènes adénoviraux helper [14, 15] (**fig. 6**). Dans la cellule transfectée, le génome AAV recombinant est excisé du plasmide vecteur par les Rep apportées en trans, puis il est massivement répliqué en brin ADN de polarité positive ou négative, à parts égales [16, 17]. Cette dernière forme ADN simple brin correspond au génome viral qui sera encapsidé par les protéines VP1, VP2 et VP3 exprimées à un ratio approximatif de 1:1:10. La purification du vecteur produit est en général effectuée par ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium ou de iodixanol, ou encore par chromatographie d'affinité si l'on dispose d'un anticorps, ou sur colonne héparinée pour certains sérotypes. D'autres méthodes de productions existent ou sont en développement. Par exemple des cellules dérivées de la lignée Hela peuvent être transfectées de manière stable par *rep* et *cap* et le plasmide vecteur, ce qui permet d'effectuer une simple infection par le virus helper (ou simple transfection) pour produire du vecteur [18]. Dans d'autres systèmes, le virus helper utilisé est celui de l'herpès. Enfin, la production à grande échelle en bioréacteur fait en général appel à la technologie du baculovirus pour transduire des cellules d'insectes (sf9) qui seront alors productrices du vecteur AAV [19]. Ces dernières approches sont motivées par les limites de production actuelle (en tri-transfection par exemple), les rendements étant

insuffisants pour le passage des études chez le petit animal de laboratoire à des études cliniques impliquant l'administration par voie intraveineuse (IV) chez l'homme.

J'emploierais par la suite le terme AAV (ou AAVX) pour le vecteur AAV (de sérotype X), le terme sauvage étant accolé si nécessaire lors de la mention du virus non recombinant.

### 2.3. Les différents sérotypes AAV

Le sérotype AAV le plus étudié, et le vecteur AAV le plus utilisé, est l'AAV de type 2 (AAV2). Il a été montré qu'il est capable d'infecter une large gamme de cellules post mitotiques *in vivo* chez le mammifère, comme les cellules musculaires, les hépatocytes ou les neurones. Ce premier sérotype ayant démontré son utilité, les recherches se portèrent sur l'isolation d'autres AAV sauvages d'origine humaine tels que les sérotypes 3 et 5, ou d'origine simienne tels que les AAV1 et 4, ou d'autres encore comme le sérotype 6 qui est un recombinant entre les sérotypes 1 et 2 [20]. L'isolation des séquences *rep*, *cap* et ITR de ces différents sérotypes a permis d'effectuer des expériences de complémentation croisée par la méthode de tri-transfection décrite précédemment. Il a ainsi été montré que toutes les combinaisons ne sont pas efficaces en terme de rendement ou d'infectivité des virions obtenus, par exemple il y a un manque de complémentation croisée entre les protéines Rep et les ITR des sérotypes 2 et 5 [21]. Cependant, il a été montré durant les années 90 que les gènes *rep* de sérotype 2 sont capables d'encapsider un génome à ITR2 dans les capsides des sérotypes 1 à 6 pour produire des AAV recombinants fonctionnels [20]. Pour créer ces vecteurs dits « pseudo-typés », il suffit donc de changer le gène *cap* par celui du nouveau sérotype dans l'un des plasmides du système de production par tri-transfection décrit plus haut. On obtient ainsi un AAV-2/X, où X est le sérotype de la capside. La majorité des vecteurs de sérotypes autres que l'AAV2 (ou AAV-2/2) sont pseudo-typés, c'est notamment le cas de ceux que nous produisons au laboratoire. Je nommerais par la suite AAVX tout vecteur à ITR2 pseudo-typé avec une capside de sérotype X (AAV-2/X). Au-delà du pseudo-typage, il est aussi possible de créer des vecteurs AAV à capside mosaïque en apportant en trans lors de la production un mélange de séquences *cap* de sérotypes différents (*fig. 7*).

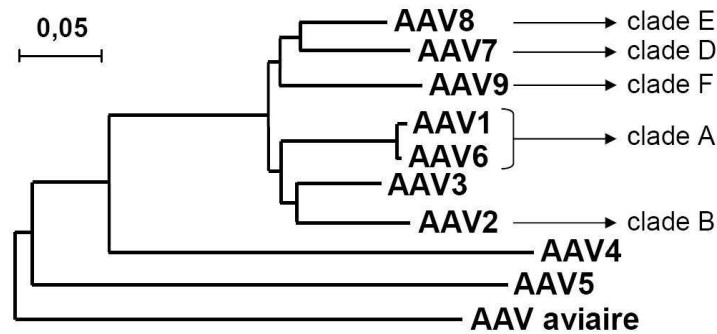


**Figure 7 – Schéma de vecteur AAV pseudo-typé ou mosaïque.**

Ces deux vecteurs AAV ont un génome constitué de la cassette d'expression d'intérêt encadrée d'ITR de sérotype 2. Le schéma de gauche représente un vecteur pseudo-typé avec une capside de sérotype 6. Le schéma de droite présente un vecteur mosaïque produit en utilisant un mélange de gènes *cap* de sérotype 2 et 8.

Bien sûr d'autres sérotypes ont été isolés depuis, essentiellement par PCR sur des primates non-humains, des tissus humains ou d'autres sources [22], et ils portent le nombre d'AAV sauvages connus à plus de 120 et le nombre de vecteurs dérivés à 12 [22-24].

Les différents AAV connus sont classés par clades sur la base de l'analyse phylogénétique des séquences d'acides aminés de la protéine de capsid VP1 (*fig. 8*). Cette classification indique les distances évolutives entre les différents sérotypes, l'AAV4, 5, 11 et 12 ont par exemple divergé tôt et présentent le moins d'identité de séquence avec les autres sérotypes [9, 25, 26].



**Figure 8 – Arbre phylogénétique des AAV.**

Phylogramme enraciné dont la longueur des branches est proportionnelle au nombre de changements évolutifs au sein de la séquence protéique de VP1. Adapté de Gao et coll. [26].

## 2.4. Récepteurs des AAV

A l'heure actuelle sur cette dizaine de vecteurs, seuls les récepteurs et corécepteurs de l'AAV2 [27], de l'AAV3 [28] et de l'AAV5 [29] ont été caractérisés. En pratique rien ne distingue la capsid du vecteur de celle de l'AAV sauvage de même sérotype. Le sérotype 2 utilise les protéoglycanes héparane sulfate (HSPG) en tant que récepteur primaire, mais également les récepteurs secondaires ou co-récepteurs suivants pour l'internalisation qui suit l'adhésion à la surface cellulaire : l'intégrine  $\alpha V\beta 5$ , le récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR1), ou le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGFR ou proto-oncogène MET). L'AAV5 utilise l'acide sialique  $\alpha$ -2,3-N-lié (acide N-acétylneuraminique) pour se lier à la cellule, puis les récepteurs  $\alpha$  et  $\beta$  du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFRA et B) en tant que co-récepteurs. L'AAV4 quant à lui se lie à l'acide sialique  $\alpha$ -2,3-O-lié et son co-récepteur est inconnu. Les analyses phylogénétiques indiquent que les sérotypes de primates actuels proviennent d'un ancêtre aviaire [26, 30]. Les sérotypes 4 et 5 ont été respectivement isolés du singe et de l'homme, même si l'AAV5 est en définitive assez rare dans la population humaine. Les AAV4 et 5 ont divergé plus tôt de l'ancêtre aviaire comparé aux sérotypes humains 1 et 6. Contrairement aux AAV4 et 5 qui utilisent uniquement l'acide sialique  $\alpha$ -2,3 pour infecter, les AAV1 et 6 qui sont homologues à plus de 99 % peuvent utiliser les deux types d'acides sialiques membranaires  $\alpha$ -2,3 et  $\alpha$ -2,6. Il est possible que les AAV1 et 6 (sérotypes isolés de l'homme)

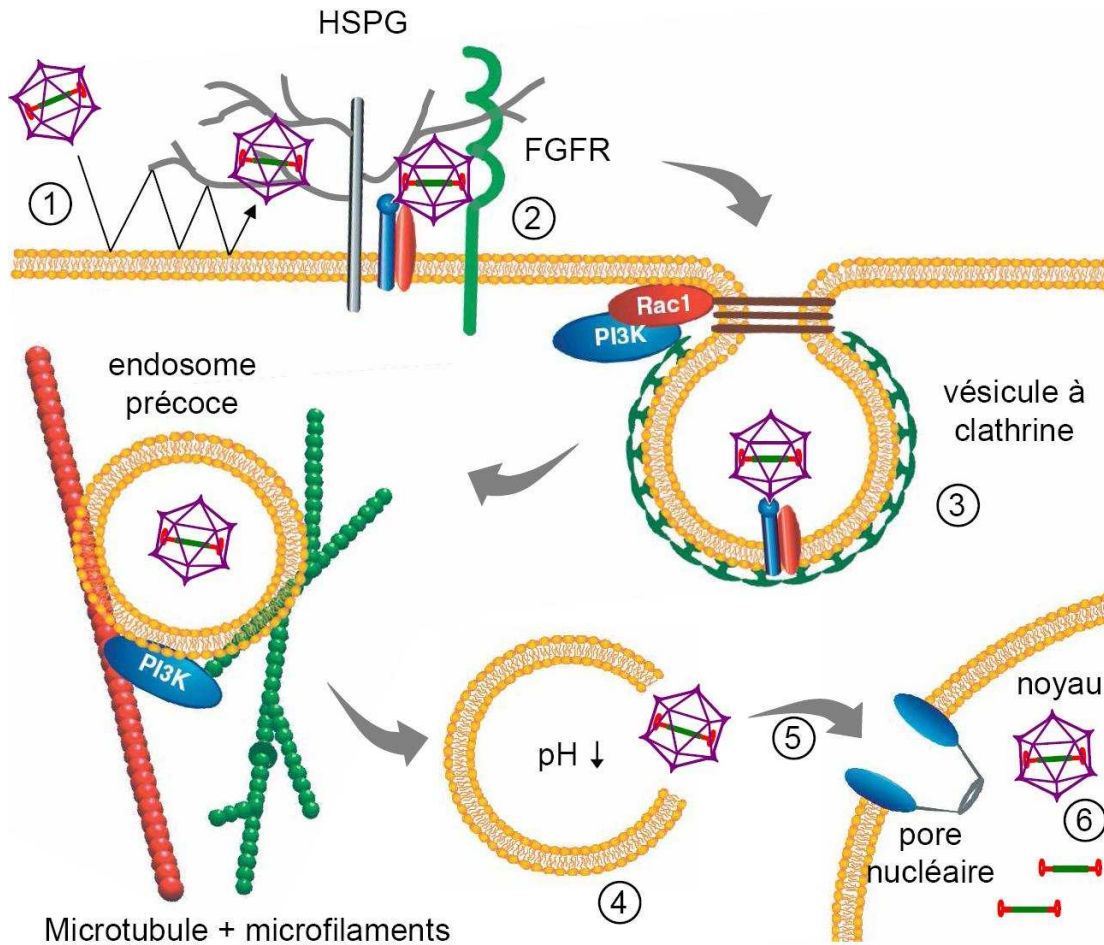
se soient adaptés à l'infection humaine en acquérant leur liaison à l'acide sialique  $\alpha$ -2,6 qui est abondant dans de nombreux tissus humains. Ce type de mécanisme a des précédents et s'observe par exemple quand le virus de la grippe aviaire, qui utilise l'acide sialique  $\alpha$ -2,3, acquiert la capacité d'infecter l'homme via l'acide sialique  $\alpha$ -2,6 [31]. Le **tableau 1** résume les différents récepteurs ou partenaires connus des AAV.

Sérotipe	Récepteur primaire	Co-récepteur(s)
AAV1	acide sialique <sup>a</sup> (?)	ND
AAV2	protéoglycane héparane sulfate (HSPG)	récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR1) récepteur du facteur de croissance des hépatocytes (HGFR), c-met récepteur de la laminine intégrine $\alpha_v\beta_5$ intégrine $\alpha_5\beta_1$
AAV3	protéoglycane héparane sulfate (HSPG)	récepteur 1 du facteur de croissance des fibroblastes (FGFR1) récepteur de la laminine
AAV4	acide sialique $\alpha$ -2,3-O-lié	
AAV5	acide sialique $\alpha$ -2,3-N-lié	récepteurs $\alpha$ et $\beta$ du facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGFRA et B)
AAV6	acide sialique <sup>a</sup> (?) protéoglycane héparane sulfate (HSPG) <sup>b</sup> (?)	
AAV7	ND	ND
AAV8		récepteur de la laminine <sup>c</sup>
AAV9		récepteur de la laminine
AAV10, 11 et 12	ND	ND

**Tableau 1 – Récepteurs de différents sérotypes AAV.**

ND, non décrit. (?) Toujours débattu. <sup>a</sup> Dépend du type cellulaire et du niveau de différenciation cellulaire. <sup>b</sup> Lie l'héparine, mais infection non inhibée par l'héparine. <sup>c</sup> possible implication dans l'adsorption et la transduction. Adapté de Büning et coll. [32].

## 2.5. Mécanismes de transduction du vecteur AAV



**Figure 9 – Schéma de l'infection de l'AAV2.**

Adapté de Büning et coll. [32].

Les vecteurs AAV doivent, avant de pénétrer dans les cellules, passer différentes barrières qui changent selon la voie d'administration et le tissu cible. L'entrée dans la cellule des différents sérotypes semble se faire par endocytose récepteur-dépendante comme cela est résumé pour le cas du sérotype 2 dans la **figure 9** [32]. Une fois en présence de sa cellule cible, le virion\* se lie à son récepteur cellulaire, cette étape de contact est réversible et semble se produire à diverses reprises (1) jusqu'à ce que l'internalisation soit rendue possible par la liaison avec un co-récepteur (2). Les co-récepteurs HGFR et FGFR1 semblent stabiliser le contact, alors que l'intégrine serait responsable de l'endocytose. L'endocytose est dépendante de la dynamine, de rac-1, et de l'activité PI kinase, et se fait par la formation d'un puits de clathrine (3). Le virion doit alors s'échapper de la voie endosomale pour ne pas être dégradé par les protéases lysosomales dans l'endosome tardif, ce qui est susceptible d'arriver à une partie des virions. L'échappement est permis par l'augmentation de l'acidité dans l'endosome, ce qui déclenche

\* Particule virale.

un changement de la conformation de la capsid AAV et l'exposition d'une partie N-terminale de VP1, jusque là interne au virion, qui possède une activité phospholipase A2 (4). Une fois relâché dans le cytoplasme le virion subit diverses modifications conformationnelles et peut être ubiquitinylé. Ceci laisse supposer qu'une partie des virions est dégradée par le protéasome, comme l'indique d'ailleurs le fait que des inhibiteurs du protéasome augmentent la transduction. Le virion utilise le cytosquelette, notamment les microtubules, pour son routage intracellulaire vers le noyau (5). Les étapes de décapsidation et d'entrée dans le noyau sont mal connues. Actuellement, des études montrent l'entrée de capsides intactes dans le noyau, mais il est possible qu'une partie de la décapsidation se fasse également à l'extérieur de celui-ci. Cependant, il a été montré que l'entrée du génome viral dans le noyau depuis le cytoplasme est très inefficace. Une étude récente renforce cette hypothèse et montre que le virion AAV2 rentre dans le noyau (6) où il est séquestré sous forme stable dans le nucléole. Par la suite il serait mobilisé depuis le nucléole vers des sites du nucléoplasme où la décapsidation aurait lieu, suivie de l'expression ou de la dégradation du génome viral [33].

## 2.6. Le devenir des génomes AAV recombinants dans les cellules

Une fois la décapsidation effectuée, la machinerie de synthèse d'ADN de la cellule convertit les génomes viraux simple brin en forme double brin qui peut être transcrite [34, 35]. Une partie des génomes double brin provient également de l'appariement des génomes AAV simple brin de polarité positive et négative apportés par une infection multiple de la même cellule, mais ces formes ont une stabilité tissu-dépendante. Elles sont stables dans le foie, mais ont été décrits comme instables dans le muscle par exemple [34, 36, 37]. Les génomes AAV recombinants restent en large majorité sous forme épisomale contrairement au génome sauvage qui code des protéines Rep participant à son intégration génomique. En effet, des intégrations génomiques du vecteur ont été rapportées *in vitro* dans des cellules en division, mais de tels événements n'ont été que rarement observés *in vivo* dans des cellules quiescentes [38, 39] ; ceci pourrait être dû à un état différent de la machinerie cellulaire nécessaire à l'intégration selon le cycle cellulaire.

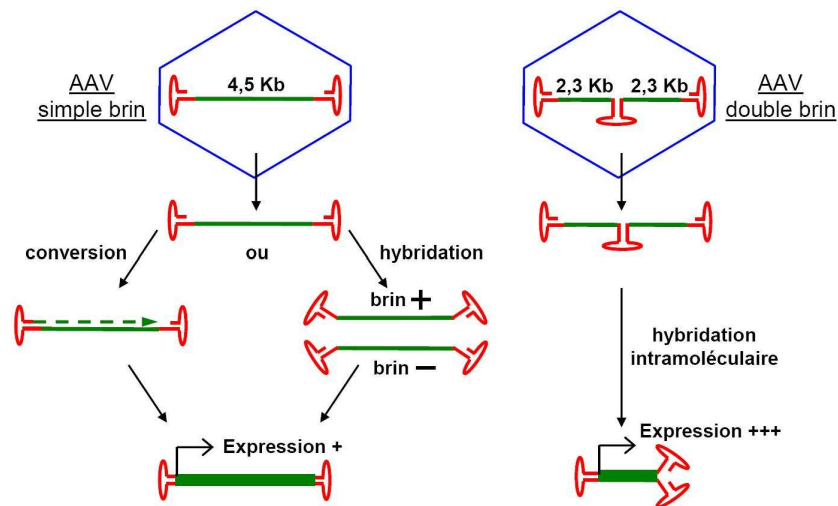
Une étude montre de manière élégante dans le muscle transduit par un vecteur AAV2 la corrélation entre l'expression d'un transgène sécrété (l'érythropoïétine, Epo) et les différentes formes de génomes viraux trouvées par Southern blot durant 2 mois [37]. Les auteurs y montrent que la phase de conversion des génomes viraux en ADN double brin commence très tôt, des formes monomère double brin étant visibles dès le premier jour suivant l'injection. En revanche, seuls quelques génomes double brin parmi tous les convertis se stabiliseront et deviendront transcriptionnellement actifs. En effet, la majorité est éliminée puisqu'à 3 jours il ne reste que 1 à 3 % des monomères double brin trouvés le premier jour après l'injection. Parallèlement à cette baisse, l'expression de la protéine transgénique – qui est détectable dès 4 jours après l'injection par ELISA – augmente jusqu'à atteindre un plateau de sécrétion à J14. Cette expression est corrélée à l'apparition lente sur plusieurs semaines de génomes viraux de



plus haut poids moléculaire, correspondant à des concatémèrises circulaires ou en tête à queue formées par des recombinaisons intra- et inter-moléculaires, et qui constituent le pool épisomal transcriptionnellement actif.

Une autre étude montre que les génomes AAV s'accumulent dans différents foci dans le noyau, où ils colocalisent avec des molécules impliquées dans le contrôle des ADN simple brin (MRe11, Nbs1). L'inhibition pharmacologique de ces molécules est corrélée à une augmentation de la transduction [40]. Ainsi l'étape limitante de la conversion serait liée à une compétition de ces molécules avec la formation du génome double brin.

La conversion du génome viral est une étape limitante qu'il est possible de contourner avec certains vecteurs AAV. Ces vecteurs sont appelés AAV « double brin » par opposition à l'AAV classique dont le génome est simple brin. Etant donné que ces vecteurs ont un génome double brin, il n'y a pas d'étape de conversion après la décapsidation dans le noyau, et l'expression du transgène est plus rapide et plus importante puisque cette forme peut être directement transcrite (voir **fig. 10** ci-après).



**Figure 10 – Vecteur AAV double brin.**

Les vecteurs AAV double brin sont produits par une délétion dans un ITR qui provoque la disparition du *trs*. Ainsi, lors de la synthèse du deuxième brin d'ADN pendant la répllication, l'absence du *trs* provoque le maintien des deux brins appariés et ces derniers sont empaquetés sous cette forme d'épingle à cheveux dans les capsides. A noter que la production de vecteurs double brin n'est possible qu'avec des cassettes d'expression de taille inférieure à 2,3 Kb (**fig. 10**).

En conclusion, nous avons vu que les génomes viraux ont une forme épisomale finale en concatémère qui est stable. L'expression durable du transgène pourrait néanmoins être diminuée par une dilution et une perte de ces concatémères au cours du renouvellement cellulaire du tissu transduit. Ce n'est pas le cas dans les tissus essentiellement post mitotiques comme le muscle et le foie adulte, mais cela a été montré dans le cas du foie des souris

nouveaux-nés par exemple [41]. Certains auteurs émettent cependant l'hypothèse selon laquelle les génomes AAV en concatémère seraient associés aux chromosomes et seraient répliqués au cours des mitoses.

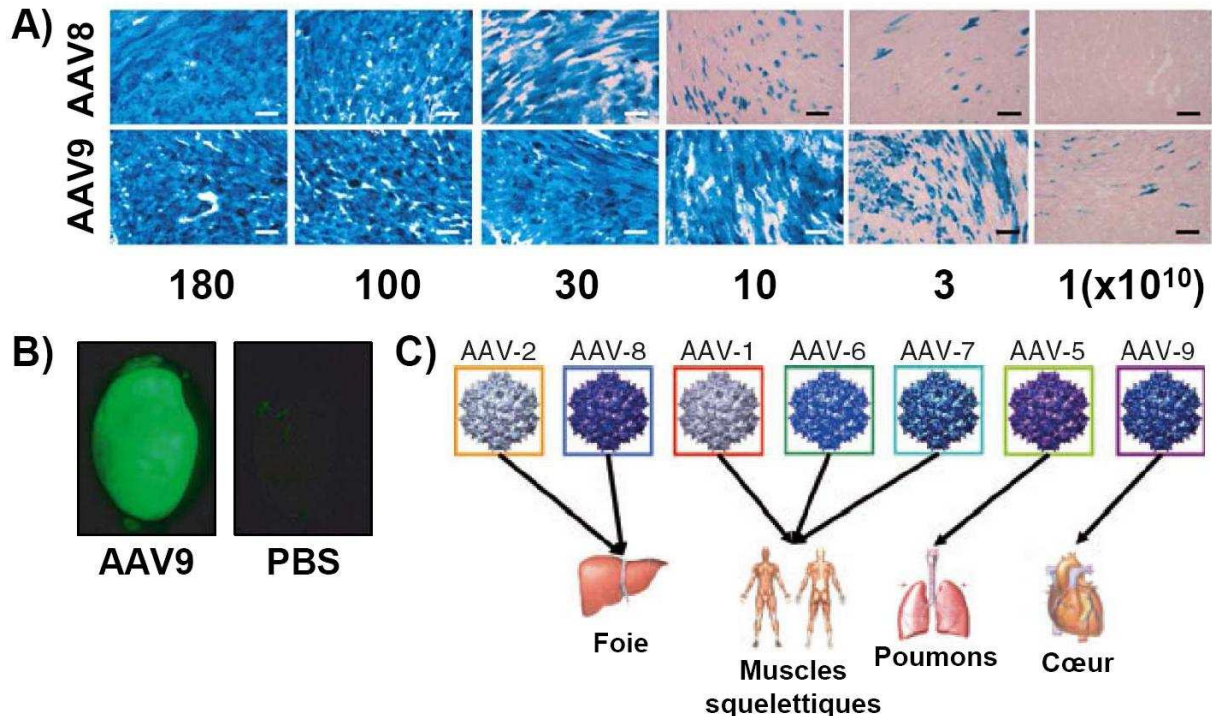
## 2.7. Tropisme des différents sérotypes AAV

Le tropisme d'un virus est défini par les interactions de sa surface (sérotipe de la capsid dans le cas de l'AAV) avec les récepteurs de l'hôte ; mais également par sa voie d'inoculation qui détermine les différentes barrières biologiques à franchir avant d'infecter la cellule cible. D'un individu à l'autre le tropisme d'un virus donné peut varier. Par simplification le tropisme d'un vecteur viral est souvent considéré comme la somme des types cellulaires ou organes qu'il est capable de transduire, indépendamment de la voie d'administration. Ainsi on peut dire de l'AAV2 qu'il a un tropisme pour les différents tissus qu'il est capable de transduire comme le muscle, le foie ou certaines cellules du système nerveux. Étant le mieux caractérisé et parmi les premiers sérotypes découverts, l'AAV2 est le plus utilisé dans les essais de thérapie génique. Le récepteur primaire de l'AAV2, le protéoglycane héparane sulfate (HSPG), est abondant au niveau de la paroi et de la membrane basale des vaisseaux, ce qui peut faciliter sa présence dans de nombreux tissus *in vivo*. Il a aussi été constaté que l'héparine inhibe la transduction de l'AAV2 *in vivo*, certainement par compétition directe avec les HSPG. Ainsi l'utilisation de cathéters héparinés dans des essais cliniques s'avère contre-productive avec ce sérotipe [42]. Cette inhibition n'est pas une règle puisque l'injection d'héparine n'inhibe pas la transduction du foie par les sérotypes 5 et 8 injectés dans la circulation sanguine.

La capacité d'un virus à transduire ou non des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) peut participer à l'immunité contre celui-ci. Il a été montré chez l'animal que l'AAV2, contrairement à l'AAV8, pouvait activer les lymphocytes T mémoire (produits par une approche vaccinale) ; et cela serait semble-t-il lié à la présence d'HSPG sur les cellules présentatrices d'antigènes (l'AAV8 ne lie pas les HSPG) [43]. Ce n'est pas la seule différence de tropisme entre ces deux vecteurs. En effet, l'AAV8 est très efficace pour transduire les hépatocytes de souris *in vivo* comparé à l'AAV2. Cela est attribué en partie à une vitesse de décapsidation supérieure dans le foie [36]. Ainsi les cinétiques d'expression des AAV2 et 8 sont différentes. L'AAV8 présente un fort pic d'expression précoce puis une décroissance de plusieurs semaines avant de se stabiliser à un plateau qui est 10 fois supérieur à celui qui est obtenu avec la même dose d'AAV2. La cinétique d'expression de l'AAV2 est quant à elle en croissance continue le premier mois puis elle se stabilise [44].

Cependant, il faut se méfier des extrapolations entre espèces pour ce qui concerne la biologie des infections. En effet, la supériorité annoncée de l'AAV8 dans le foie des souris, de l'ordre de 20 fois comparé à l'AAV2, a motivé des essais chez de plus grands animaux. Mais les résultats chez le chien ou les primates non-humains furent beaucoup plus modestes, avec des gains de l'ordre de 1,4 à 5 fois [44, 45]. De même pour l'immunité, les anticorps neutralisant

l'AAV2 et 8 préexistants chez l'homme ou le macaque (et inexistant chez les rongeurs), même en faible quantité (titre de 1/5), empêchent le transfert de gènes par l'artère hépatique [46, 47].



**Figure 11 – Tropisme des sérotypes AAV.**

**A)** et **B)** Illustration du tropisme cardiaque de l'AAV9. Les auteurs montrent la transduction de 80 % de la surface de coupe transversales de cœur de souris avec des doses de l'ordre de 3.10<sup>11</sup> vg (génomes viraux). Notons à titre de comparaison que les vecteurs présentés ici ont été titrés par dot blot, une méthode surestimant généralement la concentration comparée à la titration par PCR en temps réel. Quand le vecteur AAV9 est titré par PCR en temps réel on obtiens une transduction quasi complète du cœur avec 1.10<sup>12</sup> vg. **A)** Comparaison de la transduction du cœur par l'AAV8 ou l'AAV9-CMV-LacZ 10 jours après une intraveineuse (IV) chez la souris C57BL/6 de 6-8 semaines ; les doses croissantes de vecteur injectées sont précisées de droite à gauche en vg. Barre d'échelle de 100 µm. D'après Inagaki et coll. [48]. **B)** Photographie d'un cœur de souris nude injecté avec 3.10<sup>11</sup> vg d'AAV9-CMV-GFP par IV, ainsi que d'une souris contrôle injectée avec du PBS. La protéine transgénique GFP est révélée 1 mois après l'injection sur le cœur entier isolé à l'aide d'une lampe UV (488 nm). D'après Vandendriessche et coll. [49]. **C)** Présentation des sérotypes AAV les plus couramment utilisés pour le transfert de gène chez l'animal et de leur tropisme préférentiel respectif (à l'exception du système nerveux et de l'œil). D'après Arruda et coll. [50].

Enfin, certains sérotypes montrent des tropismes particulièrement intéressants. C'est le cas de l'AAV9 qui a un tropisme majeur vers le cœur, avec des niveaux d'expression obtenus supérieurs à dix fois ceux de l'AAV8 par exemple. Les fortes doses de vecteur AAV9 testées en intraveineuse chez la souris montrent une expression quasi complète du myocarde [49] (voir *fig. 11A et B*).

Nous venons d'aborder le tropisme de l'AAV2 et de quelques sérotypes, nous n'entrerons pas plus dans le détail du tropisme de chacun. On peut résumer cette partie en soulignant que l'AAV est capable d'infecter efficacement de nombreux tissus, que les cellules soient en cycle

ou quiescentes (*fig. IIC*). Et la connaissance de ce vecteur a permis d'obtenir l'expression de protéines thérapeutiques transgéniques de quelques mois à plusieurs années selon les cas. Des publications utilisant le vecteur AAV rapportent des cas de correction partielle ou de guérison de maladies génétiques dans des modèles animaux de l'hémophilie, de désordres lysosomaux, d'atteintes de la rétine, de maladies du système nerveux central et d'autres encore...

### **3. Voie d'administration et immunogénicité du vecteur AAV**

#### **3.1. Voie d'administration locale**

Contrairement à l'AAV sauvage qui a une voie d'infection naturelle principale établie, le tropisme d'un vecteur AAV de sérotype donné peut varier en fonction de la voie d'administration utilisée. Il semble logique d'utiliser un vecteur selon la modalité d'infection naturelle du virus dont il est dérivé, puisqu'il a évolué pour infecter efficacement par cette voie. Mais il est également possible de transduire efficacement une population cellulaire ciblée par une administration locale ne correspondant pas à la voie d'infection classique. L'injection locale dans un tissu ou un organe permet la concentration du vecteur au niveau de la population cellulaire cible. Selon la « perméabilité » au vecteur du tissu, une injection locale peut limiter la dissémination du vecteur vers des sites non voulus, comme les gonades. La dose minimale de vecteur injecté dépend du seuil thérapeutique de transduction déterminé expérimentalement. En dehors des incontournables considérations sur l'immunogénicité et la toxicité de l'AAV dans un contexte donné, la dose maximale est imposée par la concentration du lot d'AAV et le volume administrable dans le tissu. Sachant cependant qu'il existe un seuil théorique au-delà duquel tous les récepteurs cellulaires de la population ciblée sont saturés.

Certains organes sont considérés « immunoprivilégiés » du fait d'un relatif isolement des cellules effectrices du système immunitaire, mais cet état est de plus en plus remis en cause. L'œil et le cerveau sont des organes ayant été qualifiés d'immunoprivilégiés. Le cerveau est isolé par la barrière hémato-encéphalique de nombreux pathogènes et virus, ainsi que des cellules « classiques » de l'immunité, et l'œil forme un milieu relativement clos. Cependant, il a été montré que la transduction du système nerveux central par l'AAV peut conduire à une réponse immune humorale au-delà d'une certaine dose de vecteur (au moins 2 patients sur 6 à la dose  $5,7 \cdot 10^{11}$  vg injectée en 4 points du putamen) [51].

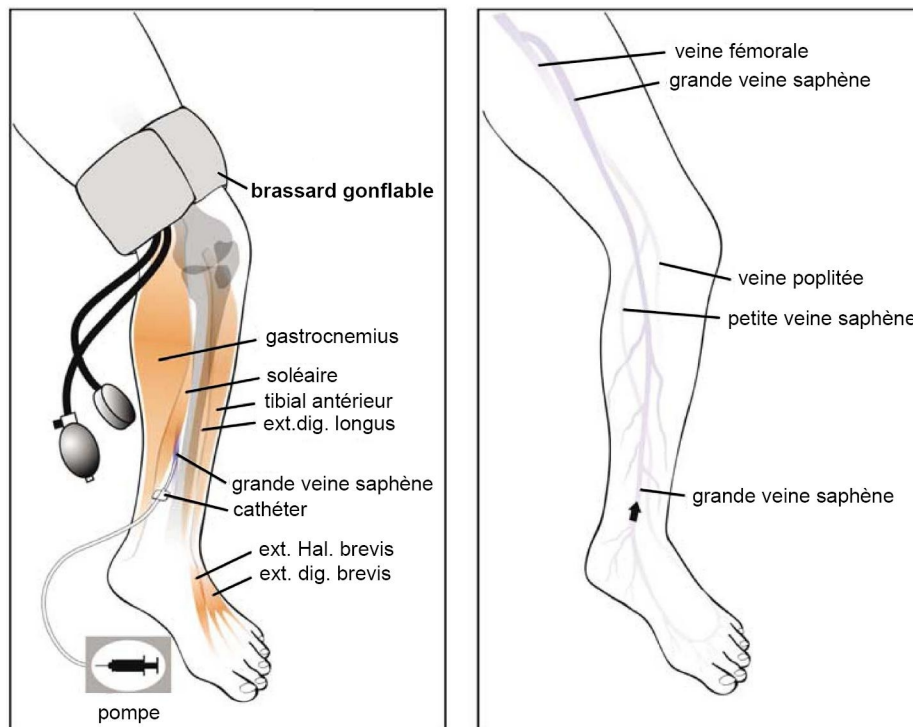
L'œil formant un milieu isolé, seule l'administration directe permet de traiter les maladies génétiques affectant la rétine par exemple. L'injection sous la rétine bien que provoquant son décollement transitoire est bien tolérée. L'AAV est le seul vecteur viral capable de transduire l'épithélium pigmentaire et les photorécepteurs (cônes et bâtonnets), et selon le sérotype choisi, différentes populations cellulaires peuvent être transduites [52]. L'expression obtenue chez les modèles animaux est durable et la réponse immune minime. Ces résultats intéressants ont conduit à la mise en place d'un essai clinique chez l'homme pour traiter l'amaurose congénitale de Leber.

De nombreux autres organes peuvent être efficacement transduits par l'AAV administré localement. C'est le cas des poumons, ayant fait l'objet de différents essais pré-cliniques et cliniques pour la mucoviscidose, ou encore du foie, dans le cadre de maladies métaboliques ou afin de faire sécréter des facteurs thérapeutiques comme le facteur de coagulation IX pour l'hémophilie B [53]. L'administration de vecteurs au poumon peut notamment s'effectuer par instillation (aérosol). De nombreux sérotypes AAV ont un très fort tropisme pour le foie, qui peut être transduit suite à une injection directe, soit comme nous le verrons plus loin, suite à une administration intraveineuse. Le muscle est également efficacement transduit par différents sérotypes AAV. L'administration intramusculaire d'AAV sera abordée en détail dans la **partie II** de cette thèse.

### 3.2. Voie d'administration vasculaire

L'AAV peut être administré par voie vasculaire de manière locorégionale ou systémique afin de toucher de plus larges zones, comme cela est rendu nécessaire par exemple pour une thérapie génique des dystrophies musculaires. L'approche locorégionale et l'approche systémique ont fait l'objet de nombreuses recherches à l'origine pour améliorer le profil de transfection des vecteurs non viraux *in vivo* (essentiellement des plasmides). Ces techniques ont par la suite été transposées à l'administration de l'AAV.

L'**approche loco-régionale** consiste soit en une administration dans un organe transitoirement coupé de la circulation, pour transfecter le foie par exemple ; soit cela consiste en la perfusion d'un membre isolé, pour transfecter/transduire les muscles. Ces méthodes permettent de limiter la dissémination du vecteur AAV et de restreindre la majorité de l'expression à la zone traitée. La perfusion de membre isolé est en général utilisée en conjonction de drogues provoquant la vasodilatation et augmentant la perméabilité vasculaire. Une autre méthode utilise la pression pour faire passer le vecteur du sang vers le tissu musculaire. Cela consiste chez le gros animal en l'infusion rétrograde sous forte pression d'un gros volume en peu de temps par cathétérisation de la veine saphène superficielle [54] (voir **fig. 12**). Chez le petit animal l'injection est en général réalisée en intra-artérielle (IA) pour une raison pratique. Dans les deux cas il en résulte un important œdème transitoire du fait du volume conséquent injecté.



**Figure 12 – Administration loco-régionale de vecteur de thérapie génique.**

Ces schémas montrent à quoi ressemblerait la procédure appliquée à l'homme en isolant la circulation de la partie basse de la jambe. Les principaux muscles touchés sont indiqués. Adapté de Herweijer et coll. [55].

Cette méthode a été utilisée pour administrer un vecteur AAV restaurant la dystrophine par saut d'exon dans des chiens dystrophiques. Les résultats chez ces chiens montrent une remarquable augmentation de la transduction musculaire [56], cependant la question de l'application de la perfusion sur membre isolé chez les garçons atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) reste débattue.

L'**approche systémique** consiste simplement en l'injection vasculaire artérielle ou veineuse de la solution de vecteur. Les injections intraveineuses chez la souris et le rat sont en général réalisées dans la veine de la queue (veine caudale). Cette voie d'administration conduit principalement à la transduction du foie. Le fait que le foie soit un des organes le mieux transduit provient de deux raisons anatomiques :

- tout d'abord c'est un « filtre » traitant un volume sanguin conséquent du fait de sa vascularisation abondante, il absorbe donc la majorité du bolus injecté,
- et deuxièmement il s'agit d'un organe fenestré dont les vaisseaux contiennent des pores permettant une extravasation efficace de la solution de vecteur.

Le système réticulo-endothélial du foie fonctionne comme un filtre mécanique des micro-organismes présents dans la circulation sanguine. Le vecteur AAV ayant un diamètre d'environ 24 nm est capable de passer l'épithélium fenestré et d'atteindre le parenchyme, lui donnant accès aux hépatocytes. Les macrophages résidants du foie, nommés cellules de Kuppfer, captent aussi une partie du vecteur AAV injecté en intraveineuse (IV).

La réponse humorale contre la capsidie du vecteur AAV est systématique après une IV. Il est donc important de connaître la clairance du vecteur afin de mettre en place des stratégies immunosuppressives efficaces, et ainsi pouvoir ré-administrer le vecteur par exemple. Des expériences de transduction par IV d'AAV2 ou d'AAV8 dans des souris injectées avec du sérum neutralisant à différents temps, entre 1 heure pré- et 4 heures post-injection du vecteur, ont été réalisées par le laboratoire de Katherine High [57]. Ces expériences confirment que des anticorps neutralisants présents avant l'injection peuvent complètement inhiber la transduction. De plus, l'inhibition par le sérum neutralisant est constatée à divers temps après l'injection du virus, jusqu'à ce qu'elle disparaisse à 4 heures, les niveaux de transduction étant alors comparables à ceux obtenus chez les souris contrôles n'ayant pas reçu de sérum neutralisant. Cela indique que la majorité de l'AAV2 ou 8 injecté infecte ses cibles dans les 4 heures suivant l'IV, ce qui représente un temps très long. *In vitro* des résultats similaires sont obtenus, et de manière intéressante les anticorps neutralisants n'empêchent pas la liaison à la membrane mais la pénétration intracellulaire.

La transduction donne ici une idée de la clairance de l'AAV à travers l'expression du transgène. Des mesures plus précises de la clairance du vecteur après une IV ont été obtenues par PCR quantitative (QPCR), qui est une méthode plus sensible que la mesure indirecte de l'expression. Et une clairance plus ou moins rapide est alors montrée en fonction du sérotype. Les AAV 1 et 4 décroissent rapidement dans le sang durant la première heure, alors que la baisse est plus importante entre 1 et 6 heures pour les sérotypes 6 à 8. L'AAV9 possède la clairance la plus lente. Cependant à 48 heures, on dose dans le sang moins de 1 % des génomes viraux injectés pour tous les sérotypes [58].

### 3.3. Immunogénicité suite à une administration intraveineuse

- Réponse humorale contre l'AAV :

Les vecteurs de thérapie génique peuvent être détectés par le système immunitaire, et génèrent ainsi une réponse immune susceptible d'éliminer le vecteur ainsi que les cellules transduites. La première étape de la réponse immune correspond à la réponse dite innée caractérisée par une infiltration rapide de cellules inflammatoires et la sécrétion de cytokines. Vient ensuite éventuellement une réponse adaptative dite spécifique dans les quelques jours suivant l'injection du vecteur. La réponse spécifique conduit à l'activation de lymphocytes T helper de sous type 1 ou 2 (Th1 ou Th2) et produira – selon l'antigène et le contexte – une réponse cytotoxique (réponse Th1 médiée par les lymphocytes T cytotoxique, LTC) ou une réponse humorale avec production d'anticorps (réponse Th2 médiée par les lymphocyte T CD4+).

Les vecteurs AAV ont eu un vif succès en thérapie génique du fait de leur immunogénicité moindre comparée à celle d'autres vecteurs utilisés en administration systémique comme ceux dérivés des adénovirus. En effet, il est rapidement apparu que les vecteurs adénoviraux de première et seconde génération provoquent une réponse innée importante et dose-dépendante

induite par les protéines de capsid. Cette réponse innée provoque une inflammation éliminant une partie du vecteur administré ainsi que les cellules transduites. La réponse adaptative est d'autant plus forte contre le transgène exprimé qu'elle est initiée localement dans un contexte inflammatoire dans le tissu cible ; en effet l'expression de la protéine transgénique intervient rapidement après la transduction avec le vecteur adénoviral. La réponse adaptative montée contre les antigènes de la capsid provoque également la production d'anticorps neutralisants qui empêchent toute ré-injection du vecteur. Les vecteurs adénoviraux de dernière génération ne possèdent plus aucune séquence virale et induisent une réponse adaptative plus faible. Mais leur capsid provoque toujours une réponse innée importante pouvant conduire à l'élimination de 80 % des particules adénovirales dans les 24 heures suivant l'administration [59]. En revanche, le vecteur AAV stimule peu la réponse innée. Néanmoins, une réponse humorale contre la capsid est systématiquement produite chez les animaux immunocompétents. Le vecteur AAV induit une réponse humorale, mais c'est également le cas du virus AAV sauvage. Ainsi, il peut exister des anticorps neutralisants pré-existants provenant d'une réponse mémoire due à une exposition préalable au sérotype AAV sauvage. La séropositivité pour l'AAV2 est par exemple de l'ordre de 35 à 80 % dans la population humaine selon l'âge et la situation géographique [6, 60]. Cette réponse limite l'efficacité des ré-injections car des anticorps neutralisants peuvent empêcher la liaison du vecteur à son récepteur [61]. Certains anticorps neutralisants ne bloquent pas l'interaction avec le récepteur, mais agissent en aval de l'entrée du vecteur en interférant avec les processus intracellulaires ce qui inhibe aussi la transduction [57].

Une étude démontre l'implication de la réponse innée dans l'initiation de la réponse humorale contre l'AAV. En effet, ils montrent par immunoprécipitation que la capsid de l'AAV2 lie la protéine du complément iC3b. De plus, les macrophages humains sont très mal transduits par l'AAV *in vitro*, mais en présence de sérum non décomplémenté on observe une meilleure capture du virus. Enfin, la transduction de souris déficientes en protéine du complément C3, ou déficientes en récepteur 1/2 du complément par l'AAV2 provoque une réponse anticorps plus faible et plus tardive contre le vecteur [62].

- Réponse cellulaire contre l'AAV :

La réponse immune contre l'AAV est essentiellement humorale chez l'animal. L'AAV a donc longtemps été décrit comme peu immunogène. Cependant, les derniers essais cliniques réalisés chez l'homme ont apporté un point de vue différent. En effet, des réponses cellulaires T cytotoxiques ont été observées contre des peptides de la capsid AAV dans un essai clinique de thérapie génique pour l'hémophilie B [46]. Une surexpression de courte durée du transgène (facteur IX de coagulation), revenant au niveau endogène après 10 semaines, a en effet été observée chez les patients traités par l'AAV2 délivré au foie par IA. L'augmentation des niveaux de transaminases sériques chez les patients indique également des dommages hépatocellulaires ; de plus une réponse T a été révélée par ELISPOT, avec la détection d'interférons gamma (IFN- $\gamma$ ) sécrétés durant la stimulation avec des peptides spécifiques de la



capside AAV. Etant donné qu'aucune réponse anticorps contre le facteur IX n'est détectée, la chute de la sécrétion du transgène serait donc due à la destruction des hépatocytes transduits. L'ensemble de ces points indique une infiltration de cellules T CD8 mémoire réactivées par l'exposition au vecteur. En effet, durant l'enfance l'homme est infecté par l'AAV2 sauvage, conjointement à une infection par l'adénovirus puisque l'AAV ne peut se répliquer sans lui. Cela explique que les essais pré-cliniques effectués chez l'animal n'induisent pas de réponse cellulaire. En effet l'AAV seul active peu la réponse innée et n'initie pas de réponse T, mais dans le cas de l'homme une présentation d'antigène de capsid AAV plus efficace semble avoir lieu du fait de la présence de l'adénovirus qui est inflammatoire. Une réponse mémoire T existe donc contre l'AAV chez l'homme, mais pas chez l'animal. Des recherches exhaustives de peptides immunogènes ont permis d'identifier un peptide présenté par le CMH HLA B0702 présent dans quasiment toutes les capsides des différents sérotypes [63]. La reconnaissance de ce motif permet la formation d'une réponse cytotoxique ainsi qu'une réponse mémoire d'au moins 2 ans et demi.

L'immunité adaptative initiée contre la capsid de l'AAV suite à son administration systémique peut donc conduire à une réponse humorale, ou encore dans certains cas à une réponse cellulaire détruisant les cellules transduites. Actuellement, un certain nombre d'approches sont développées pour s'affranchir de la réponse humorale contre le vecteur AAV. Il est possible par exemple d'utiliser d'autres sérotypes AAV ayant une seroprévalence faible dans la population humaine, d'utiliser des immunosuppresseurs, ou encore de modifier la capsid. L'utilisation de sérotypes alternatifs dans un but de réadministration nécessite un tropisme similaire pour cibler le même organe, et implique également qu'aucune réaction croisée des anticorps neutralisant le premier vecteur utilisé n'existe contre le second vecteur. Des données récentes semblent indiquer que la réponse T est dépendante de la capacité du vecteur à se lier aux HSPG, ainsi l'AAV2 serait le plus à même à transduire les cellules présentatrices d'antigènes via ce récepteur [43]. Cette éventuelle corrélation entre le potentiel immunogénique de l'AAV et l'indépendance de sa liaison aux HSPG est toujours à l'étude. Cependant l'utilisation de sérotypes alternatifs pourrait ne pas être suffisante, du fait du haut niveau de conservation des séquences entre les différents sérotypes et l'AAV2 [46, 63].

#### **4. Stratégies d'amélioration de la transduction du vecteur AAV**

##### **4.1. Facteurs endogènes et exogènes influençant la transduction AAV par voie systémique**

Parmi les **facteurs endogènes** influençant la transduction AAV, on trouve l'âge, le sexe et l'espèce. Bostick et coll. rapportent l'influence de l'âge au moment de l'administration d'un AAV9. En effet, la transduction de l'aorte, du foie et des reins par l'AAV9 est supérieure chez les souris adultes comparée aux nouveaux-nés, alors que d'autres organes

comme les muscles sont transduits de manière comparables indépendamment de l'âge [64]. De même, le sexe peut jouer sur le niveau d'expression obtenu après une IV d'AAV. En effet, une grande partie du vecteur est captée par le foie, or il a été montré chez la souris que les niveaux d'expression obtenus dans cet organe sont inférieurs chez les femelles [65]. Cela serait dû à un effet hormonal androgène dépendant qui influence la persistance du génome viral extrachromosomale à travers la liaison de facteurs nucléaires au niveau de la séquence RBS (Rep binding site) des ITR [66]. Cet effet est également retrouvé *in vitro* sur une lignée hépatocytaire humaine, ou en utilisant des extraits nucléaires humains. Enfin, des différences de transduction ont été observées d'une espèce à l'autre. C'est le cas de l'AAV8 qui transduit moins bien le foie des chiens et des primates non humains que celui des souris [44, 45] ; ou encore de l'AAV9 dont l'important tropisme cardiaque découvert dans la souris n'est pas retrouvé chez le chien [67]. Ces facteurs endogènes influencent les études pré-cliniques chez l'animal, et leur impact chez l'homme reste à évaluer dans la majorité des cas.

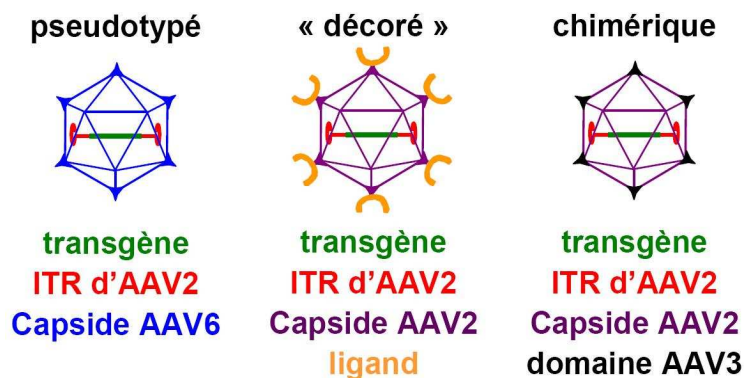
Les **facteurs exogènes** influençant la transduction de l'AAV comprennent la dose de vecteur administrée et les facteurs influençant la perméabilité ou la dilatation des vaisseaux. Ainsi, l'anesthésie diminue l'efficacité de transduction, probablement du fait d'une vasoconstriction, et l'exercice permet une vasodilatation et un meilleur accès au muscle.

#### 4.2. Modification de la capsid AAV

Il est possible d'exploiter la diversité des sérotypes AAV pour transduire plus efficacement. Le sérotype AAV rh32.33, provenant comme son nom l'indique du macaque rhesus, a par exemple démontré une prévalence rare chez l'homme ainsi qu'une capacité à transduire le muscle et très peu les autres organes [68]. Cependant il est difficile de trouver des variants naturels ayant toutes les caractéristiques voulues pour en faire le vecteur idéal pour une application donnée. Des approches visant à modifier la capsid AAV pour mieux cibler la population cellulaire d'intérêt ont donc été développées. L'altération de la capsid virale permet la modification du tropisme, mais peut également rendre le vecteur plus « furtif » face au système immunitaire, et éviter la mise en place systématique de protocoles immunosuppresseurs. Il existe actuellement deux méthodes : les conjugués bispécifiques, et la modification génétique de la capsid.

L'utilisation de **molécules adaptatrices bispécifiques**, c'est-à-dire se liant à la fois au virus et au récepteur cellulaire, permet d'altérer la capsid indirectement. Cela revient à « décorer » le virus avec des molécules plus ou moins affines pour sa capsid et la cible (**fig. 13**). La capsid de certains vecteurs peu efficaces comme l'AAV3b peut être modifiée pour acquérir une nouvelle propriété en y fixant des peptides ou molécules. L'AAV3b auquel est fixé de l'héparine est ainsi capable de se lier au récepteur FGF-R2, qui se dimérise et est endocyté avec le vecteur. Ce récepteur de facteur de croissance est aussi connu pour transloquer vers le noyau. La nouvelle propriété obtenue par cet AAV3b modifié lui confère

une meilleure capacité de transduction (Présentation orale de Emily Messina au congrès ASGT 2007). Cette approche permet de nombreuses combinaisons mais en pratique il peut être difficile de l'adapter à la production de vecteurs à grande échelle, et le système présente souvent une certaine instabilité *in vivo*.



L'AAV de gauche est un vecteur « classique » pseudo-typé avec une capsid de sérotype 6 et possédant un génome recombinant à ITR2. L'AAV du milieu correspond à un vecteur AAV2 décoré avec un molécule adaptatrice bispécifique. Le vecteur AAV chimérique de droite a été produit à partir de séquence *cap* modifiée comme nous allons le voir ci-après.

La **modification génétique de la capsid** est réalisée par l'insertion de peptides aléatoires ou de ligands connus dans la séquence des gènes *cap*, parallèlement à la mutation du motif natif de liaison du récepteur. La première démonstration de cette approche pour « recibler » un vecteur AAV2 a été décrite par Girod et coll. en 1999, qui ont identifié un site de la protéine VP3 (aa 587) tolérant l'insertion d'un peptide [69]. Cela a ouvert la voie à la création d'AAV chimériques, par introduction ou substitution d'une région provenant d'un parvovirus donné vers un AAV cible, ce qui lui confère une nouvelle propriété. A plus large échelle il est également devenu possible avec le développement des techniques de criblage à haut débit de combiner cette approche aux techniques de mutagenèse ou « d'évolution » dirigée de la capsid AAV. Les mutants créés sont alors criblés *in vitro* (ou *in vivo*) pour une ou plusieurs propriétés, comme le niveau de transduction d'une lignée donnée, ou la résistance à l'inhibition par les anticorps neutralisants. Cela peut être réalisé de deux façons : i) soit le criblage est utilisé pour sélectionner des ligands d'intérêt avant de créer l'AAV mutant, ii) soit une multitude de mutants AAV est générée puis criblée contre une cible d'intérêt. La première approche peut être réalisée par exemple en utilisant la technologie du phage display\* pour identifier *in vitro* des interactions protéiques entre ligands peptidiques aléatoires et cellules d'intérêt. Puis les ligands sélectionnés sont utilisés pour créer des AAV chimériques. Cette approche où le ligand est déterminé par phage display est essentiellement empirique, car rien ne peut assurer le fonctionnement attendu du peptide sélectionné une fois inséré dans le contexte de la capsid AAV [70, 71].

\* Expression aléatoire de peptides à la surface de phages.

La seconde approche (DNA shuffling) propose donc de générer aléatoirement des mutations ponctuelles ou des insertions peptidiques de la capsid virale dans le site VP3 identifié en 1999, puis de cribler à haut débit les mutants pour sélectionner les vecteurs d'intérêt. Le groupe d'Oliver Müller a par exemple généré une librairie peptidique aléatoire de la capsid AAV9, et a conféré de cette manière un tropisme cardiaque à un mutant de l'AAV2 [72]. Le groupe de Mark Kay réalise des AAV chimères entre différents sérotypes, et les crible pour leur efficacité de transduction sur une lignée hépatocytaire humaine en présence d'anticorps neutralisants. Ils ont identifié un mutant intéressant contenant des séquences provenant des sérotypes 2, 8 et 9 et ayant conservé la capacité de lier l'héparine [73].

Le groupe de Hildegard Büning, qui travaille également sur la mutagenèse du motif de liaison aux HSPG de la capsid de l'AAV2, s'est intéressé à la relation entre le tropisme des mutants AAV2 obtenus et la charge des peptides insérés. Ils observent que certains mutants obtenus par insertion de peptides de charge nette négative gagnent la capacité d'infecter des cellules indépendamment des HSPG (également négatif), ce qui se traduit *in vivo* par un « déciblage » du foie et de la rate [74]. Les peptides cationiques à l'inverse favorisent l'infection via les HSPG, mais l'entrée dans la cellule est alors indépendante des clathrines et l'export nucléaire s'en trouve réduit. Il semble donc possible d'annuler ou de conférer un tropisme d'ordre électrostatique à des mutants, mais ceux-ci peuvent alors infecter par une voie d'endocytose différente du virus sauvage.

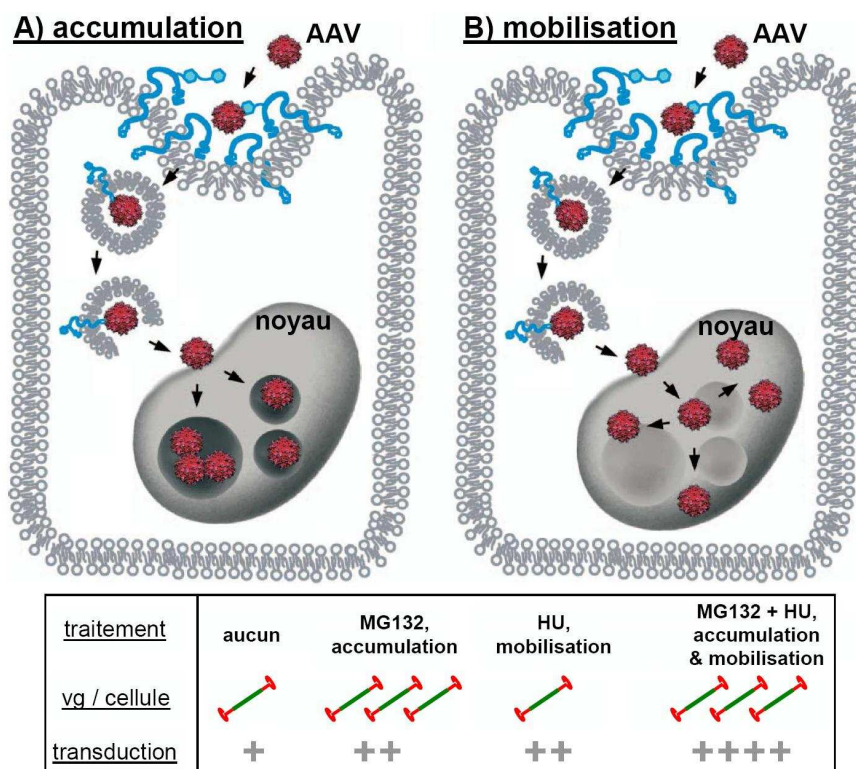
Enfin, différentes approches visant à s'affranchir du système immunitaire ont été tentées, le but étant de « nettoyer » la capsid des antigènes induisant une réponse anticorps neutralisante, ou l'activation de la réponse T mémoire chez l'homme. Des mutants aux épitopes immunogéniques modifiés ont donc été générés. L'étude de Huttner et coll. montre ainsi que certains mutants de capsid perdent jusqu'à 70 % d'affinité pour les anticorps reconnaissant l'AAV2 sauvage [75].

### 4.3. Approches pharmacologiques et adjuvants

Différentes **approches pharmacologiques** permettent d'influencer la transduction de l'AAV. Ces drogues agissent durant le routage intracellulaire, ou plus en aval, sur le devenir des génomes viraux dans le noyau.

Suite à l'échappement endosomal la capsid de l'AAV2 peut être phosphorylée par l'EGFR protéine tyrosine kinase (EGFR-PTK). Cette phosphorylation constitue un signal d'ubiquitination, l'hypothèse est donc qu'elle favorise la dégradation des particules par le protéasome au détriment de leur translocation vers le noyau. L'utilisation d'inhibiteurs de EGFR-PTK ou d'inhibiteurs du protéasome augmente la transduction par l'AAV2 [76]. Des mutants remplaçant les 7 résidus tyrosine cible de EGFR-PTK par des phénylalanines sur la capsid AAV2 ont été créés, et ils montrent *in vivo* une amélioration de la transduction du foie de la souris [77].

Les inhibiteurs du protéasome (comme le MG132), les agents génotoxiques et l'hydroxyurée affectent la translocation cellulaire de l'AAV d'une manière cellule- et sérotype-spécifique et augmentent sa transduction [78]. Cependant le mode d'action de ces composés est mal connu. L'équipe de Samulski a récemment montré que les inhibiteurs du protéasome peuvent augmenter la transduction *in vitro* par potentialisation de l'accumulation du vecteur dans le nucléole. De plus, l'hydroxyurée mobilise les capsides du nucléole vers le nucléoplasme où la décapsidation aurait lieu. Ces produits peuvent agir en synergie par deux voies indépendantes qu'il nomme voie d'accumulation, et voie de mobilisation [33] (*fig. 14*).



**Figure 14 – Modèles du trafic nucléaire de l'AAV : voie d'accumulation et de mobilisation.**

HU : hydroxyurée ; vg/cellules : génomes viraux par cellule. Adapté de Johnson et coll. [33].

L'hypothèse est que l'AAV a appris à exploiter les protéines nucléolaires pour s'y séquestrer dans un état stable. Et qu'à l'occasion de la dissociation du nucléole les virions achèvent la transduction en libérant les génomes viraux dans le nucléoplasme. La dissociation du nucléole peut être déclenchée par la co-infection par un virus helper, la mitose ou encore un stress génotoxique. Ainsi l'utilisation d'agents génotoxiques comme l'hydroxyurée, et la modification de la localisation des protéines nucléolaires permet d'augmenter la transduction. Notons cependant qu'entre leurs mains l'effet des inhibiteurs de protéasome n'est pas retrouvé dans le cas de la transduction du muscle (communication orale de Jarod Johnson au congrès ASGT 2007).

D'autres groupes montrent aussi qu'il est possible de moduler le devenir des génomes viraux à travers certaines protéines intranucléaires. Ainsi, il est possible d'augmenter la transduction

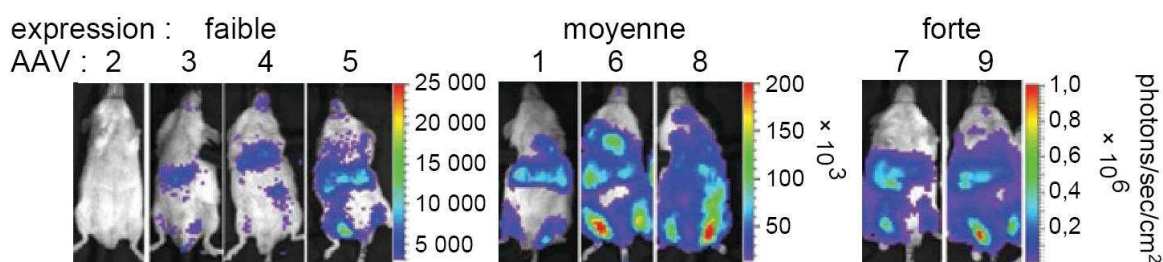
de l'AAV en inhibant les molécules MRe11 et Nbs1 qui sont impliquées dans le contrôle des ADN simple brin [40].

Il a également été montré que certains anti-retroviraux permettent l'augmentation de la transduction par l'AAV. C'est par exemple le cas de la zidovudine, un inhibiteur nucléosidique de la transcriptase inverse. Cet inhibiteur augmente la transduction de l'AAV *in vitro*, mais peut être aussi *in vivo* comme cela est souligné dans un essai clinique où un patient suivant ce traitement montre la meilleure expression du transgène alors qu'il a reçu la plus faible dose AAV de l'essai par intramusculaire [79].

Enfin d'autres **approches dites adjuvantes** ou co-facteurs, permettent l'augmentation de la transduction en agissant avant l'étape d'infection et d'internalisation de l'AAV. Ce sont principalement des agents perméabilisants et vasodilatateurs des vaisseaux, comme le VEGF (vascular endothelial growth factor), l'histamine ou la papavérine. L'injection du VEGF permet par exemple d'améliorer le profil de transduction musculaire de souris par l'AAV6, cependant son action n'est efficace qu'avec des titres faibles de vecteur [80].

#### 4.4. Transduction à l'échelle du corps entier

Plusieurs études de biodistribution comparant les différents sérotypes AAV lors d'une injection systémique ont été menées. Une étude conséquente compare ainsi les sérotypes 1 à 9, et les classe en terme de niveaux et cinétique d'expression dans le corps entier de souris Balb/c mâles. Ceci est possible grâce au suivi de l'expression du transgène luciférase sous le contrôle du promoteur CMV (ubiquitaire et fort), de manière non invasive à l'aide d'une caméra CCD (*fig. 15*).



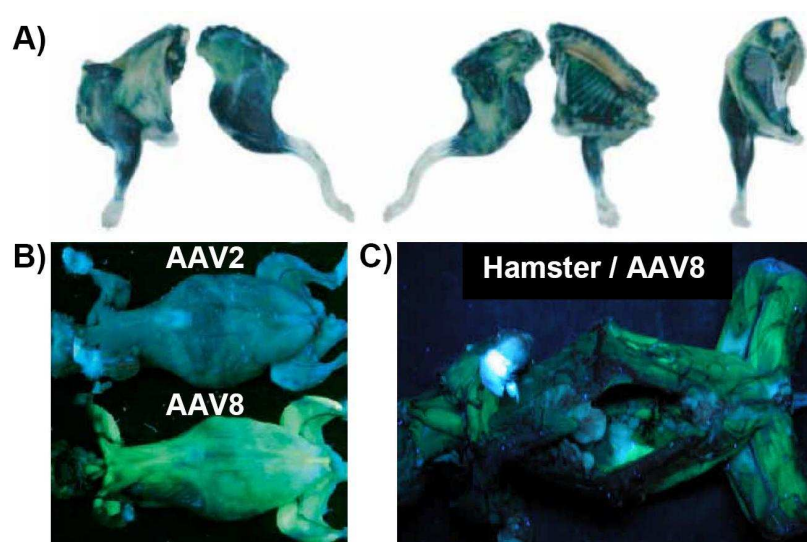
**Figure 15 – Visualisation de l'activité luciférase *in vivo* après l'injection IV de vecteur AAV de sérotype 1 à 9.**

Conditions expérimentales : injection à la veine caudale de  $10^{11}$  vg d'AAV-CMV-Luc chez des souris Balb/c mâles. L'expression est visualisée 9 mois après l'injection. Adapté de Zincarelli et coll. [58].

Les sérotypes 2, 3, 4 et 5 forment un groupe d'expression faible, les AAV1, 6, et 8 ont une expression moyenne, et enfin les AAV 7 et 9 ont montré les plus forts niveaux d'expression (*fig. 15*). Concernant la cinétique d'apparition de la protéine transgénique, deux groupes se démarquent : les AAV à cinétique lente (2, 3, 4 et 5), et ceux à cinétique rapide (1, 6, 7, 8 et

9). Cette approche permet aussi de distinguer le tropisme des différents sérotypes, par exemple le sérotype 9 montre la meilleure distribution, l'AAV4 est le plus efficace dans les poumons, alors que l'AAV6 transduit essentiellement le cœur, le foie et les muscles [58].

En 2004, le groupe de Chamberlain a montré pour la première fois dans le **petit animal** (souris saine ou dystrophique), qu'il est possible de transduire la majorité des muscles squelettiques après une seule injection par voie intraveineuse [80]. Pour ce faire, ils ont utilisé le sérotype 6 très efficace dans le muscle en combinaison avec un traitement au VEGF pour permettre au vecteur de passer plus efficacement l'endothélium vasculaire. Le traitement VEGF permet un gain de transduction dans le cœur et différents muscles, cependant l'effet semble baisser avec l'augmentation de la dose du vecteur. La **figure 16A** présente l'expression du transgène  $\beta$ -galactosidase dans une souris ainsi traitée ayant reçu  $1.10^{12}$  vg d'AAV6.



**Figure 16 – Transduction musculaire systémique par injection intraveineuse de vecteur AAV.**  
**A)** Transduction musculaire ( $\beta$ -galactosidase en bleu) 11 jours après une injection IV de  $1.10^{12}$  vg d'AAV6-CMV-LacZ +  $10 \mu\text{g}$  de VEGF chez des souris mâles C57BL/10ScSn (B10) A gauche et au milieu : dissection du côté gauche selon le plan sagittal présentant l'extérieur et l'intérieur respectivement. A droite : photographie du thorax et de la patte avant gauche selon l'axe cranio-caudal. D'après Gregorovic et coll. [80]. **B)** Photographie du corps entier en fluorescence (face ventrale) 1 mois après l'injection IV de souris nouveaux-nés (veine temporale) avec  $1.10^{11}$  vg/g d'AAV-CB-GFP double brin. **C)** Photographie du corps entier en fluorescence (face ventrale) 4 mois après l'injection IV d'un hamster F1B de 6 semaines avec  $8.10^{11}$  vg d'AAV8-CMV-GFP double-brin. D'après Wang et coll. [41].

Une autre étude aux résultats impressionnants montre la possibilité de transduire les muscles du corps entier par voie systémique sans utiliser de stratégie adjuvante, en exploitant la capacité naturelle du sérotype 8 à traverser efficacement l'endothélium vasculaire. Ils montrent ainsi que le nouveau-né est mieux transduit que la souris adulte par voie systémique (en intrapéritonéale : IP, et en IV). En effet, la transduction des muscles du corps entier est obtenue en injectant par IV  $1.10^{11}$  vg/g d'AAV8-CB-GFP chez la souris nouveau-né de 3

jours. La **figure 16B** compare le sérotype 2 peu efficace au sérotype 8 permettant une expression de GFP (green fluorescent protein) visible en photographie en fluorescence sur le corps entier. Cependant la GFP n'est pas visible au niveau macroscopique dans le cas de la souris adulte injectée avec une dose proche de ce qui est administré aux nouveaux-nés ( $6.10^{10}$  vg/g), même si au niveau microscopique l'expression est trouvée dans tous les muscles et dans le cœur. En revanche, l'injection IV d'AAV8-CMV-GFP avec relativement moins de vecteur ( $1,3.10^{10}$  vg/g) et un autre promoteur constitutif (CMV) dans un hamster, permet une forte expression visible en fluorescence de manière macroscopique (**fig. 16C**). Le sérotype 8 ne transduit pas ou très peu les autres organes dans ces conditions (poumons, rate et cerveau), à l'exception du foie [41]. Ces bons résultats sont obtenus car ils combinent divers avantages en plus du sérotype adapté : les AAV utilisés ont également des génomes double-brin, et dans le cas des nouveaux-nés les fibres musculaires plus immatures se transduisent mieux. Dans cette étude, les auteurs ne constatent pas de modification de la transduction musculaire avec un traitement au VEGF dans le cas de l'injection IV d'AAV1, 6 ou 8 ( $1.10^{12}$  vg). Cela peut être attribué au fait que l'effet disparaît avec l'injection de fortes doses de vecteur.

La preuve de principe étant établie chez le petit animal, les essais ont débuté chez le **gros animal**. Les premiers tests chez le chien se sont avérés décevants, avec des transductions minimales dues à de fortes réponses immunes cellulaires contre le transgène en l'absence d'immunosuppresseur [81]. Récemment, l'injection systémique du sérotype 9 a été évaluée chez des chiens nouveaux-nés, dont le système immunitaire est encore immature ( $1$  à  $2.10^{11}$  vg/g soit une dose totale de  $4$  à  $8.10^{13}$  vg) [67]. Dans ce cas une expression a été détectée dans de nombreux muscles de manière stable pendant les 6 mois de l'étude. De manière surprenante, le cœur des chiens était peu transduit, ce qui diffère du cardiotropisme de l'AAV9 observé chez la souris.

La majorité des études administrant des vecteurs AAV chez le primate non humain par voie systémique visent à transduire le foie, et montrent que l'existence d'une réponse humorale mémoire empêche la transduction par cette voie. Un macaque de  $2$  à  $4$  kg sera par exemple injecté avec  $1.10^{13}$  vg/kg pour transduire le foie [82], soit un bolus d'environ  $4.10^{13}$  vg au total. Ces études chez le primate non humain démontrent donc l'innocuité de l'AAV à des doses de vecteurs comparables à ce que nous venons de voir chez le chien.

L'ensemble de ces données montre la faisabilité de la transduction d'une musculature complète. Cela ouvre la voie aux traitements non plus localisés, mais globaux, pour des patients atteints de maladies neuromusculaires par exemple. Cependant, pour obtenir de tels résultats, de très grandes quantités de virus sont nécessaires, ce qui dépasse les capacités de la plupart des laboratoires.

Il est difficile d'extrapoler les doses qui seront nécessaires **chez l'homme** avec les données obtenues chez l'animal, mais voici tout de même une estimation à titre indicatif. Si on se base sur un rapport de masse alors il faut 3000 fois plus d'AAV pour l'homme que pour une souris (60kg/20g). Or les résultats chez la souris indiquent une dose nécessaire supérieure



ou égale à  $1.10^{12}$  vg pour transduire efficacement les muscles du corps entier. Cela nous donne une estimation de la quantité d'AAV nécessaire au traitement d'un enfant atteint de DMD tournant autour de  $1.10^{15}$  à  $1.10^{16}$  vg.

Pour produire cette quantité en transfection, si on se base sur une lignée cellulaire ayant un bon rendement de production avec environ  $1.10^4$  AAV/cellule (HEK-293 par exemple), il faut donc  $1.10^{11}$  à  $1.10^{12}$  cellules pour le traitement d'un patient. Soit une surface de culture de 10 à 100 m<sup>2</sup>, ou encore de 500 à 5000 flasques de 175 cm<sup>2</sup> (avec une densité finale de l'ordre de  $1.10^6$  cellules/cm<sup>2</sup>). N'oublions pas l'importance de l'étape de purification et le conditionnement qui déterminent la concentration finale du lot de vecteur. Si l'on prend comme exemple la tri-transfection il est courant d'obtenir des titres de l'ordre de  $5.10^{11}$  vg/ml, on voit dès lors que  $1.10^{15}$  à  $1.10^{16}$  vg correspondent à 2 à 20 litres ce qui excède largement le volume injectable chez un humain. Ces chiffres astronomiques montrent les limites de la production actuelle et la nécessité de développer des méthodes de production ayant un rendement supérieur comme la culture en bioréacteur et la technologie baculovirus par exemple. Le développement de stratégies permettant d'obtenir des transductions fortes avec une moindre quantité de vecteur serait également utile.

## Objectifs

Le transfert de gènes thérapeutiques dans le muscle de personnes atteintes de dystrophie musculaire de Duchenne – ou d'autres maladies neuromusculaires – nécessite un traitement par thérapie génique à l'échelle du corps entier. Nous venons de voir qu'il est possible de transduire l'ensemble de la masse musculaire du petit animal de laboratoire avec une injection intraveineuse de vecteur AAV. Cependant, l'extrapolation de la dose à injecter chez l'homme pose des questions de la faisabilité de la production de telles quantités de vecteur AAV, et de la sécurité de cette approche.

Améliorer l'efficacité du vecteur AAV s'avère donc plus que jamais nécessaire. Cela peut être effectué par modification génétique de la capsid, ou encore par une approche non génétique modifiant la surface du vecteur et/ou ses cellules cibles.

Dans cette **partie I** nous nous sommes attachés à développer des stratégies adjuvantes permettant d'améliorer la transduction systémique du vecteur AAV, et en particulier vers le muscle afin de pouvoir injecter des doses inférieures de vecteur. Nous avons également exploré d'autres pistes influençant la transduction systémique de l'AAV telles que la modification de facteurs sanguins, ou encore l'influence du jeûne et de la voie d'administration.

# Résultats

## 1. Adjuvants modifiant la biodistribution du vecteur AAV

### 1.1. Évaluation *in vitro* de différents polymères chargés

Dans une première approche nous nous sommes focalisés sur l'aspect électrostatique des adjuvants dans le but de modifier la transduction du vecteur AAV. Les molécules que nous avons sélectionnées sont des monopolymères d'acides aminés cationiques (de lysine ou d'arginine), ou encore un monopolymère anionique ARN simple brin : l'acide polyinosinique (pI). Par souci de simplicité les polymères cationiques seront nommés par la lettre p minuscule pour poly, suivie de la lettre du code d'acide aminé leur correspondant, par exemple pK pour la poly-L-lysine. Le **tableau 2** résume les noms abrégés de ces différentes molécules ainsi que leur masse moléculaire et le degré de polymérisation moyen leur correspondant.

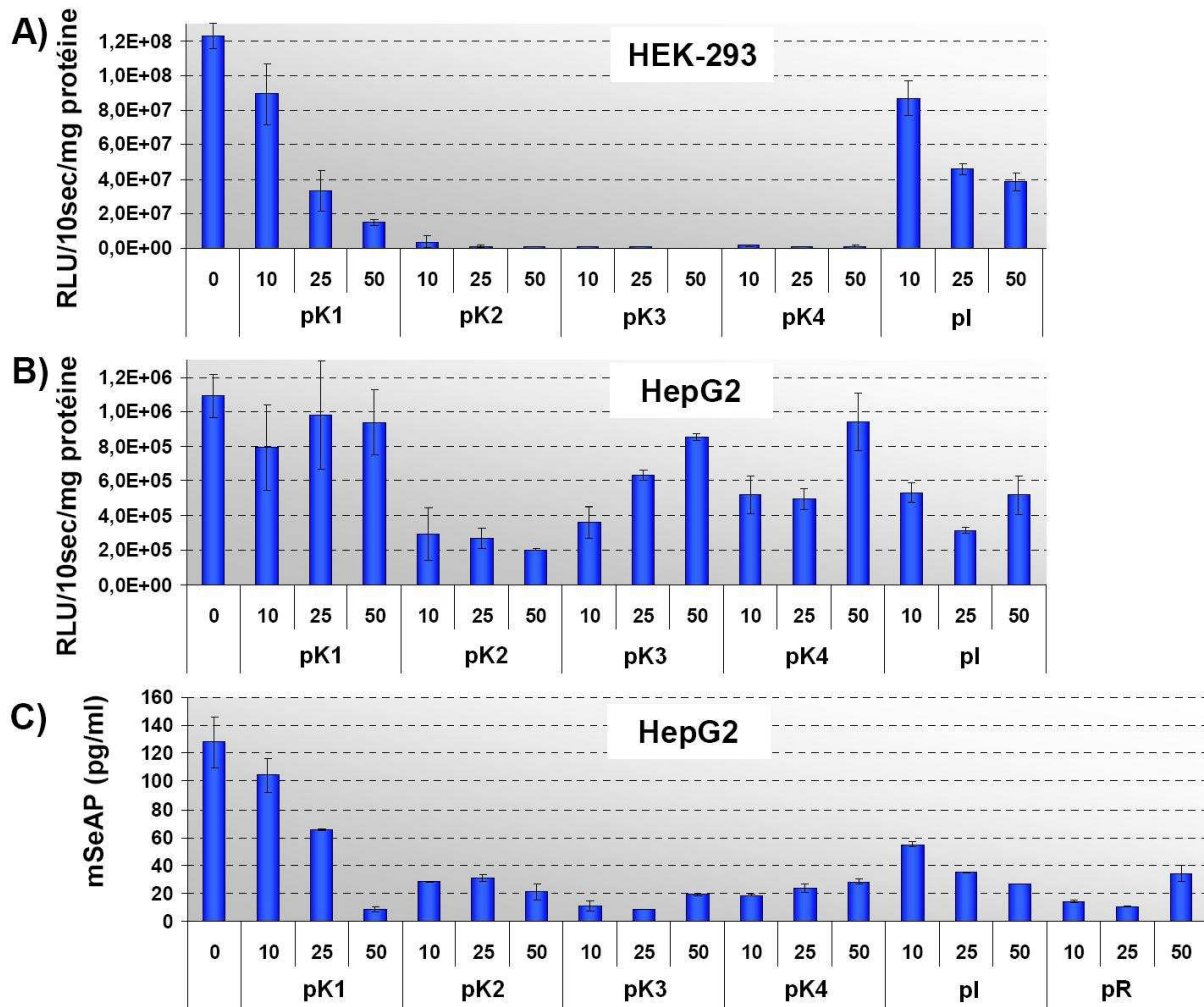
molécule	MM (Da)	dp	Ab
Poly-L-lysine	1000 - 4000	12	pK1
	4000 - 15 000	45	pK2
	15 000 - 30 000	107	pK3
	30 000 - 70 000	238	pK4
Poly-L-arginine	5000 - 15 000	64	pR
Acide polyinosinique	NC	NC	pI

**Tableau 2 – Polymères utilisés.**

Les polymères étant constitués de distributions de chaînes de longueurs différentes, les masses moléculaires sont donc moyennes. MM : masse moléculaire en Dalton. Dp : degré de polymérisation calculé d'après la masse moléculaire moyenne. Ab : nom abrégé attribué à l'adjuvant. NC : non connu.

Le choix des composés chargés positivement est basé sur le fait que l'infection de l'AAV2 est en partie dépendante d'interactions électrostatiques bien décrites. En effet le domaine de liaison de l'AAV2 à son récepteur primaire HSPG (négatif) correspond à 5 résidus basiques (4 arginines et une lysine) de la protéine VP3 formant une zone positive à la surface de la capsid [83]. De plus comme nous l'avons abordé, une grande partie de l'AAV injecté par la voie vasculaire est captée par le foie. Nous avons donc également étudié l'impact de l'acide polyinosinique connu pour sa capacité à inhiber les récepteurs scavengers des cellules présentatrices d'antigènes, et notamment des cellules de Kupffer qui sont les macrophages résidants du foie.

Dans un premier temps nous avons effectué des expériences de transduction *in vitro* sur la lignée permissive HEK-293 et sur la lignée hépatique HepG2, en présence de quantités croissantes de ces polymères. Ces expériences sont présentées dans la **figure 17**.



**Figure 17 – Transduction de l’AAV2 *in vitro* en présence de différents polymères.**

Les quantités de polymères qui ont été pré-incubées sur les cellules sont présentées en abscisse (en µg). Chaque condition est réalisée en duplicat, et l’histogramme présente les moyennes ± l’écart type. Les expériences **A)** et **B)** ont été effectuées le même jour sur les lignées cellulaires HEK-293 et HepG2 en utilisant un AAV2 codant le gène de la luciférase. Les polymères sont incubés sur les cellules 20 minutes. Puis les cellules sont lavées et le milieu d’infection contenant le vecteur à une MOI de 20 000 est incubé 2 heures sur les cellules avant d’être remplacé par du milieu de culture. L’expression de la luciférase est analysée 30 heures après infection sur les lysats cellulaires. L’expérience **C)** est réalisée différemment : un AAV2 codant le transgène sécrété mSeAP est utilisé, la pré-incubation dure également 20 minutes, mais l’AAV est ensuite ajouté sur les cellules sans lavage des polymères à une MOI de 50 000. L’expression de mSeAP est dosée dans les milieux conditionnés récoltés 30 heures après l’infection.

La première barre des histogrammes correspond à la transduction de l’AAV pré-incubé avec du milieu normal. Les polymères cationiques pK et pR inhibent de manière équivalente la transduction de l’AAV2 (*fig. 17C*). L’intensité de l’inhibition est cependant variable d’une lignée cellulaire à l’autre comme le montre la comparaison des HEK-293 et des HepG2 (*fig. 17A* et *B*). A noter que l’on observe une inhibition dépendante de la dose et du degré de polymérisation de la pK1. Le pI quant à lui inhibe de manière dose dépendante la transduction des 2 lignées cellulaires. Dans les expériences A et B de la *figure 17* les milieux de pré-incubation sont lavés avant l’ajout du vecteur AAV2, alors que dans l’expérience C

l'infection est réalisée en présence des composés. Ainsi, l'inhibition de transduction inversement proportionnelle à la dose de pK3 et pK4 dans l'expérience B peut être expliquée par une moindre adhérence des pK de haut degré de polymérisation aux cellules, ce qui n'est pas le cas dans l'expérience C du fait de la présence inhibitrice constante de pK dans les milieux.

L'ensemble de ces observations semble indiquer que les inhibitions observées sont conséquentes à des phénomènes de saturation des membranes cellulaires. Cependant cette expérience n'exclut pas une interaction des polymères avec la capsid AAV, par exemple par relargage dans le milieu de polymères s'étant adsorbés de manière non spécifique sur les cellules avant le lavage.

Quoi qu'il en soit nous voulions essentiellement nous assurer avec ces expériences *in vitro* que ces polymères ont un impact sur la transduction de l'AAV2. Nous sommes donc rapidement passés à un criblage *in vivo* car aucun système *in vitro* ne permet la modélisation de multiples paramètres tels que le passage du vecteur à travers l'endothélium, la transduction des cellules du foie ou des cellules musculaires différenciées.

Nous avons donc choisi arbitrairement la pK2 parmi les différentes pK pour initier nos expériences de transduction *in vivo* chez la souris.

## 1.2. Polymères cationiques

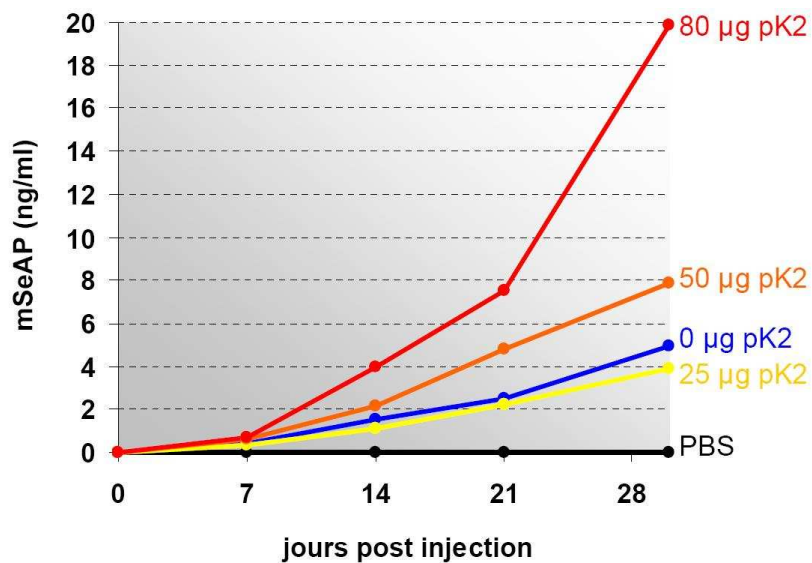
### a) Poly-L-lysine et transduction AAV *in vivo*

Notre stratégie consiste en l'injection intraveineuse (IV) d'un polymère avant l'administration – également par IV – du vecteur AAV2 codant la phosphatase alcaline sécrétée murine (mSeAP). La protéine transgénique mSeAP présente l'avantage d'être non immunogène et d'être dosable dans le sang ou les tissus. De plus, elle possède une thermostabilité supérieure aux phosphatases endogènes, ce qui permet sa détection spécifique après une étape de chauffage des échantillons. Notre cassette d'expression AAV code la mSeAP sous le contrôle du promoteur fort CMV qui est transcriptionnellement actif dans de nombreux tissus, dont les muscles striés, lisses et cardiaque [84]. Le fait que la mSeAP soit sécrétée nous permet de suivre la transduction globale au cours du temps en dosant son niveau dans le plasma des souris qui sont prélevées en sang avant les injections, puis une fois par semaine post injection. La transduction a également été suivie au niveau des organes en dosant la mSeAP dans des broyats tissulaires, ou en la révélant sur coupe histologique.

L'acide aminé lysine est une base tout comme l'histidine et l'arginine. La chaîne latérale de la lysine possède un groupement amine ayant un  $pK_a$  de 10,2. Le pH moyen du sang humain (et murin) étant de 7,4 environ, un polymère de lysine injecté dans le sang sera donc chargé positivement ( $-NH_3^+$ ). La poly-L-lysine est capable d'interactions électrostatiques avec le récepteur primaire HSPG de l'AAV2 [85], nous proposons donc que le polymère cationique pK2 peut altérer la biodistribution de l'AAV2 *in vivo*. L'AAV2 est un sérotype peu efficace

pour transduire le muscle suite à une injection IV ; nous utilisons donc dans cette expérience pilote une dose de vecteur de  $1.10^{12}$  génomes viraux (vg) par souris, ce qui est proche du maximum imposé par la concentration de notre production d'AAV2, et par le volume d'injection IV choisi de 450  $\mu$ l. L'expérience consiste en des pré-injections de doses croissantes de pK2 (200  $\mu$ l), suivies 5 minutes après par l'injection du vecteur (soit un volume final injecté de 650  $\mu$ l) chez des souris Balb/c femelles âgées de 8 à 10 semaines. Sauf indication contraire, nous utiliserons des souris Balb/c femelles âgées de 8 à 10 semaines ainsi que ces volumes d'injection dans toutes nos expériences ultérieures.

Les résultats du dosage plasmatique de la mSeAP chez les souris de cette première expérience sont présentés dans la **figure 18**.

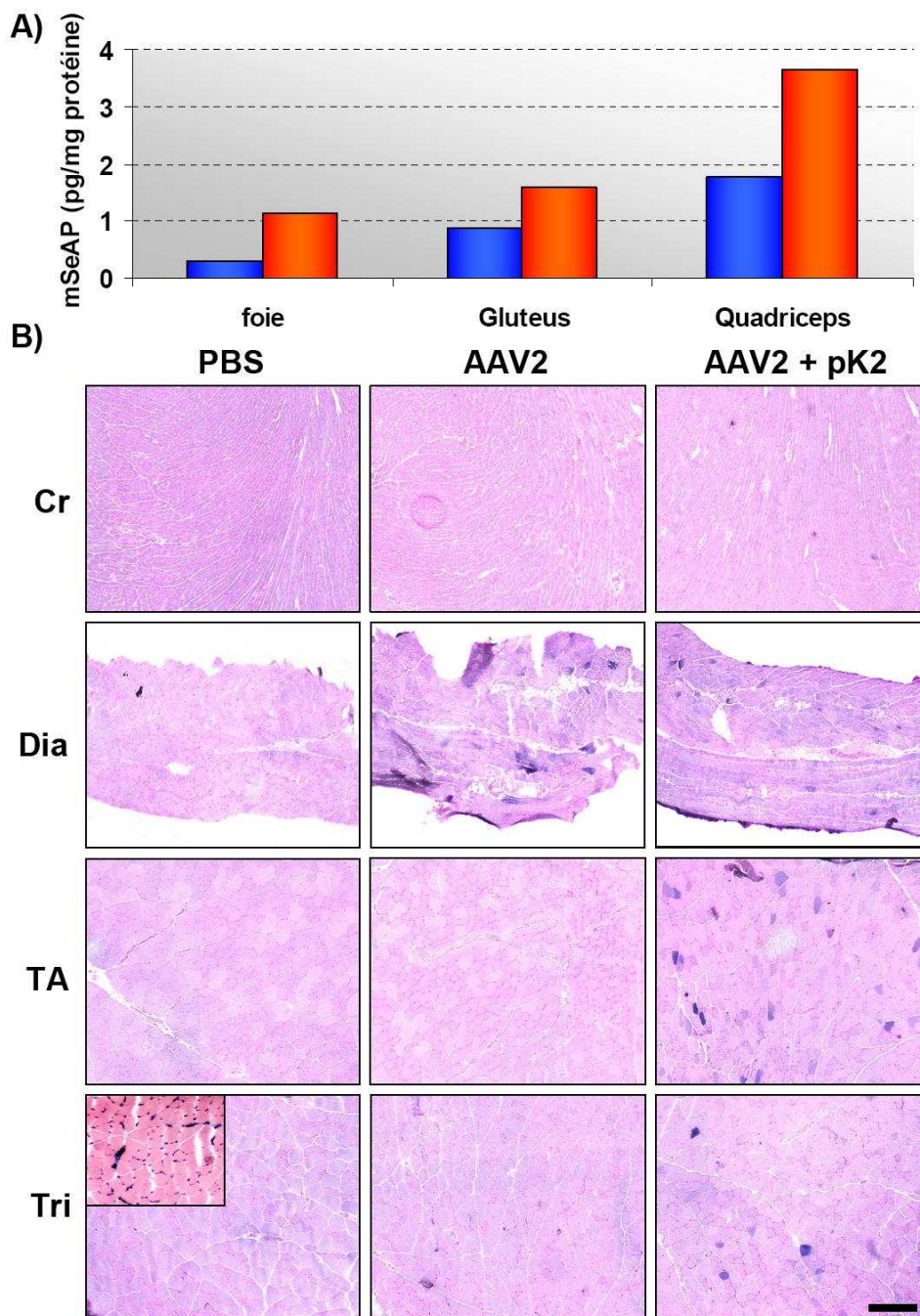


**Figure 18 – Concentration plasmatique de mSeAP : pré-injection de pK2.**

Chaque courbe représente une souris. Le temps est gradué tous les 7 jours en abscisse car les souris sont prélevées en sang chaque semaine post injection. La courbe noire correspond à une souris contrôle injectée avec du PBS. La courbe bleue correspond à la souris de référence injectée uniquement avec  $1.10^{12}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP. Les courbes jaune, orange et rouge correspondent aux souris ayant reçu respectivement des pré-injections IV de 25, 50 et 80  $\mu$ g de pK2 5 minutes avant l'injection IV de  $1.10^{12}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP.

La souris contrôle injectée avec du PBS ne présente pas d'expression de mSeAP dosable ce qui valide le protocole d'inactivation des phosphatases endogènes par la chaleur. La sécrétion de mSeAP croît constamment durant les 30 jours de l'expérience dans la souris contrôle injectée seulement avec l'AAV2 (en bleu). On observe un gain de sécrétion chez les souris pré-injectées avec 50 et 80  $\mu$ g de pK2. Le dosage plasmatique présente l'avantage de renseigner sur l'efficacité de transduction sans nécessité de sacrifier l'animal, cela permet aussi de s'épargner de nombreuses analyses a posteriori dans le cas où le traitement adjuvant est sans effet. Ayant observé ce gain de transduction dès J14 nous avons donc décidé d'analyser plus avant les souris contrôles injectées avec du PBS ou l'AAV2 seul, ainsi que la souris ayant reçu 80  $\mu$ g de pK2 avant le vecteur. Le tropisme naturel de l'AAV2 est

essentiellement vers le foie et les muscles. Le foie ainsi que deux muscles (gluteus et quadriceps) ont donc été prélevés pour doser le transgène *in situ* (*fig. 19A*), ainsi que divers autres muscles pour réaliser le marquage du transgène sur coupes histologiques (cœur, diaphragme, tibial antérieur et triceps) (*fig. 19B*).

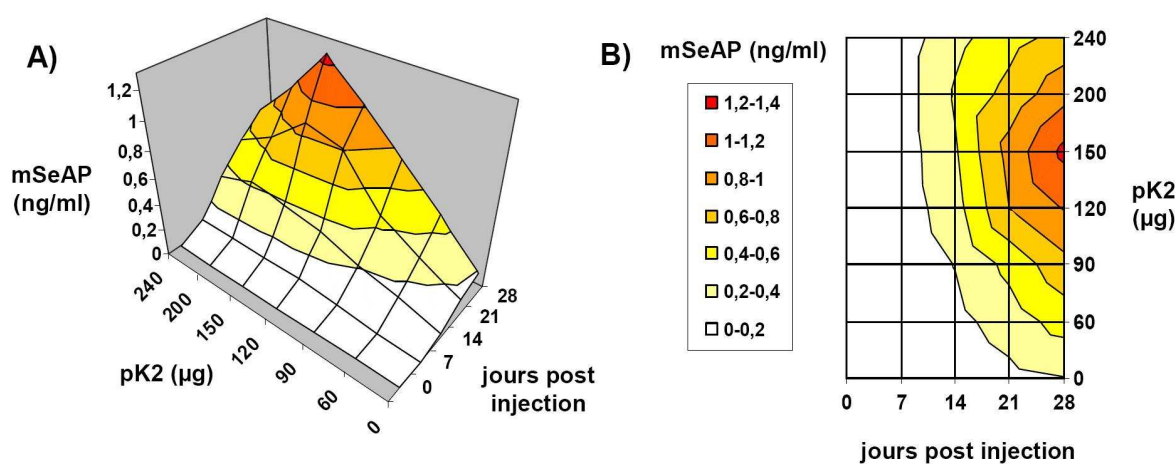


**Figure 19 – Analyse de l’expression de mSeAP dans les organes.**

Ces analyses sont réalisées sur les organes des souris de l’expérience présentée dans la *figure 2* (prélèvements à J29). **A)** Le bruit de fond détecté chez la souris injectée avec du PBS est mesuré pour chaque organe et retranché aux valeurs obtenues dans les échantillons des souris injectées avec le vecteur AAV2-CMV-mSeAP. En bleu : souris contrôle injectée uniquement avec le vecteur ; en orange : souris pré-injectée avec 80  $\mu$ g de pK2. **B)** Les champs présentés sont représentatifs de l’ensemble de la coupe. L’encart dans la photo du triceps contrôle PBS correspond à un muscle dont l’activité phosphatase endogène n’a pas été inactivée à la chaleur. Cr : cœur ; Dia : diaphragme ; TA : tibial antérieur ; Tri : triceps. La barre d’échelle correspond à 200  $\mu$ m.

La **figure 19A** montre que le gain plasmatique est en partie dû à une amélioration de la transduction dans le foie et les muscles. L'encadré du triceps PBS présente une coupe dont les phosphatases endogènes n'ont pas été inactivées à la chaleur. Ce marquage non spécifique est situé entre les fibres musculaires ou au niveau des vaisseaux sanguins. Quand les phosphatases endogènes sont inactivées aucun marquage de la mSeAP n'est visible sur les coupes histologiques de la souris contrôle PBS. Le marquage mSeAP des coupes de la souris injectée uniquement avec le vecteur montre que l'AAV2 transduit peu le muscle après une injection IV de  $1.10^{12}$  vg. Aucun marquage n'est visible dans les cœurs, et le nombre de cellules positives pour la mSeAP dans le diaphragme est comparable avec ou sans pK2. En revanche, on observe l'apparition de fibres musculaires positives pour la mSeAP dans le tibial antérieur (TA) et le triceps des souris pré-injectées avec la pK2, alors qu'aucune transduction n'est visible dans ces muscles chez la souris contrôle AAV2 sans pK2. L'ensemble de ces résultats indique que la pré-injection de pK2 permet d'augmenter la transduction du foie et des muscles par l'AAV2. Une des hypothèses concernant la modification de la biodistribution de l'AAV2 aurait été une inhibition de l'infection consécutive à la saturation des récepteurs HSPG par la pK injectée, dans le cas d'une répulsion électrostatique entre la pK et des zones cationiques de la capsid. Cela semble possible *in vitro* comme nous l'avons vu sur une lignée hépatocytaire, mais *in vivo* l'hypothèse ne tient pas puisque le foie présente un gain de transduction tout comme les muscles.

### b) Effet dose de l'adjuvant pK2 sur la transduction systémique de l'AAV2



**Figure 20 – Pré-injection de doses croissantes de pK2.**

Chaque dose de pK2 correspond à une souris, toutes les souris sont injectées avec  $1.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP. **A)** Vue en perspective de la sécrétion de mSeAP en fonction de la dose de pK2 pré-injectée et du temps. **B)** Vue de dessus du graphique.

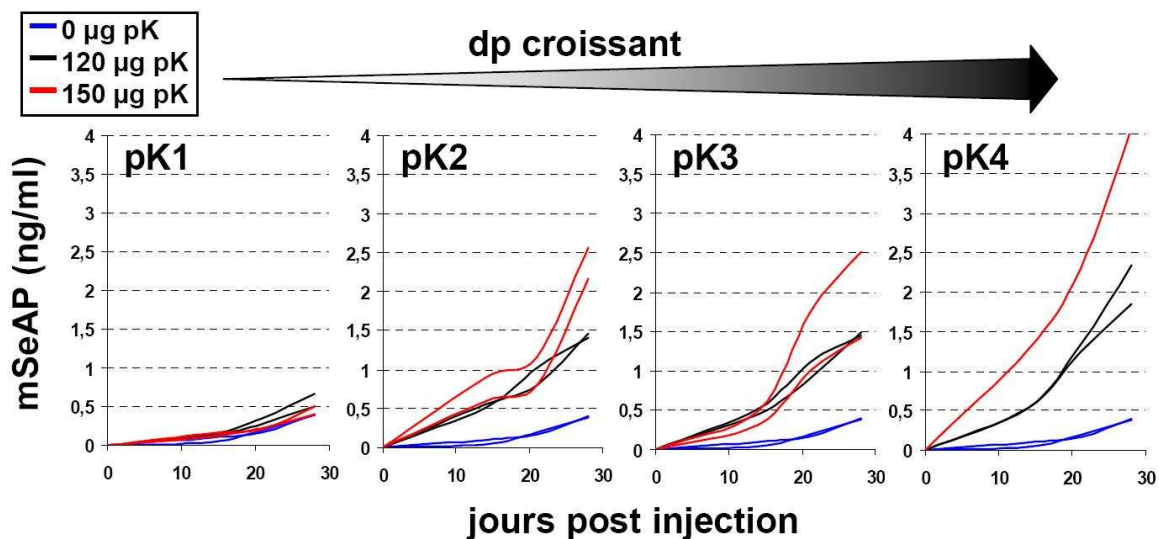
Suite à cette première expérience encourageante nous avons baissé la dose de vecteur injectée à  $1.10^{11}$  vg afin de reproduire et d'étudier en détail l'effet des pK sur un plus grand nombre



d'animaux. L'expérience utilisant  $1.10^{12}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP a montré un effet dose du polymère, nous avons donc cherché la dose de pK2 donnant un gain de sécrétion maximal lors d'une pré-injection 5 minutes avant l'administration de  $1.10^{11}$  vg de vecteur. La **figure 20** indique que cette dose optimale se situe autour de 150  $\mu$ g de pK2. Les doses inférieures à 150  $\mu$ g montrent une augmentation de la sécrétion de mSeAP, et au-delà il semble que l'effet soit moindre même si l'on observe toujours un gain de sécrétion. Cette expérience a été reproduite une seconde fois et montre également un pic de sécrétion à 150  $\mu$ g. Au passage la pré-injection de 150  $\mu$ g de pK2 5 minutes avant le vecteur a été comparée chez quelques souris à la pré-injection par voie intrapéritonéale (IP), ou encore à la co-injection de pK2 et du vecteur sans délai d'attente. Les courbes de sécrétion présentant des gains inférieurs, nous avons donc conservé par la suite le délai de 5 minutes et l'injection de pK par voie IV.

### c) Influence du degré de polymérisation de la pK

L'influence du degré de polymérisation des pK a ensuite été étudiée en pré-injectant des polymères de degré de polymérisation (dp) croissant 5 minutes avant l'injection de  $1.10^{11}$  vg de vecteur AAV2-CMV-mSeAP.

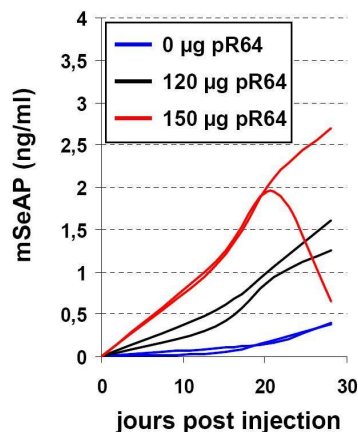


**Figure 21 – Influence du degré de polymérisation de la pK.**

Les souris sont pré-injectées avec 120 (courbes noires) ou 150  $\mu$ g de pK (courbes rouges). Les courbes bleues correspondent aux 2 souris contrôle ayant été injectées uniquement avec  $1.10^{11}$  vg de vecteur AAV2-CMV-mSeAP. Chaque groupe comprend 2 souris. Le graphique de la pK4 présente une seule courbe rouge car une des 2 souris injectées avec 150  $\mu$ g est morte. Les polymères pK1 à pK4 et leur dp sont décrits en détail dans le **tableau 2** vu précédemment.

La **figure 21** montre que la pK1 n'altère pas significativement la transduction comparé aux souris ayant été injectées avec l'AAV2 sans pré-traitement, alors que les pK de plus haut dp augmentent la sécrétion de mSeAP à tous les temps testés. Les gains de transduction semblent également corrélés au degré de polymérisation de la pK, les meilleurs résultats plasmatiques

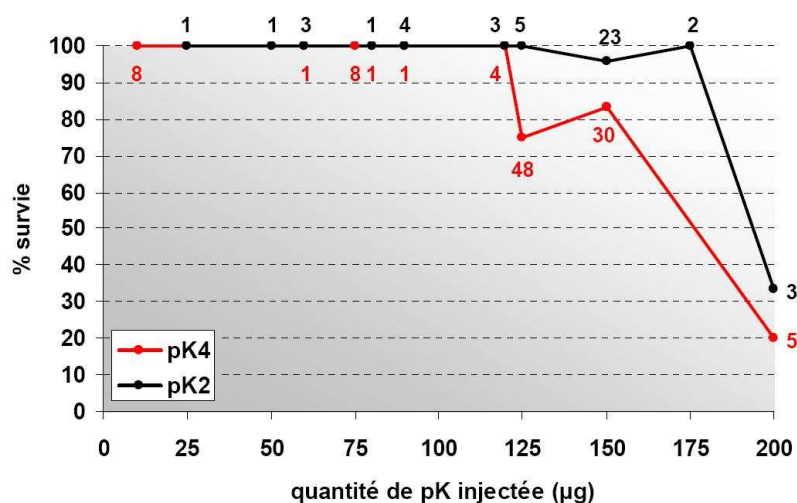
étant obtenus avec la pré-injection de pK4. Afin de vérifier si cette propriété est restreinte au polycation pK nous avons réalisé la même expérience avec la poly-L-arginine pR64. Le résultat présenté dans la **figure 22** ci-après indique que d'autres polycations sont également capables d'augmenter la transduction de l'AAV2.



**Figure 22 – Pré-injection de poly-L-arginine.**  
L'expérience a été effectuée dans les mêmes conditions et le même jour que l'expérience de la **figure 21**, en utilisant la même production de vecteur.

Lors des injections de pK nous avons noté une toxicité du produit, les souris étant relativement léthargiques dans l'heure suivant l'injection. Il est également arrivé à une faible fréquence que des doses à partir de 150 µg tuent la souris dans les heures ou la journée suivant l'administration de pK ; cela a notamment été le cas pour une des deux souris injectées avec 150 µg de pK4 dans l'expérience de la **figure 21**. Cette toxicité n'a pas fait l'objet d'une étude approfondie puisque les polymères que nous utilisons ne sont pas initialement synthétisés pour une utilisation *in vivo*. De plus nous avons trouvé que la dose optimale est proche de 150 µg. A ce stade nous avons donc décidé d'utiliser essentiellement la pK4 qui semble la plus efficace, et de limiter les doses de pK injectées à 150 µg ou moins.

Voici un graphique présentant la mortalité après l'injection de pK dans la **figure 23**. Ce graphique a été réalisé rétrospectivement à partir des données collectées dans tous les protocoles impliquant l'injection de pK.

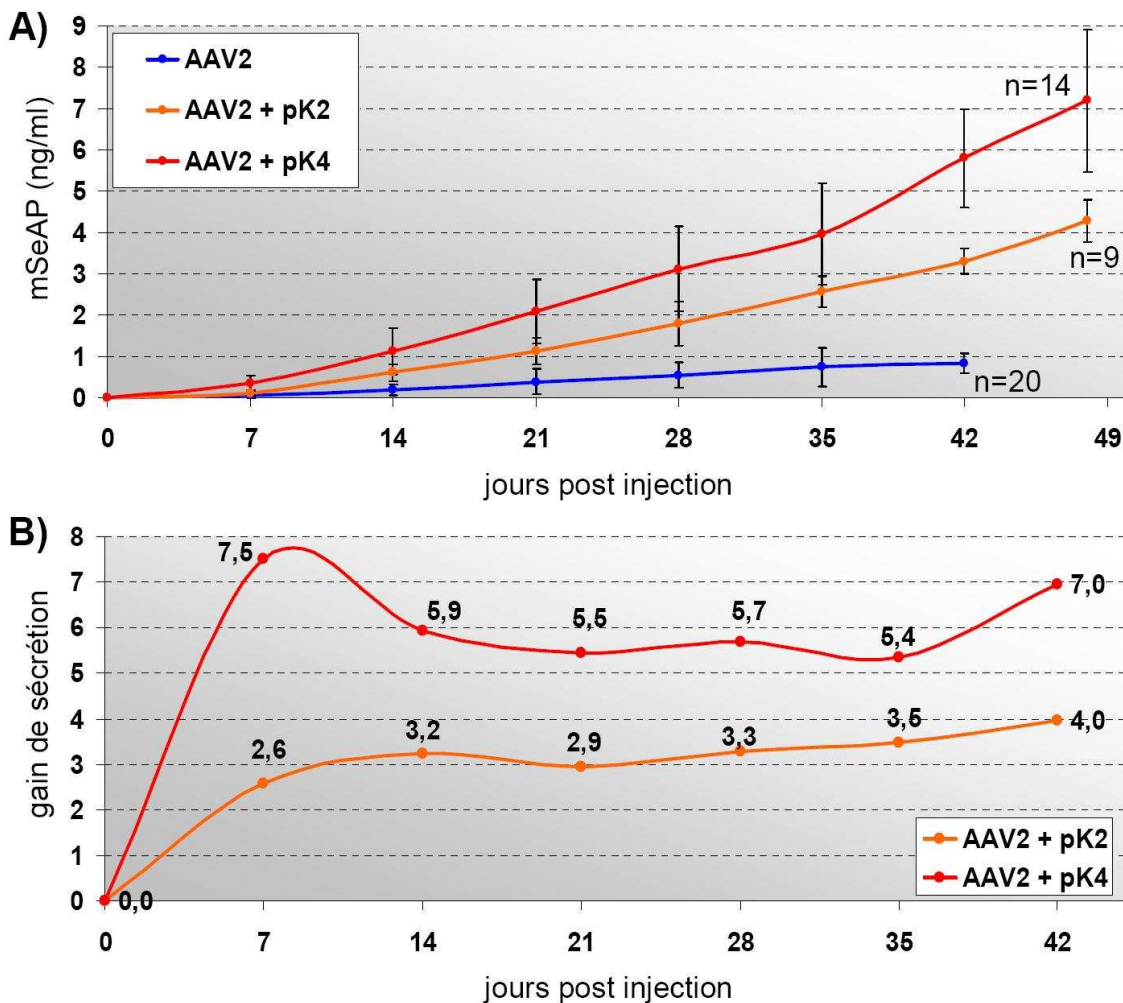


**Figure 23 – Toxicité des pK.**  
Ces données proviennent de l'ensemble des protocoles que nous avons réalisés comprenant une injection de pK. Les chiffres encadrant les courbes correspondent au nombre de souris injectées pour une dose donnée. Aucune mortalité n'a été observée avec la pK1, la pK3 ou la pR (qui n'ont cependant jamais été injectées à des doses dépassant 125 µg).

Comme nous pouvons le voir, le produit présente une mortalité nulle ou inférieure à 80 % en-dessous de la dose de 150 µg que nous utiliserons par la suite. La dose létale 50 semble se situer entre 175 et 200 µg, et la pK4 est plus toxique que la pK2.

**d) Comparaison de pK2 et pK4 et influence du temps entre l'injection de pK et de vecteur**

La **figure 24** suivante compare les pré-injections de pK2 et pK4.

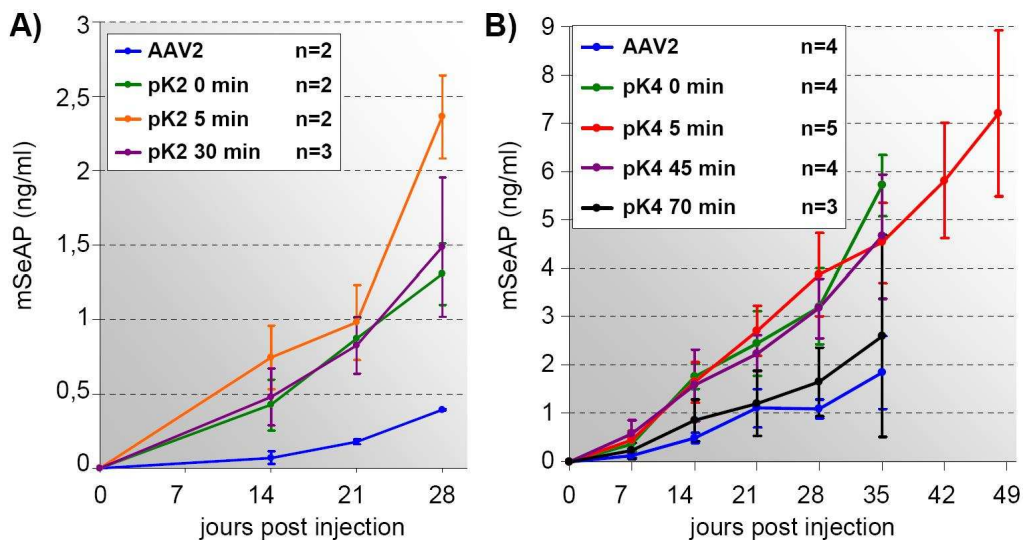


**Figure 24 – Comparaison de pK2 et pK4.**

Cette expérience consiste en la pré-injection de pK 5 minutes avant l'administration en IV de  $1.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP. La courbe bleue correspond aux souris contrôles injectées uniquement avec le vecteur, les courbes orange et rouge correspondent aux souris pré-injectées avec 150 µg de pK2 ou de pK4 respectivement. **A)** Dosage de la sécrétion de mSeAP dans le plasma de souris. Le nombre d'animaux ayant servi à établir ces courbes moyennes est précisé en bout de courbes. **B)** Ces 2 courbes rapportent le gain de sécrétion relatif à la courbe contrôle (bleue) obtenu au cours du temps dans la figure A). La valeur du facteur de gain correspondant est indiquée au-dessus de chaque point de la courbe.

Cette expérience confirme la tendance observée plus tôt lors de l'analyse de l'effet des degrés de polymérisation de la pK : le gain obtenu avec la pK2 est inférieur à celui de la pK4. En effet l'analyse précise des gains de sécrétion dans la **figure 24B** montre un gain moyen de sécrétion de mSeAP d'un facteur de l'ordre de 3-4 avec la pK2 et de l'ordre de 6-7 avec la pK4. L'aspect des courbes diffère également à J7 où il existe un pic dans le cas des souris pré-injectées avec la pK4, alors que le gain de sécrétion de la courbe pK2 croît linéairement avant d'atteindre un plateau. Cet effet pourrait provenir d'une inactivation du promoteur CMV dans un organe préférentiellement transduit en présence de pK de plus haut degré de polymérisation (pK4).

Cette expérience a été continuée au-delà des 4 semaines où nous effectuons habituellement les sacrifices, et nous constatons que la sécrétion de mSeAP dans le sang continue à monter graduellement (**fig. 24A**). Il est donc possible que les expressions que nous visualisons sur coupe histologique ou dans les broyats d'organes soient plus intenses après 4 semaines. Mais de manière pratique les modifications de la sécrétion sont visibles dès J14 et nous effectuons en général des expériences de 4 semaines pour cribler nos différents adjuvants. L'utilisation par la suite de la technique de PCR quantitative en temps réel (QPCR) nous permettra de suivre la transduction du vecteur à travers le dosage des génomes viraux dans l'ADN génomique extrait des tissus. L'infection du vecteur est connue pour se faire essentiellement dans les 4 heures suivant l'injection en IV [57]. Et la clairance de l'AAV dans le sang est rapide avec moins de 1 % des génomes viraux injectés dosable dans le sang après 48 heures [58]. La QPCR à 4 semaines donnera donc le profil de biodistribution quasi définitif du vecteur injecté.



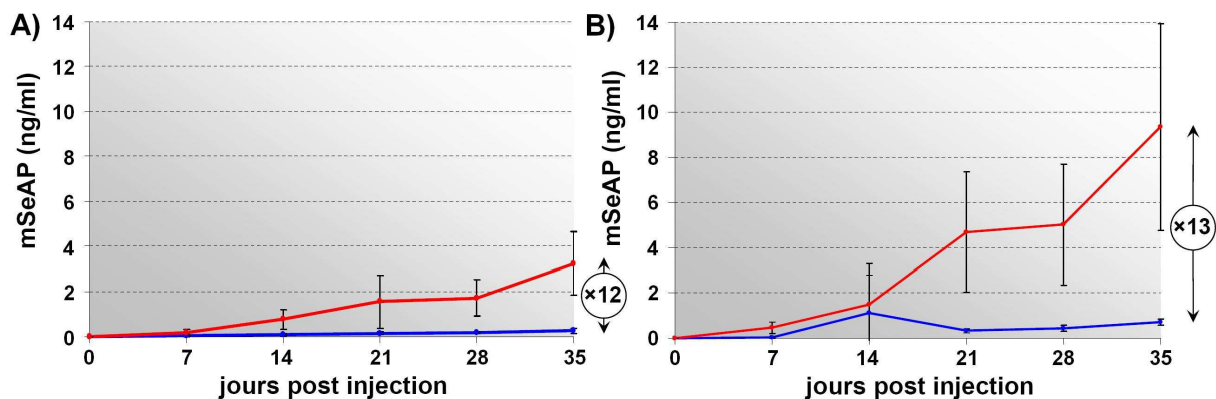
**Figure 25 – Impact du temps de pré-injection de pK2 et pK4.**

Ces deux expériences ont été réalisées indépendamment et consistent en la pré-injection de pK avant l'administration en IV de  $1.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP à différents temps. Les courbes bleues correspondent aux souris contrôle injectées uniquement avec le vecteur, les courbes orange et rouge correspondent aux souris pré-injectées avec la pK2 et la pK4 respectivement. Les autres courbes correspondent à des modifications du délai entre l'injection de pK et du vecteur comme précisé dans la légende des graphiques. **A)** Dans cette expérience les souris ont été pré-injectées avec 150 µg de pK2. **B)** Dans cette expérience les souris ont été pré-injectées avec 125 µg de pK4.

Suite à cette expérience nous avons voulu étudier l'impact du délai entre l'injection du polycation et du vecteur. L'analyse de différents temps de pré-injection dans les *figures 25A* et *B* indique une différence entre les polycations pK2 et pK4. Nous confirmons ici des tendances déjà observées lors d'expériences préliminaires avec la pK2 : la co-injection (indiqué 0 min dans la figure) et la pré-injection à un temps plus long de 30 minutes conduisent à un gain de sécrétion inférieur à la pré-injection de 5 minutes avant le vecteur (*fig. 25A*). En revanche, dans le cas de la pK4, la co-injection est aussi efficace que la pré-injection de 5 minutes. De plus, le gain de sécrétion baisse de manière significative quand le délai entre pK4 et vecteur dépasse une heure (70 minutes). La procédure de base de nos expériences avait été déterminée en utilisant la pK2. Ainsi même si nous avons montré ici que la pK4 est tout aussi efficace en co-injection, nous avons conservé la procédure de pré-injection de 5 minutes avec la pK4 et d'autres adjuvants dans la suite du projet par souci d'homogénéité et de comparaison avec nos données précédentes.

#### e) Influence de la dose de vecteur et du sexe sur l'effet de la pK4

Notre but est de modifier la biodistribution de l'AAV2 administré en systémique pour améliorer sa transduction musculaire, mais il serait également intéressant que cet effet de gain puisse permettre de réduire la dose de vecteur injectée. En effet, cela serait important du fait des quantités énormes de vecteur AAV envisagées pour le traitement systémique chez l'homme, ainsi que la difficulté à produire de tels lots. Nous avons donc comparé le gain obtenu avec la pK4 en utilisant deux doses de vecteur encadrant la dose de  $1.10^{11}$  vg que nous utilisons en routine.

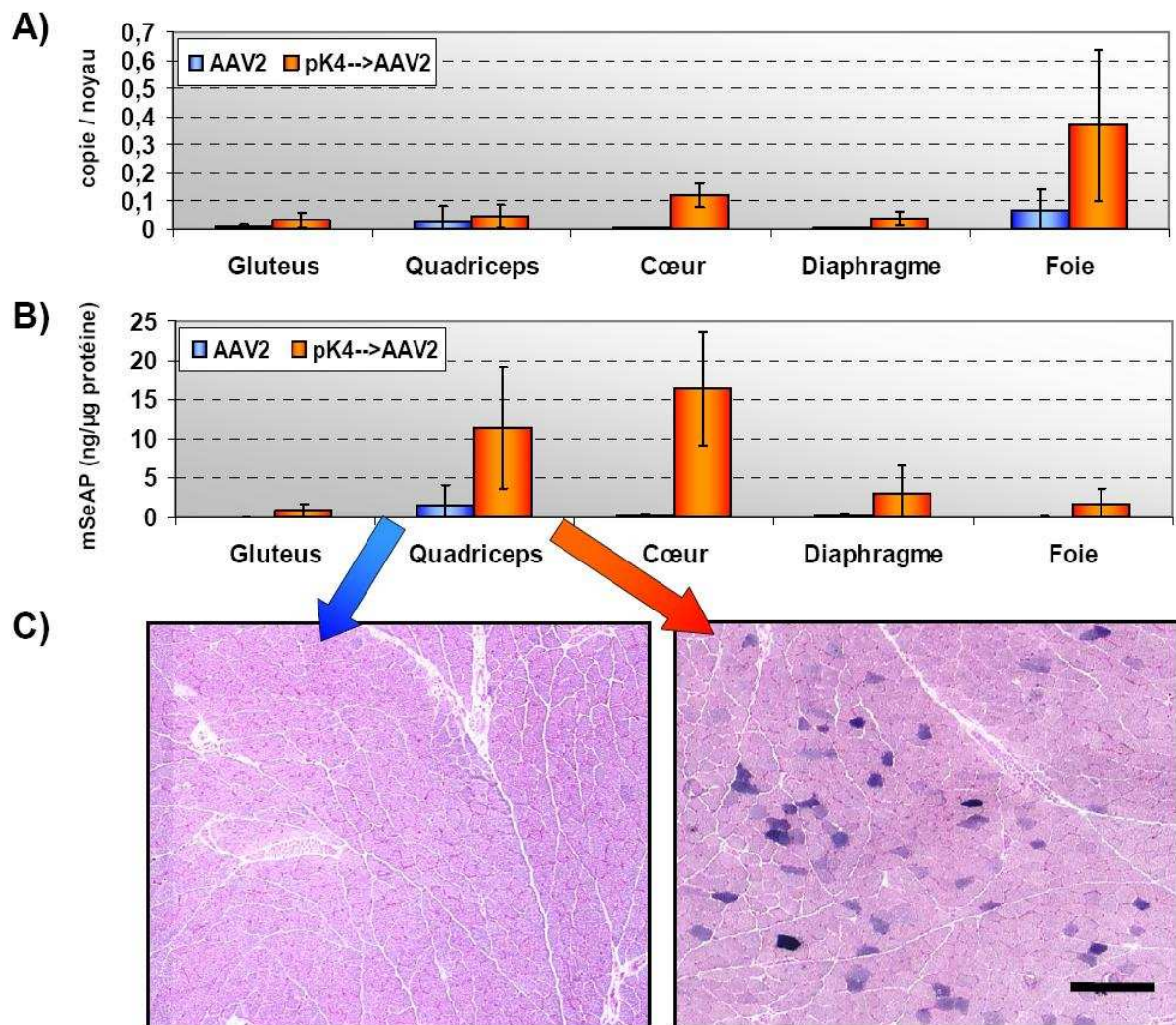


**Figure 26 – Influence de la dose d'AAV2 sur l'effet de l'adjuvant pK4.**

Les expériences **A**) et **B**) ont été réalisées en respectant les mêmes conditions de pré-injection : 150 µg de pK4 avant l'injection de  $2,5 \cdot 10^{10}$  ou  $4 \cdot 10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP respectivement. Les courbes rouges correspondent aux pré-injections de pK4 et les bleues aux contrôles injectés uniquement avec le vecteur. Dans l'expérience **A**) n=3 souris par groupe, et en **B**) n=4 souris dans le groupe contrôle AAV2, et n=2 souris dans le groupe pré-injecté avec la pK4.

La **figure 26** montre un gain de sécrétion équivalent d'un facteur 12 environ aux doses d'AAV2 de  $2,5 \cdot 10^{10}$  et  $4 \cdot 10^{11}$  vg. Si on prend en compte le gain obtenu précédemment avec  $1 \cdot 10^{11}$  vg qui est de l'ordre de 6, alors nous pouvons conclure qu'une dose donnée de pK4 (150  $\mu$ g) conduit à des gains de sécrétion de mSeAP équivalents (de 6 à 12 fois) indépendamment de la dose d'AAV2 (entre  $2,5 \cdot 10^{10}$  et  $4 \cdot 10^{11}$  vg).

L'injection de la dose supérieure de  $4 \cdot 10^{11}$  vg a été l'occasion d'analyser en détail la biodistribution et la transduction de l'AAV2 injecté avec ou sans adjuvant pK4. Nous avons donc suivi dans ces souris la transduction en mesurant l'expression de la mSeAP dans les tissus, ainsi que la biodistribution dans ces mêmes tissus par QPCR. L'expression de mSeAP a également été révélée sur les coupes histologiques de muscles des membres postérieurs.

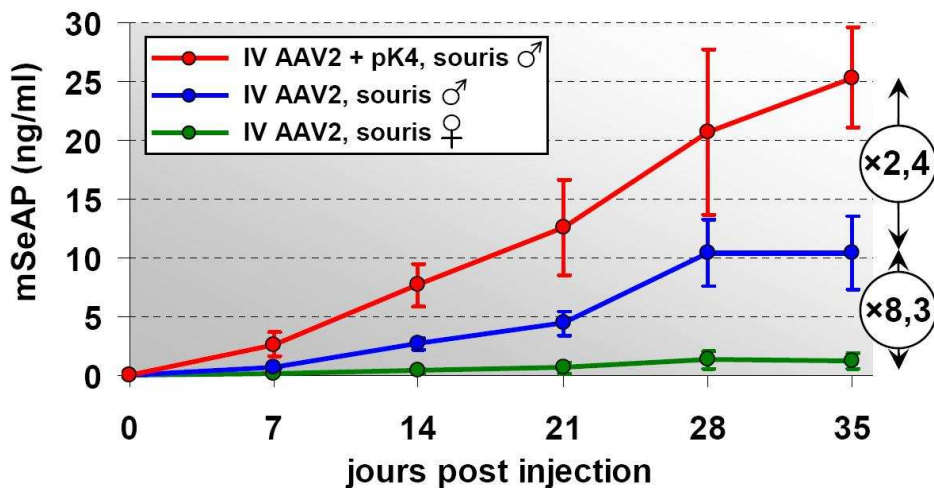


**Figure 27 – Analyse détaillée de la transduction et de la biodistribution.**

Ces résultats correspondent à l'analyse du protocole de pré-injection de 150  $\mu$ g de pK4 avant l'administration IV de  $4 \cdot 10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP (cf dosage plasmatique de la **figure 25 B**). La barre d'échelle représente 200  $\mu$ m. **A)** Dosage du nombre de copies de génomes viraux dans les organes par noyau diploïde dans divers muscles et dans le foie. **B)** Dosage de la protéine mSeAP dans ces mêmes organes. **C)** Champs microscopiques représentatifs du marquage de la mSeAP dans les coupes histologiques de quadriceps ; à gauche le quadriceps d'une souris contrôlée injectée uniquement avec l'AAV2, et à droite le quadriceps d'une souris pré-injectée avec 150  $\mu$ g de pK4.

Le dosage des génomes viraux (*fig. 27A*) montre une augmentation de l'infection dans tous les tissus analysés. Les différences les plus importantes sont trouvées par ordre croissant dans le foie, le diaphragme et le cœur, qui présentent respectivement des gains de facteur 5, 15 et 30, comparé aux niveaux dans les souris témoins. Pour vérifier qu'il y a bien une corrélation entre le nombre de génomes viraux et le niveau d'expression, nous avons dosé la mSeAP dans les lysats de ces organes. L'expression de la mSeAP montre une augmentation de la transduction corrélée à la quantité de génomes viraux présents dans les muscles (*fig. 27B*). Cette observation n'est pas retrouvée pour le foie : en effet dans cet organe l'expression de la protéine mSeAP ne reflète pas l'importante augmentation du nombre de génomes viraux consécutive à la pré-injection de pK4. Ce dernier point peut être expliqué par le fait que le promoteur CMV est sujet à une inactivation dans le foie au cours du temps [84, 86].

Afin de vérifier le profil de transduction des muscles il a également été prévu la coupe et le marquage du quadriceps et du gluteus avant leur analyse par QPCR, ainsi que le dosage de mSeAP *in situ*. La *figure 27C* montre des fibres positives pour la mSeAP en bleu foncé dans le quadriceps des souris pré-injectées avec la pK4, alors qu'aucun marquage n'est visible chez les souris contrôle injectées avec le vecteur seul. De manière moins prononcée l'apparition de fibres positives éparées dans le gluteus a également été notée chez les souris injectées par la pK4 (non montré), ce qui correspond relativement bien aux valeurs dosées *in situ* (*fig. 27B*). Cette expérience révèle également des gains importants dans le cœur et le diaphragme des souris traitées à la pK4, une attention particulière sera donc apportée à l'analyse histologique de ces muscles vitaux dans nos prochains protocoles.



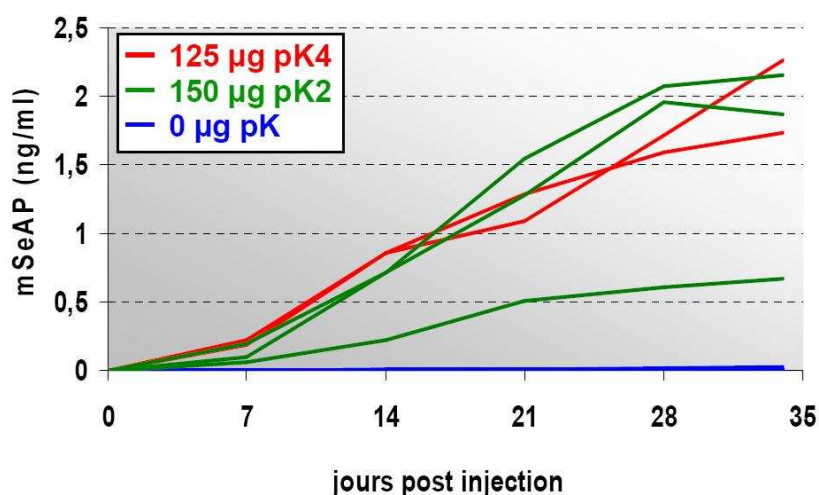
**Figure 28 – Transduction systémique de l'AAV2 en fonction du sexe et effet de la pK chez les souris mâles.**

Toutes les souris sont injectées en intraveineuse avec  $1.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP. La courbe rouge correspond à des mâles ayant reçu une pré-injection de 125 µg de pK4 5 minutes avant le vecteur (n=3). La courbe bleue et la courbe verte correspondent respectivement aux souris contrôle mâles (n=4) et femelles (n=3) injectées uniquement avec le vecteur. Les résultats sont présentés sous forme de courbes moyennes ± les écart types.

En plus de la dose de vecteur, un autre facteur endogène peut influencer sur la transduction systémique : le sexe. En effet, la persistance du génome viral extrachromosomal dans le foie est influencée par la testostérone, et une meilleure expression est constatée dans cet organe chez les souris mâles [66]. Nous avons donc vérifié l'influence du sexe sur le profil d'expression plasmatique de mSeAP suite à l'administration d'AAV2-CMV-mSeAP (*fig. 28*). L'injection d'une même dose de vecteur chez des souris Balb/c mâles ou femelles montre bien une meilleure expression chez les souris mâles (courbe bleue vs verte), avec une sécrétion de la mSeAP supérieure d'un facteur 8 à J35. On retrouve également un gain de sécrétion avec la pré-injection pK4 du même ordre que ce que nous obtenons chez des femelles avec la même dose de vecteur et de pK4 (cf *fig. 25B*).

#### f) Augmentation de la transduction musculaire de l'AAV2 avec l'adjuvant pK4

L'analyse de la cinétique d'expression de la mSeAP dans le sang est un protocole efficace de criblage d'adjuvants potentiellement modulateurs de la transduction de l'AAV administré en IV. L'utilisation du promoteur fort et ubiquitaire CMV nous permet ainsi d'observer la transduction de nombreux organes, et jusqu'à un certain point de nous affranchir au cours du temps de la sécrétion du foie qui capte une bonne partie du vecteur administré en IV. Afin de distinguer dans quelle mesure les profils de sécrétion sont dus à l'expression du transgène dans les muscles, nous avons utilisé un vecteur AAV2 codant la mSeAP sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique : le promoteur de la créatine kinase musculaire (AAV2-MCK-mSeAP). Le dosage plasmatique de la mSeAP chez des souris injectées avec l'AAV2-MCK-mSeAP avec ou sans pré-injection de pK4 est présenté dans la *figure 29*.

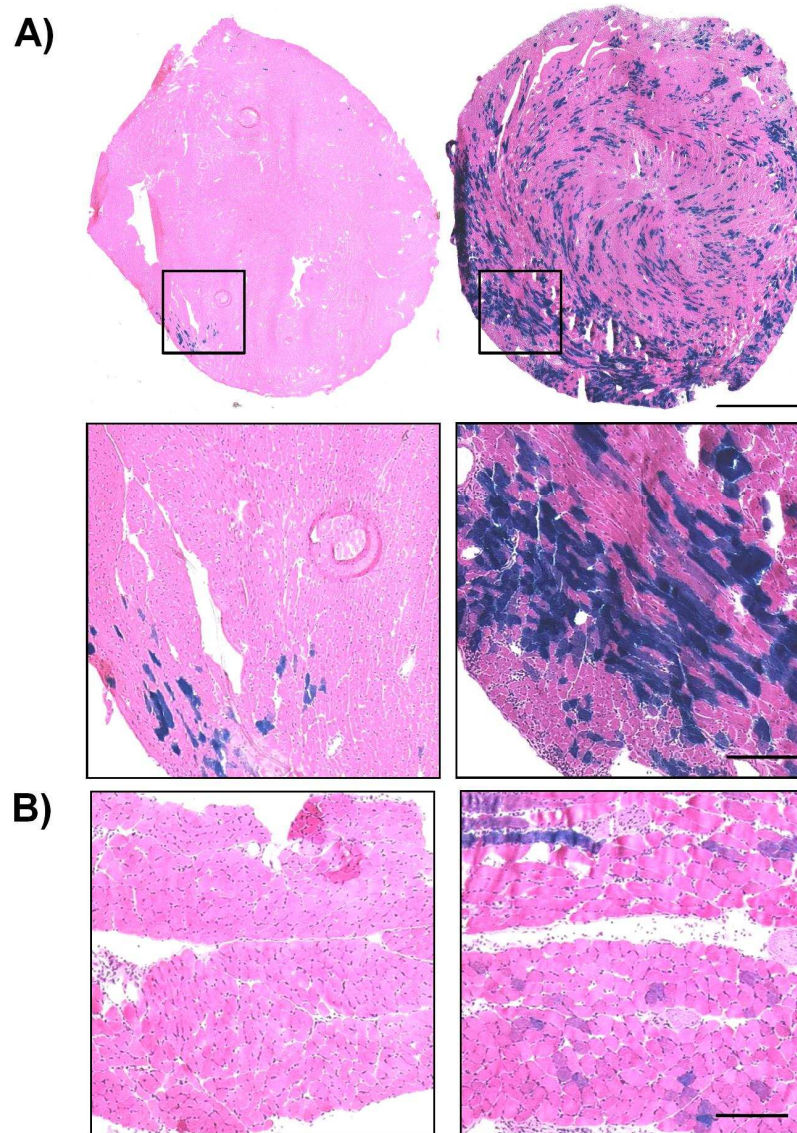


**Figure 29 – Sécrétion muscle-spécifique de mSeAP lors de l'injection d'AAV2 et d'adjuvant pK.** Chaque courbe représente une souris. Les souris contrôle 1 à 4 en bleu sont injectées avec  $1.10^{11}$  vg d'AAV2-MCK-mSeAP. Les souris 5 à 9 ont reçu une pré-injection de pK avant l'administration de  $1.10^{11}$  vg d'AAV2-MCK-mSeAP par IV. La pré-injection des souris 5 et 6 correspond à 125 µg de pK4 (courbes rouges), et dans le cas des souris 7 à 9 il s'agit de 150 µg de pK2 (courbes vertes).



Une des trois souris pré-injectées avec la pK2 (en vert) a répondu plus faiblement que les autres. En dehors de ce point le premier constat est la très faible sécrétion obtenue dans les souris contrôle avec le promoteur MCK. En effet, la concentration moyenne de mSeAP à J34 chez ces souris correspond à 11 pg/ml, alors que nous obtenons en moyenne 740 pg/ml à cette même dose de vecteur dans le cas du promoteur fort CMV. De plus, le gain de sécrétion plasmatique à J34 est ici de l'ordre de 160 à 190 fois avec la pK selon que l'on intègre ou non la souris ayant moins répondu ; alors que nous obtenons des facteurs de l'ordre de 3 à 5 en utilisant le même transgène sous le contrôle du promoteur CMV (cf **fig. 24**). Cela laisse penser que les gains de sécrétion observés dans nos expériences utilisant la pK et le promoteur CMV sont en grande partie dûs à une augmentation de la transduction musculaire. Il est difficile de comparer les 2 pK avec si peu d'animaux injectés, mais ici nous obtenons des profils de sécrétion similaires avec la pK2 et la pK4. Or nous avons observé que le gain de sécrétion est supérieur avec la pK4 comparé à la pK2 quand nous utilisons le promoteur CMV (cf **fig. 24**). Une hypothèse serait alors que la pK2 et la pK4 agissent de manière équivalente sur la transduction du muscle mais que la pK4 augmente en plus la transduction d'autres organes.

Concernant la transduction des muscles, nous avons remarqué précédemment des gains intéressants dans le cœur et le diaphragme suite au traitement pK4. Cependant, des données issues de la transfection de cellules *in vitro* indiquent que 90 % de la mSeAP est sécrétée, et que seuls 10 % sont trouvés dans les lysats cellulaires [87]. Afin d'augmenter la sensibilité du marquage, et pour ne pas passer à côté de cellules transduites exprimants faiblement le transgène, nous avons utilisé un AAV2 codant la  $\beta$ -galactosidase sous le contrôle du promoteur CMV (AAV2-CMV-LacZ). Les marquages histologiques réalisés sur le cœur et le diaphragme de souris pré-injectées avec la pK4 5 minutes avant l'injection de  $2.10^{11}$  vg de ce vecteur sont présentés dans la **figure 30** ci-après.

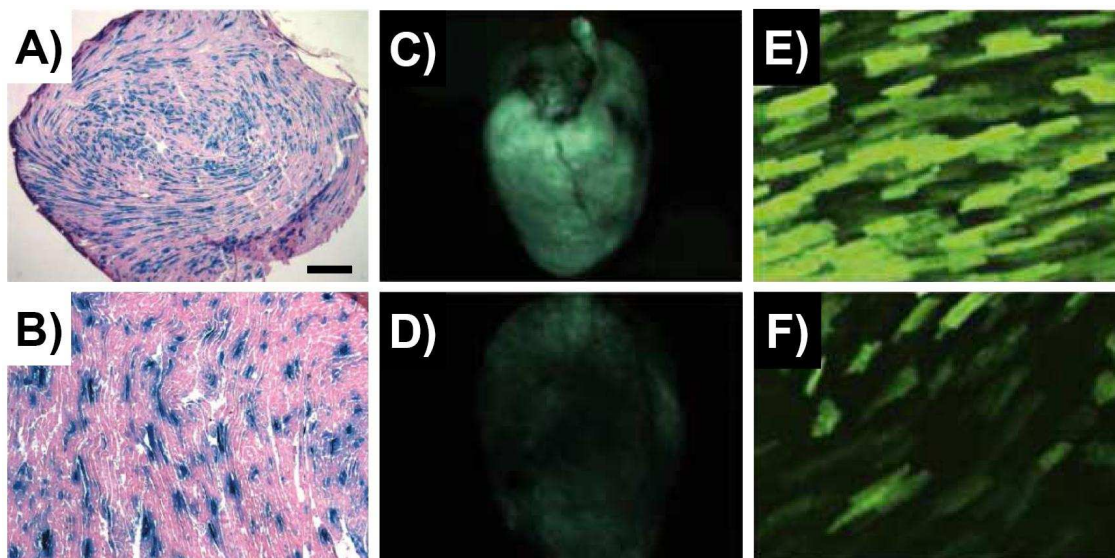


**Figure 30 – Transduction du cœur et du diaphragme de souris pré-injectées avec la pK4.**

Coupes transversales de cœurs et de diaphragmes prélevés 28 jours post injection (n=3 souris par groupe). La révélation de la  $\beta$ -galactosidase cytoplasmique produit une coloration bleue. Les photographies de gauche sont représentatives du groupe de souris injectées avec  $2.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-LacZ. Les photographies de droite correspondent aux souris pré-injectées avec 150  $\mu$ g de pK4 5 minutes avant l'administration IV de  $2.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-LacZ. **A)** Photographies de coupes transversales complètes de cœurs (barre d'échelle de 1 mm). Des agrandissements des zones encadrées sont présentés en-dessous (barre d'échelle de 200  $\mu$ m). **B)** Photographies des coupes transversales de diaphragmes des même souris.

Le cœur des souris contrôle ne présente aucun ou peu de cardiomyocytes transduits, alors que l'on observe un gain majeur de la transduction du myocarde avec la pré-injection de pK4 (**fig. 30A**). De plus, on observe l'apparition de fibres musculaires positives pour la  $\beta$ -galactosidase dans le diaphragme des souris traitées à la pK4, alors qu'aucun marquage n'est visible dans les souris contrôle injectées uniquement avec le vecteur (**fig. 30B**). Ce cardiotropisme conféré à l'AAV2 par la pK4 est particulièrement intéressant car ce sérotype injecté en IV transduit très peu le cœur. La **figure 31** présente à titre de comparaison des exemples de transduction

du cœur de souris obtenus par d'autres équipes en utilisant des doses d'AAV9 proches ou encadrant celle que nous utilisons ici avec l'AAV2 ( $2.10^{11}$  vg).



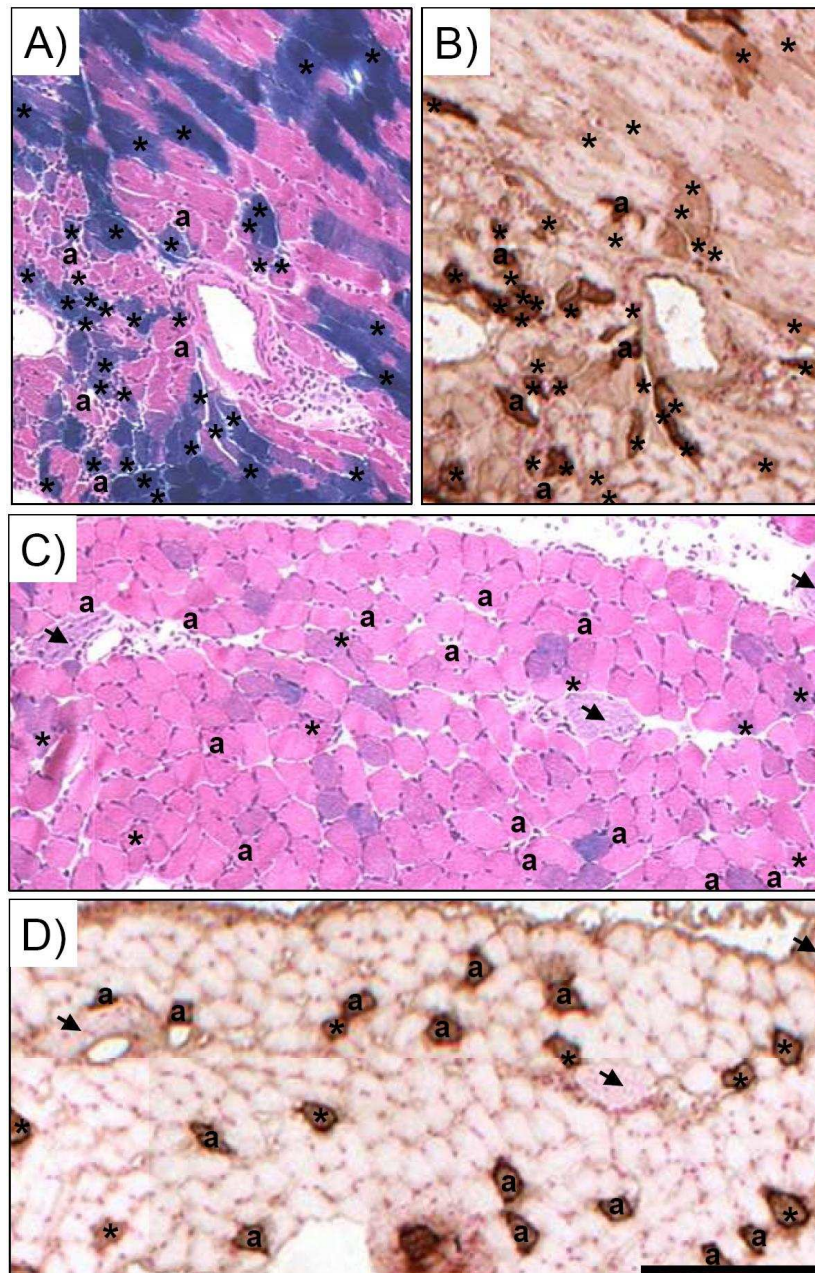
**Figure 31 – Cardiotropisme du vecteur AAV9.**

Transduction de cœurs de souris injectées avec des vecteurs AAV9 en IV à des doses proches ou encadrant de près la dose d'AAV2 que nous avons utilisée (soit  $2.10^{11}$  vg). **A)** Révélation de la  $\beta$ -galactosidase sur une coupe transversale de cœur (barre d'échelle de 200  $\mu$ m). Vecteur :  $3.10^{11}$  vg d'AAV9-CB-LacZ ; le promoteur **CB** est un promoteur chimérique contenant l'enhancer du promoteur **CMV** et le promoteur constitutif de la **Beta** actine du poulet (d'après Yang et coll. [88]). **B)** Révélation de la  $\beta$ -galactosidase sur coupe histologique de cœur. Cet agrandissement de coupe transversale correspond à une souris nouveau-né injectée avec  $1.10^{11}$  vg d'AAV9-CMV-LacZ. Les auteurs précisent que l'injection de cette même dose chez la souris adulte conduit à une transduction moindre du cœur du fait du rapport vecteur/masse plus faible (d'après Pacak et coll. [89]). **C)** et **D)** correspondent respectivement à l'injection de  $3.10^{11}$  et  $1.10^{11}$  vg d'AAV9-CMV-GFP. Les cœurs de souris entiers sont photographiés sous lumière UV (488 nm). **E)** et **F)** sont des révélations en fluorescence de la GFP des coupes transversales des cœurs présentés en **C)** et **D)** respectivement (d'après Vandendriessche et coll. [49]).

Il est intéressant de constater que nous obtenons des résultats très comparables au sérotype 9 avec notre approche. En effet, l'AAV9 possède un cardiotropisme très important chez la souris contrairement à l'AAV2. La transduction du cœur de souris par l'AAV9 est dose dépendante, et il est possible d'obtenir une expression dans la quasi intégralité des cardiomyocytes en injectant des doses supérieures à  $3.10^{11}$  vg (pour une illustration voir la **figure 11** page 14 de l'introduction).

Il apparaît dans nos dernières expériences que le gain de transduction musculaire est particulièrement prononcé dans les muscles « lents » comme par exemple le cœur et le diaphragme. Et nous postulons que les polycations pK agissent *in vivo* par le biais d'interactions électrostatiques avec les HSPG qui sont les récepteurs primaires de l'AAV2. Or il a été montré que les HSPG sont plus abondants dans les fibres lentes [79, 90]. Afin de vérifier notre hypothèse nous avons réalisé un immunomarquage des fibres lentes sur les

coupes histologiques du protocole utilisant  $2.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-LacZ. Les résultats pour le cœur et le diaphragme sont présentés dans la **figure 32**.



**Figure 32 – Colocalisation du marquage des fibres lentes et des fibres transduites par l'AAV2 suite en présence d'adjuvant pK4.**

Des coupes histologiques sériées ont été réalisées, puis les fibres lentes ont été marquées en utilisant un anticorps anti myosine I (marron). Ces mêmes champs microscopiques sont comparés au marquage de la  $\beta$ -galactosidase (bleue) sur une coupe distante de 8  $\mu\text{m}$ . **A)** et **C)** sont les marquages de la  $\beta$ -galactosidase dans le cœur et le diaphragme (champs microscopiques issus de la **figure 30**). **B)** et **D)** correspondent au marquage des fibres musculaires lentes sur les coupes adjacentes de **A)** et **C)** respectivement. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ . Les astérisques (\*) correspondent aux cellules positives pour la myosine I et pour la  $\beta$ -galactosidase ; les lettres (a) correspondent aux cellules  $\beta$ -galactosidase négatives marquées par la myosine I. Chaque caractère (\*) ou (a) est positionné sur la même cellule dans les coupes adjacentes.

Nous pouvons voir une colocalisation du marquage de la  $\beta$ -galactosidase et de la myosine I (fibre lente) – indiquée par des astérisques dans les champs **A**) et **C**) – dans de nombreuses cellules du cœur, mais également dans le diaphragme. Cependant toutes les cellules musculaires de type lent ne sont pas transduites par l'AAV2 comme l'indiquent les caractères (a) ; et un certain nombre de cellules positives pour la  $\beta$ -galactosidase ne sont pas positives pour la myosine I, ce qui par déduction indique la transduction de fibres rapides (cellules bleues sans astérisque). Il n'a pas été possible d'analyser la majorité des muscles des souris contrôle, car peu ou aucune fibre transduite n'est visible à cette dose de vecteur AAV2 injectée en IV. Ces marquages montrent donc que la pré-injection de pK4 conduit à la transduction de nombreuses cellules musculaires de type lent, mais également à la transduction de fibres rapides, alors que l'AAV2 seul transduit mal ce dernier type cellulaire. Nous proposons donc le mode de fonctionnement suivant pour la pK :

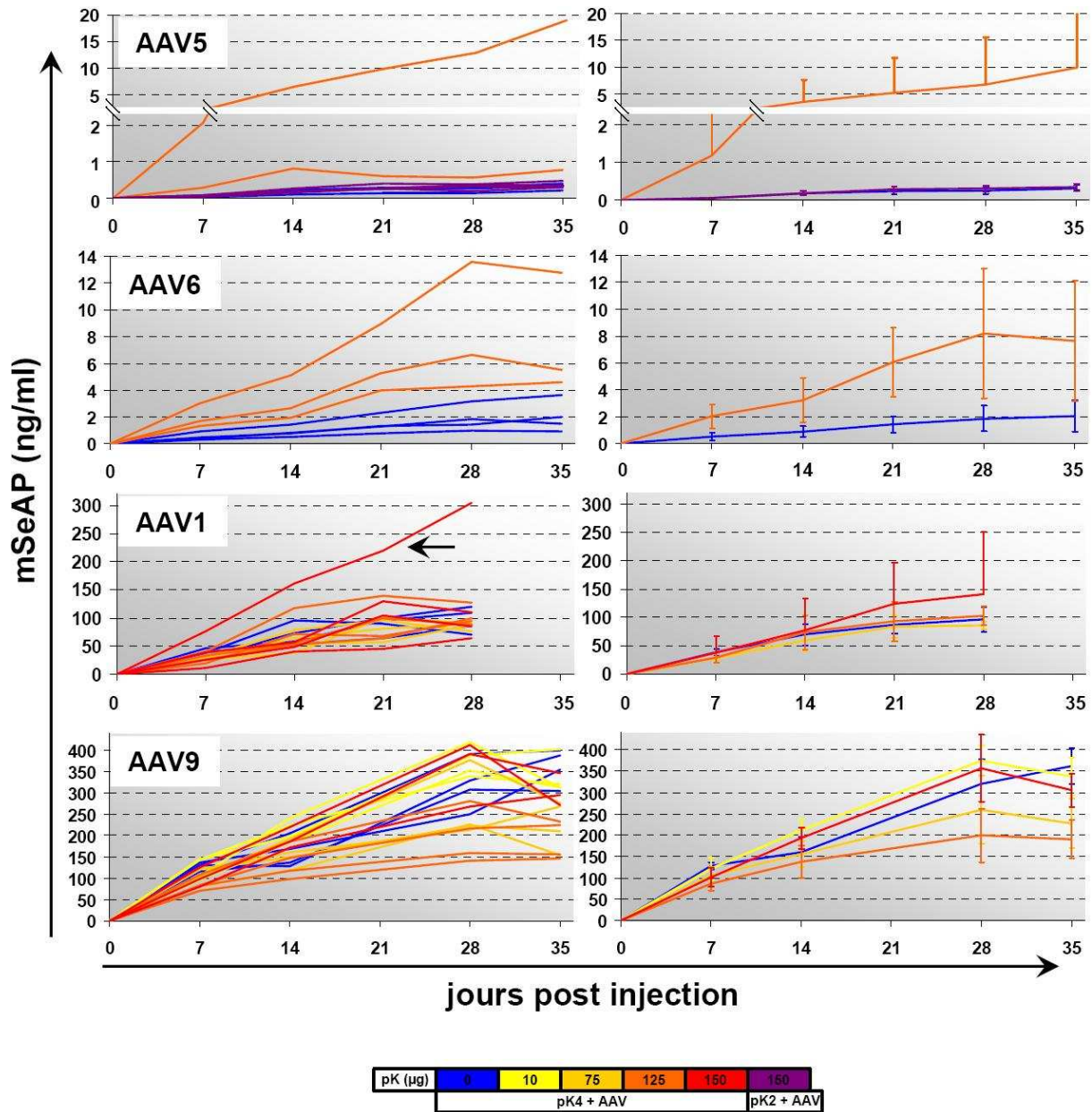
- La pK pré-injectée dans un délai court avant le vecteur AAV2 sature les HSPG des tissus dont la vascularisation laisse passer ce polymère.
- Le vecteur AAV2 injecté par voie vasculaire (IV) est capté au niveau de zones électronégatives de sa capsidie par la pK qui forme alors un « pont » entre le vecteur et les HSPG membranaires de la cellule cible. Les pK de degré de polymérisation supérieur sont aussi efficaces en co-injection, ce qui suggère qu'elles sont capables d'amorcer plus efficacement l'interaction avec le vecteur.
- Cet effet de « pontage » améliore l'association du vecteur aux HSPG. L'internalisation du vecteur dans les cellules se produit alors par liaison aux co-récepteurs du virus ou encore par une voie alternative si l'encombrement stérique de la pK empêche ces interactions.

Nous proposons ainsi que la pK change la biodistribution du vecteur AAV2 en le concentrant vers les zones riches en HSPG via un effet que nous qualifions de « pontage ». La pK potentialise ainsi le tropisme préférentiel de l'AAV2 vers les fibres musculaires lentes, mais permet également la transduction de fibres rapides.

### **g) Effet de la pré-injection de pK sur d'autres sérotypes AAV**

Le rationnel de notre stratégie de pré-injection de polymère cationique repose sur la connaissance du vecteur AAV2 et de son récepteur primaire. D'autres sérotypes AAV – dont l'ensemble des récepteurs et co-récepteurs n'est pas connu – pourraient également bénéficier de cette approche. Nous avons donc testé l'approche pK4 sur les sérotypes 1, 5, 6 et 9 afin de valider notre hypothèse, mais également dans l'espoir d'observer un gain de transduction systémique.

Pour ces expériences nous avons fixé la dose de vecteur injectée en IV à  $2 \cdot 10^{11}$  vg quand la concentration de la production de vecteur le permettait.

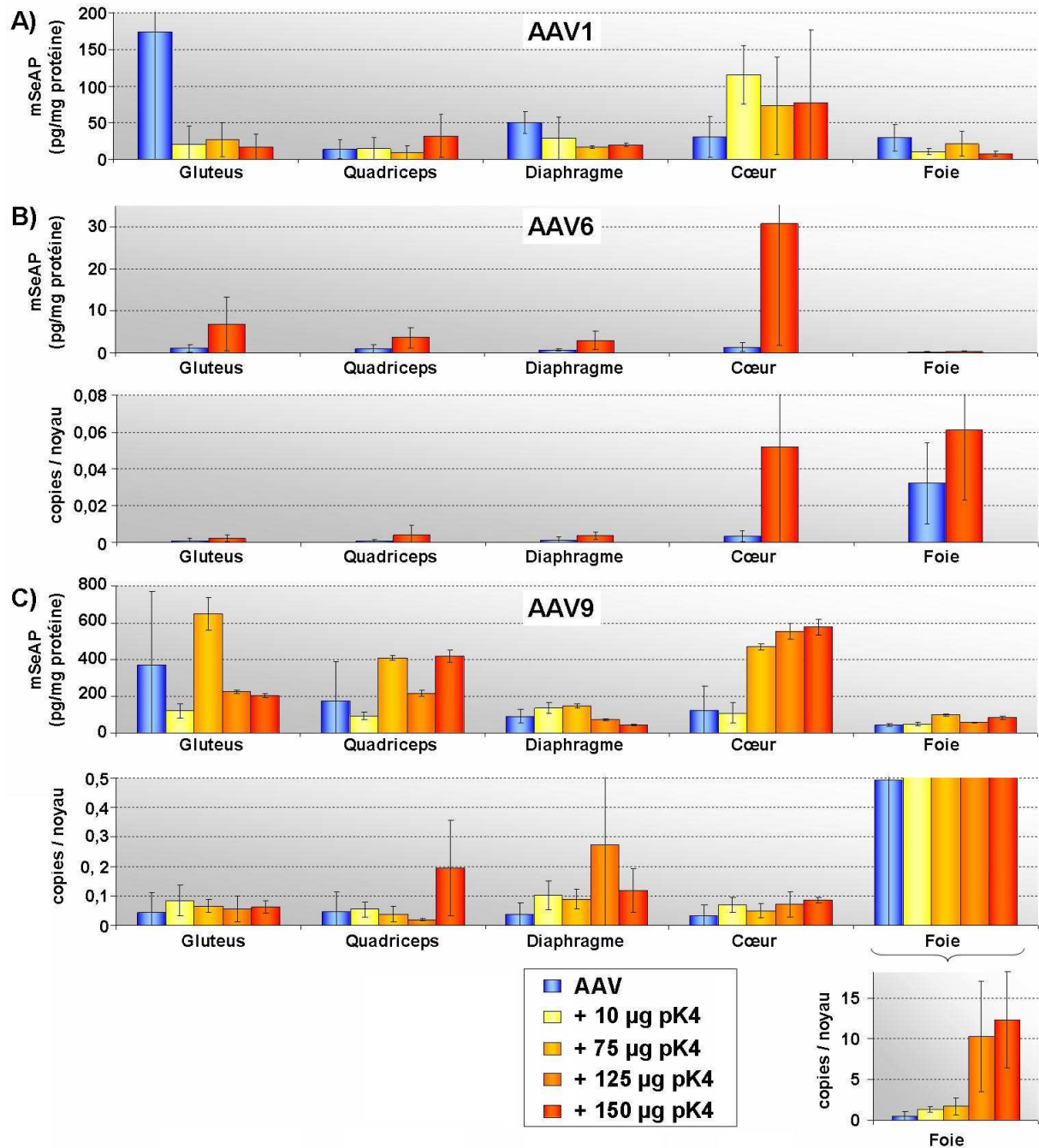


**Figure 33 – Effet de la pré-injection de pK sur différents sérotypes AAV.**

Pré-injection de pK 5 minutes avant l’injection IV de vecteurs AAV1-, AAV5-, AAV6- ou AAV9-CMV-mSeAP. Les souris injectées uniquement avec le vecteur sont en bleu, les courbes jaune à rouge correspondent à des doses croissantes de pK4 (cf légende). Les courbes violettes correspondent à 150 µg de pK2. Les graphiques de la colonne de gauche présentent l’intégralité des courbes obtenues, où chaque courbe est une souris. Les graphiques de la colonne de droite sont les courbes moyennes des graphiques situés immédiatement à gauche. A l’exception de l’AAV5 qui est injecté à la dose de  $9.10^{10}$  vg, tous les vecteurs sont injectés à la dose  $2.10^{11}$  vg.

Les graphiques de la **figure 33** présentent les différents sérotypes classés de haut en bas par efficacité de transduction lors de l’injection IV : AAV5<AAV6<AAV1<AAV9 (se référer aux courbes bleues du vecteur injecté seul). La concentration du lot de vecteur AAV5-CMV-mSeAP n’a permis d’injecter que 10 souris à la dose de  $9.10^{10}$  vg. Dans ce cas les souris ont été pré-injectées avec de la pK2 ou de la pK4. Les souris pré-injectées avec la pK2 ont des courbes de sécrétion superposables aux souris AAV5 contrôle. Cependant, comme pour

l'AAV2, on retrouve un gain de sécrétion avec la pK4, une des deux souris injectées présente d'ailleurs un gain de facteur 60 à J35. Un gain de sécrétion est également observé avec l'IV de  $2.10^{11}$  vg d'AAV6-CMV-mSeaAP dans le cas d'une pré-injection de 125 µg de pK4 ( $\times 3,8$  à J35). En revanche aucun gain de sécrétion de la mSeaAP n'est observé avec différentes doses de pK4 avec l'AAV1 ou l'AAV9. Seule une des 4 souris pré-injectée avec 150 µg de pK4 présente un gain significatif de sécrétion dans le cas de l'AAV1 (courbe flechée). Dans le cas de l'AAV9, même si aucun gain significatif de sécrétion n'est obtenu, nous observons tout de même une modification de la transduction avec la pré-injection de pK4. En effet, les courbes des souris pré-injectées avec la pK4 présentent toutes un aspect en cloche avec une stabilisation ou décroissance finale qui n'est pas observée dans le cas des souris contrôle. Comme nous l'avons abordé plus tôt lors des expériences utilisant l'AAV2, il est possible que cela rende compte d'une inactivation du promoteur CMV dans le foie, auquel cas la pK4 favoriserait la transduction du foie par l'AAV9. Les sérotypes 1, 6 et 9 ont été analysés plus en détail en dosant les niveaux de mSeaAP dans les organes ainsi qu'en évaluant la biodistribution par QPCR (le sérotype 5 n'a pas été analysé davantage par manque de temps).



**Figure 34 – Analyse détaillée de la biodistribution des vecteurs AAV1, 6 et 9 ± pK4.**

Dosage de la mSeAP dans divers organes des souris des expériences présentées dans la **figure 33**. **A)** Expérience utilisant l'AAV1-CMV-mSeAP. Les dosages correspondent à l'analyse de 2 souris par groupe. **B)** AAV6-CMV-mSeAP : les 3 souris pré-injectées avec la pK4 ainsi que les 4 souris contrôle sont analysées. Le graphique du dessous correspond au dosage par QPCR du nombre de génomes viraux par génome diploïde dans ces mêmes échantillons. **C)** AAV9-CMV-mSeAP : la totalité des souris injectées est analysée soit n=3-4 par groupe (sauf AAV1 : n=2). Le graphique du haut correspond au dosage de la mSeAP dans les broyats ; l'histogramme du milieu présente le dosage des génomes viraux par QPCR. Enfin, l'encart du bas est une présentation des génomes viraux dosés dans le foie à une échelle adaptée.



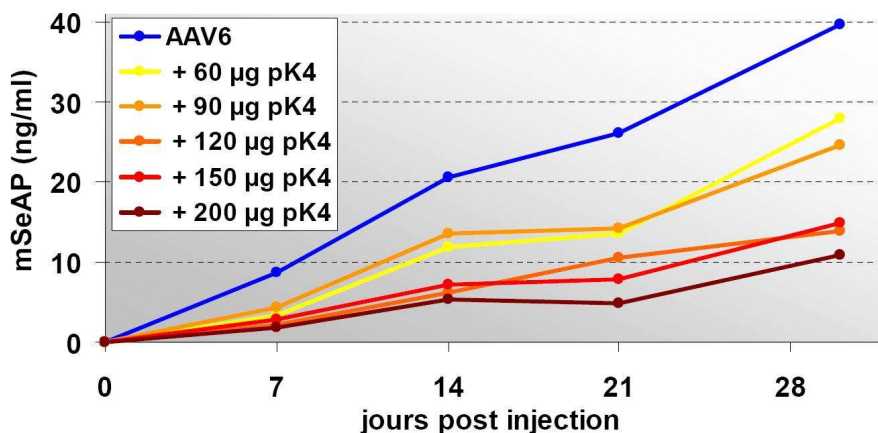
La **figure 34A** présente le dosage de la protéine transgénique dans les broyats du foie et de divers muscles (la souris AAV1 fléchée n'est pas incluse dans cette analyse). Comme attendu il n'y a pas de différence significative entre les souris pré-injectées avec la pK4 et les souris contrôle. Ceci confirme les données de sécrétion plasmatique présentant des courbes moyennes superposées (**fig. 33**). Notons que le niveau moyen élevé de mSeAP dans le gluteus des souris contrôle AAV1 est dû à une forte expression dans l'une des deux souris analysées, l'autre souris présentant un niveau équivalent aux souris pré-injectées avec la pK4. Aucune différence n'est visible chez les souris injectées par l'AAV1 et l'adjuvant pK4, l'analyse de la biodistribution par QPCR n'a pas donc pas été réalisée sur l'ensemble des souris injectées. Mais nous avons tout de même réalisé la QPCR sur la souris « fléchée » dans la **figure 33** et sur deux souris contrôle. Il apparaît que la sécrétion supérieure de mSeAP chez la souris « fléchée » est surtout due au foie qui est mieux transduit, ainsi qu'à un très léger gain de transduction dans les muscles des pattes arrières (quadriceps et gluteus), aucune différence n'étant visible dans le dosage des génomes viraux du cœur et du diaphragme (résultats non montrés). L'événement de transduction plus intense observé dans le protocole utilisant l'AAV1 correspond donc à une variation inter-individuelle qui ne semble pas liée à l'adjuvant pK4.

L'analyse des souris du protocole utilisant l'AAV6 (**fig. 34B**) montre un gain de transduction dans tous les muscles prélevés, ainsi que dans le foie. Le cœur présente également un gain d'expression important avec la pré-injection de pK4 ( $\times 30$  statistiquement significatif). L'analyse par QPCR montre que le foie est l'organe le mieux transduit, cependant l'expression de mSeAP à J35 n'est pas corrélée et est inférieure à celle que nous trouvons dans les muscles. Si l'on considère l'ensemble des données, le profil de réponse de l'AAV6 à la pré-injection de pK4 ressemble fortement à ce que nous obtenons avec l'AAV2.

Enfin la **figure 34C** montre que la pré-injection de pK4 augmente la transduction du cœur et du foie par l'AAV9 de manière dose dépendante. Pour le cœur il s'agit d'une augmentation d'un facteur 2,7 statistiquement significative. Mais l'effet majeur concerne surtout le foie où le gain en terme de copies de génomes viraux atteint un facteur 25 à la plus forte dose de pK4 (150  $\mu$ g). Encore une fois on constate une différence entre le faible niveau d'expression dans le foie et la forte transduction visible par QPCR. Cet effet étant sérotype indépendant, il est donc dû essentiellement à l'inactivation du promoteur CMV ; et dans le cas du protocole AAV9, où le foie est le principal organe transduit, cela explique l'aspect en cloche des courbes plasmatiques de souris pré-injectées avec la pK4.

Le vecteur AAV6 en présence de pK4 montre un profil de biodistribution et d'expression proche de ce que l'on trouve dans le cas de l'AAV2 alors que son récepteur primaire n'est pas l'HSPG. Nous avons donc cherché à savoir si l'effet de la pK4 sur l'AAV6 est conservé à une plus forte dose de vecteur comme nous l'avons observé avec l'AAV2. La **figure 35** montre que l'effet est inexistant quand on injecte 5 fois plus de vecteur AAV6 ( $1.10^{12}$  vg). Le fait d'augmenter le rapport vecteur/pK4 conduit même à une inhibition de la transduction systémique. Comme la quantité de pK est du même ordre de grandeur (autour de 150  $\mu$ g), cela

suggère que les gains observés avec  $2.10^{11}$  vg sont liés à un effet sur le vecteur plus qu'à une saturation des cellules cibles.



**Figure 35 – Effet de la pK4 sur une dose supérieure d'AAV6.**

Concentration plasmatique de mSeAP chez des souris pré-injectées avec diverses quantités de pK4 puis 5 minutes après avec  $1.10^{12}$  vg d'AAV6-CMV-mSeAP en IV.

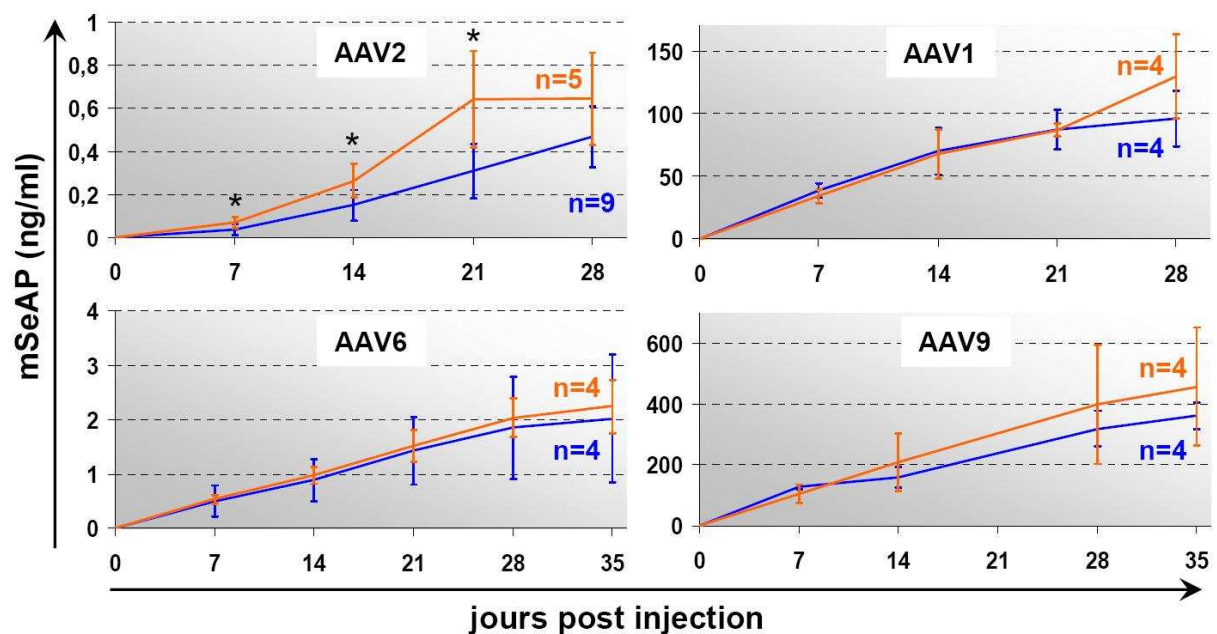
En conclusion la pK4 est capable d'améliorer la transduction systémique par l'AAV2, mais cet effet est inexistant avec d'autres sérotypes tels que l'AAV1. En revanche, il est possible de changer la biodistribution des sérotypes 5 et 6. Et dans le cas de l'AAV6 au ratio  $2.10^{11}$  vg/150 µg pK4, le profil de biodistribution et d'expression est proche de ce que l'on trouve pour l'AAV2. Enfin, la pré-injection de pK4 permet d'améliorer sensiblement la transduction du cœur par l'AAV9, mais il améliore surtout fortement son tropisme hépatique.

### 1.3. Polymères anioniques

#### a) Acide polyinosinique

L'étude de vecteurs dérivés de virus non enveloppés administrés par intraveineuse a montré l'impact des organes « filtres » sur leur biodistribution systémique. Il apparaît par exemple que la majorité du vecteur adénoviral (Ad) est captée par le foie, majoritairement à travers la transduction des hépatocytes, mais également du fait de sa phagocytose par les macrophages résidants du foie : les cellules de Küpffer qui correspondent à 30 % des cellules du foie. Haisma et coll. ont ainsi récemment montré qu'il est possible d'augmenter le temps de circulation de l'adénovirus en inhibant sa capture par les cellules de Küpffer au moyen d'un traitement à l'acide polyinosinique [91]. L'acide polyinosinique (pI) – un homopolymère simple brin de ribonucléotide inosine (chargé négativement) – se lie aux récepteurs scavenger présents à la surface des cellules de Küpffer. La nature exacte de la liaison entre l'adénovirus et ces récepteurs scavenger est inconnue. Les récepteurs scavenger possèdent un large spectre de ligands et ils participent à l'élimination de différents pathogènes et molécules notamment via la reconnaissance de leur charge négative, d'où leur nom « d'éboueurs » (scavenger).

Le vecteur AAV possède un fort tropisme hépatique, et il a été montré *in vivo* grâce à la destruction des cellules de Kupffer par le chlorure de gadolinium, que ces cellules participent peu à la transduction globale du foie par l'AAV [92]. Cependant, la proportion exacte des cellules de Kupffer captant l'AAV injecté reste inconnue. Nous avons donc mis en place une stratégie d'inhibition des récepteurs scavenger par le polyanion pI pour étudier dans quelle mesure ces récepteurs contribuent à la capture de l'AAV par les cellules de Kupffer, et si tel est le cas, si cela peut impacter la biodistribution systémique du vecteur. Les récepteurs scavenger étant présents à la surface des macrophages, mais également sur d'autres cellules présentatrices d'antigènes comme les cellules dendritiques, nous avons également voulu évaluer l'impact de cette inhibition sur la mise en place de la réponse humorale contre le vecteur AAV.

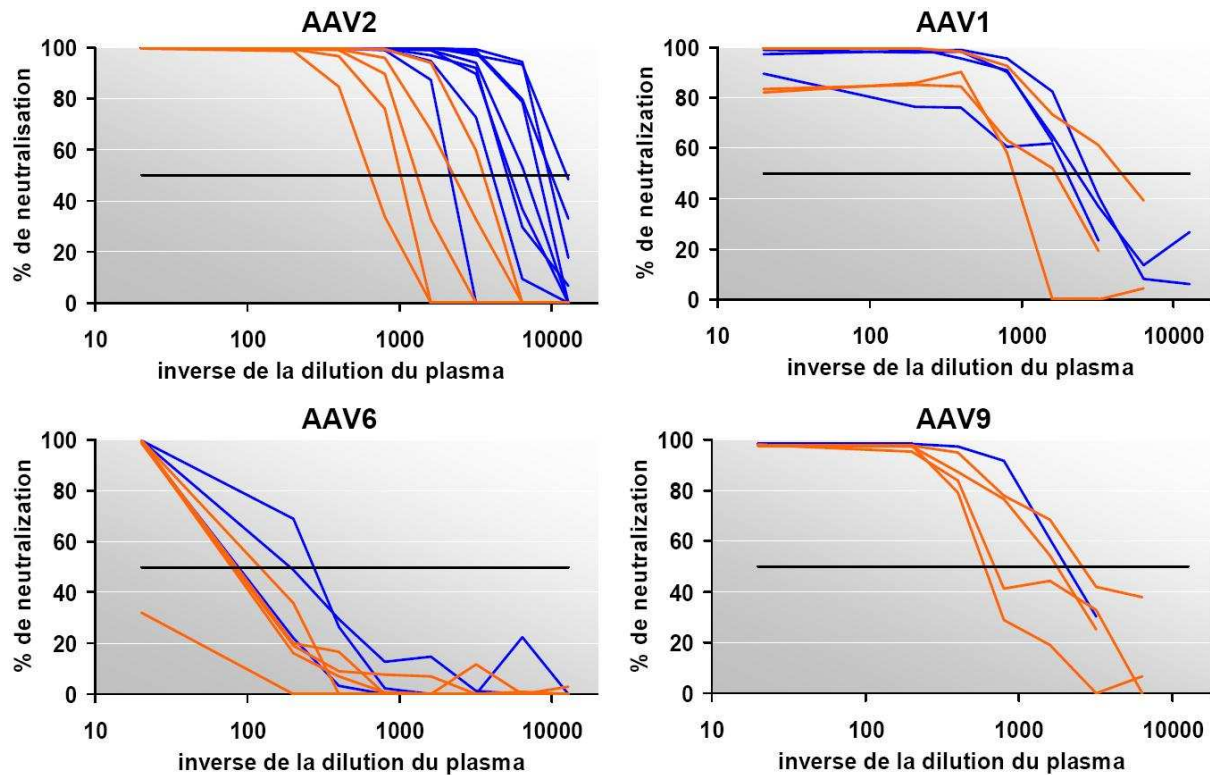


**Figure 36 – Impact d'une pré-injection de pI sur la transduction systémique de différents sérotypes AAV.**

Pré-injection de pI 5 minutes avant l'injection IV de vecteurs AAV1-, AAV2-, AAV6- ou AAV9-CMV-mSeAP. Les souris injectées uniquement avec le vecteur sont en bleu, les courbes orange correspondent à la pré-injection de 200 µg de pI. A l'exception de l'AAV2 qui est injecté à la dose de  $1.10^{11}$  vg, tous les vecteurs sont injectés à la dose  $2.10^{11}$  vg. Les courbes présentées sont des moyennes, le nombre de souris injectées par groupe est précisé au bout des courbes correspondantes (n=). Un astérisque (\*) est indiqué quand la moyenne des souris pré-injectées par la pI est significativement différente de la moyenne des souris contrôle ( $p < 0,05$ ).

La **figure 36** présente l'impact d'une pré-injection de pI 5 minutes avant l'administration de vecteur AAV en IV. Parmi tous les sérotypes testés, seul l'AAV2 présente une différence statistiquement significative de la sécrétion de mSeAP après le traitement au pI comparé au vecteur injecté seul. Le gain obtenu est de l'ordre du facteur 2, ce qui est assez faible. Mais cette variation implique tout de même que l'AAV2 est en partie capté par des cellules présentatrices d'antigènes, comprenant ou non les cellules de Kupffer, via les récepteurs

scavenger. Et l'inhibition de ces récepteurs par le pI rend donc cette fraction du vecteur disponible pour la transduction d'autres cibles.

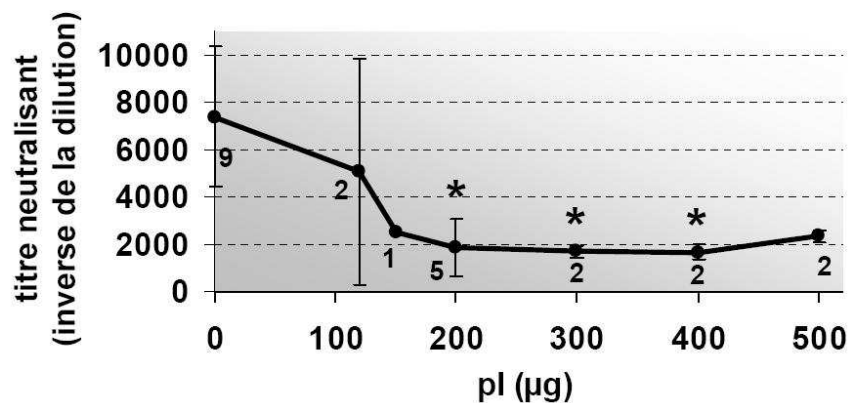


**Figure 37 – Formation d’anticorps neutralisants suite à la pré-injection de pI et d’AAV.**

Les anticorps neutralisants présents à J28 dans les plasmas des expériences de pré-injection de pI ont été titrés. Pour cela une dilution sériée des plasmas est incubée avec un AAV de sérotype correspondant codant la luciférase. La transduction résiduelle de cellules Hela obtenue est mesurée et le résultat est présenté en terme de pourcentage de neutralisation relativement à un contrôle sans plasma (100 %). Chaque courbe correspond au plasma J28 d’une souris. Les courbes orange correspondent aux souris pré-injectées avec 200 µg de pI, et les courbes bleues correspondent aux souris contrôle injectées uniquement avec l’AAV-CMV-mSeAP de sérotype indiqué. La dilution de plasma nécessaire pour neutraliser la moitié du vecteur, correspondant au titre en anticorps neutralisant, peut être déterminée à l’intersection de la droite noire (50 % de neutralisation) et de la courbe du plasma analysé.

Dans un second temps, nous avons utilisé les plasmas collectés durant cette expérience pour mesurer l’impact de l’inhibition des récepteurs scavenger sur la formation de la réponse humorale contre l’AAV. Plus précisément, nous avons déterminé les titres d’anticorps neutralisants formés contre la capsid du vecteur. La *figure 37* montre que le traitement au pI permet d’abaisser la quantité d’anticorps neutralisants formés suite à cette « vaccination » par l’AAV en voie IV. En effet, nous voyons qu’il est nécessaire de diluer davantage le plasma des souris contrôle (en bleu, dilution moyenne de  $1/7363 \pm 45\%$ ) comparé aux souris traitées au pI (en orange, dilution moyenne de  $1/1845 \pm 66\%$ ), pour neutraliser la moitié de la transduction de l’AAV2.

La dose d'AAV2 utilisée dans cette expérience est de  $1.10^{11}$  vg. Mais nous considérons que ces résultats peuvent être comparés aux autres sérotypes injectés à  $2.10^{11}$  vg dans la mesure où aucune différence significative du titre neutralisant n'a été trouvée entre les plasmas de ces souris injectées avec  $1.10^{11}$  vg d'AAV2 ( $1/7363 \pm 45 \%$ ), et les plasmas provenant de l'expérience utilisant  $4.10^{11}$  vg d'AAV2 que nous avons abordée plus tôt ( $1/6092 \pm 24 \%$ ). Même s'il est ici difficile de conclure avec si peu de souris contrôle analysées, les courbes de neutralisations obtenues avec les sérotypes 1, 6 et 9 semblent également indiquer une baisse des titres neutralisants avec le traitement au pI. De plus, on observe une tendance indiquant que la réponse anticorps contre l'AAV est capsid-dépendante pour une même dose de vecteur injectée. Le titre moyen en anticorps neutralisant (dilution du plasma pour inhiber la moitié de la transduction) obtenu avec l'AAV6 est de  $1/211$  (n=3), de  $1/2342$  et  $1/2160$  pour l'AAV1 et l'AAV9 respectivement (n=2 et n=1), et enfin de  $1/7363$  pour l'AAV2 (n=15). On trouve donc chez la souris Balb/c une intensité de la réponse neutralisante suivant cet ordre décroissant : AAV2>AAV1≈AAV9>AAV6. L'AAV6 est donc relativement peu immunogène en IV chez ces souris.



**Figure 38 – Dose optimale de pI inhibant la formation d'anticorps neutralisant l'AAV2.**

Des expériences de neutralisations ont été réalisées avec les plasmas J28 de souris pré-injectées avec des doses croissantes de pI (120 à 500 µg) suivi 5 minutes après d'une IV de  $1.10^{11}$  vg d'AAV2-CMV-mSeAP. Les chiffres sous la courbe correspondent au nombre de souris injectées à une dose donnée. Les astérisques (\*) indiquent les points dont la moyenne est significativement différente ( $p < 0,05$ ) du titre neutralisant des souris contrôle sans pI (0 µg).

D'autres expériences de neutralisation *in vitro* ont été effectuées avec des plasmas provenant d'animaux pré-injectés avec une dose croissante de pI pour déterminer la dose optimale inhibitrice de la formation d'anticorps neutralisants. Il apparaît que la dose optimale de pI est de 200 µg puisque l'effet inhibiteur atteint un plateau au-delà, ce qui indique une saturation des récepteurs scavenger des cellules présentatrices d'antigènes (*fig. 38*).

Au passage nous avons aussi mesuré les titres neutralisants des plasmas des souris traitées à la pK4. En effet, les HSPG ont été rapportés comme favorisant l'infection des cellules présentatrices d'antigènes par l'AAV2 [43]. Nous avons donc vérifié indirectement à travers la réponse humorale neutralisante, si la pK4 pouvait augmenter la transduction de ces cellules

*in vivo*. Aucune différence significative n'a été trouvée entre le titre neutralisant des souris traitées ( $1/6928 \pm 25\%$ ) ou non ( $1/6092 \pm 24\%$ ) avec la pK4.

En conclusion, nous démontrons que l'AAV2 est capté par les récepteurs scavenger au niveau d'une population de cellules présentatrices d'antigène restant à déterminer. Et il est possible de saturer ces récepteurs à l'aide d'une pré-injection de pI pour inhiber cette interaction, ce qui permet :

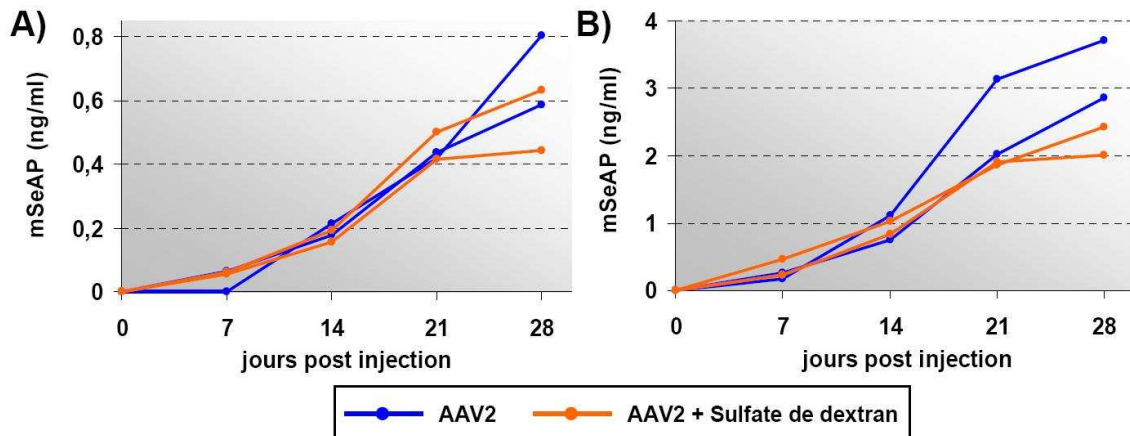
- de rendre une fraction de vecteur AAV2 supplémentaire disponible pour la transduction d'autres populations cellulaires cibles,
- de réduire la formation de la réponse anticorps neutralisant l'AAV injecté.

### **b) Sulfate de dextran**

Il a été rapporté que la synthèse d'HSPG se réduit au cours de la maturation du muscle squelettique, et ce phénomène a été proposé pour expliquer la perte d'infectiosité du virus enveloppé HSV (herpes simplex virus) qui exploite cette molécule en tant que co-récepteur pour son adsorption à la cellule [93]. De la même manière l'infectiosité de l'AAV2 dans le muscle est corrélée à l'expression de son récepteur primaire HSPG à la surface des cellules, ce qui explique son tropisme préférentiel pour les fibres musculaires lentes exprimant l'HSPG plus abondamment. Nous avons proposé sur cette base l'hypothèse de pontage avec la pK qui améliorerait la liaison aux HSPG. Cette hypothèse implique une liaison de la pK avec une zone électronégative de la capsid AAV, autrement le polycation agirait comme un compétiteur au niveau du récepteur HSPG. Et c'est généralement ce qu'il advient quand on utilise un polyanion, particulièrement si c'est un analogue du récepteur du virus : il y a une compétition inhibitrice. La liaison de l'AAV2 à l'HSPG est par exemple inhibée par l'héparine soluble ; et de la même manière, un virus ayant comme récepteur un glycosaminoglycane (GAG) hautement sulfaté ou un récepteur chargé négativement, peut être inhibé par la compétition avec un polyanion (analogue de ce même GAG). C'est par exemple le cas du dextran sulfate qui inhibe l'infection du virus CMV, de poliovirus [94], du virus de Sendai et de la grippe. Il apparaît donc difficile d'augmenter la transduction de cellules cibles par un vecteur viral en employant un polyanion, à moins d'entrer en compétition avec des cellules transduites non désirées comme nous l'avons montré avec le pI.

Même si les récepteurs scavenger se lient uniquement avec des polyanions, tous les polyanions ne fonctionnent pas comme leur ligand. Les récepteurs scavenger présents à la surface des macrophages de souris peuvent ainsi se lier au pI, au sulfate de dextran et au fucoidan, mais pas au chondroïtine sulfate ou à l'héparine. Le sulfate de dextran pourrait donc agir sur l'AAV2 comme le pI, à travers une compétition au niveau des récepteurs scavenger. Cependant Angela Dyer et coll. ont montré que le polyanion sulfate de dextran peut se comporter *in vitro* comme un récepteur artificiel pour le HSV-1 et ainsi augmenter l'infection de cellules sog9 déficientes en GAG [95]. Et Yeung et coll. ont reproduit cet effet *in vivo* dans

le muscle mature de la souris [93]. Dans ce contexte, le sulfate de dextran agit en trans comme un récepteur en se liant à une glycoprotéine de la membrane du HSV et en se substituant à son récepteur HSPG pour initier l'adsorption à la cellule. Nous avons donc testé ce polyanion en pré-injection avant l'AAV2, ou en co-injection dans le muscle dans l'optique d'augmenter la transduction systémique ou celle des fibres musculaires exprimant peu d'HSPG, ce qui « compléterait » le tropisme musculaire de l'AAV2. Mais ni la pré-injection en IV (*fig. 39A*), ni la co-administration en intramusculaire (*fig. 39B*) n'ont montré un gain de transduction *in vivo* aux quantités utilisées (voir *fig. 39* ci-après).



**Figure 39 – Impact du sulfate de dextran sur la transduction de l'AAV2.**

**A)** Le vecteur AAV2-CMV-mSeAP est injecté en IV à la dose de  $1.10^{11}$  vg 5 minutes après l'injection IV de 150  $\mu$ g de sulfate de dextran. **B)**  $6,7.10^9$  vg de vecteur AAV2-CMV-mSeAP est co-injecté en intra-musculaire dans le tibial antérieur (IM) avec 350 ng de sulfate de dextran dans un volume final de 35  $\mu$ l. Dans les graphiques **A)** et **B)** chaque courbe de sécrétion mSeAP correspond à une souris. Les courbes bleues sont les souris contrôle sans sulfate de dextran, et les courbes orange sont les souris qui ont été traitées au sulfate de dextran.

## 2. Facteurs sanguins modulateurs de l'infection par l'AAV

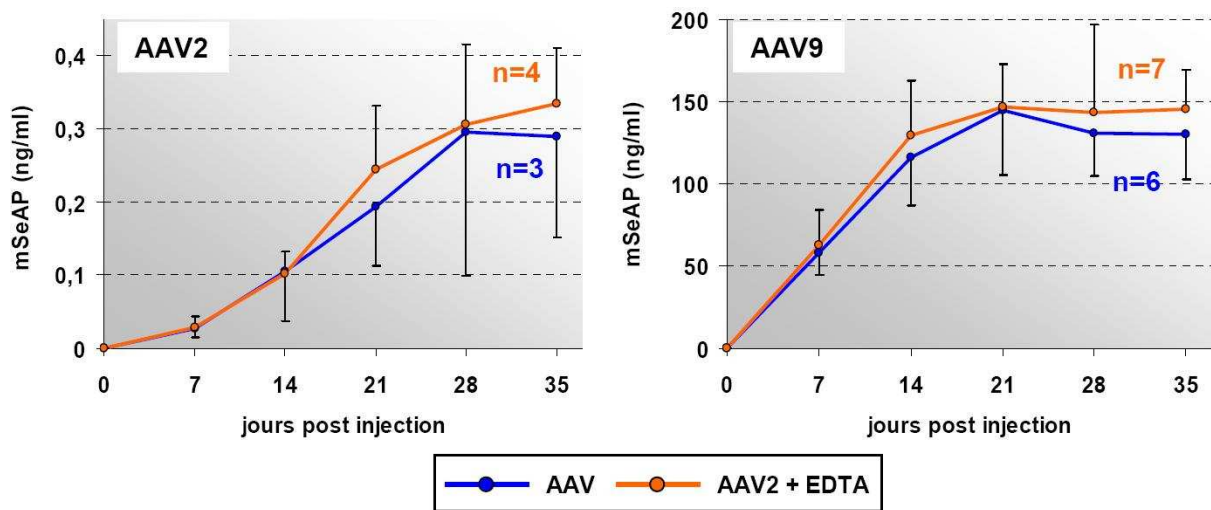
### 2.1. Facteurs dépendants d'ions métalliques bivalents

L'interaction de molécules de la circulation sanguine avec les virus module leur tropisme ou leur infectivité. Le tropisme hépatique du vecteur adénoviral de sérotype 5 est ainsi dû en grande partie à son interaction avec la protéine du complément C4BP ou encore avec des zymogène\* dépendant de la vitamine K tel que le facteur de coagulation X. Ces facteurs établissent une liaison entre la capsid et les HSPG ou la protéine LPR (low-density lipoprotein receptor related protein) à la surface des hépatocytes [96]. Ce cas correspond à une interaction favorisant l'infection, mais à l'inverse de nombreux facteurs circulants ont la capacité d'inhiber un virus. C'est par exemple le cas de molécules de l'immunité acquise comme les anticorps neutralisants, ou encore de nombreuses opsonines de l'immunité innée

\* Pro-enzyme nécessitant un clivage protéolytique afin d'acquérir une activité enzymatique.

telles que la protéine C3b du complément qui participe à la phagocytose de virus. Notons également que d'un point de vue évolutif un certain nombre de virus exploitent ou détournent les molécules du système immunitaire à leur profit. Les partenaires sanguins de la capsid AAV sont peu connus. On sait cependant que la capsid de l'AAV2 lie plusieurs protéines du système du complément [62], et que certains sérotypes comme l'AAV4 ou l'AAV5 sont capables d'hémagglutination\* [97, 98]. De plus, des traitements anticoagulants interfèrent avec la transduction du foie par l'AAV2 [42].

Nous nous sommes intéressés aux systèmes du complément et de la coagulation et à leur impact potentiel sur la transduction systémique de l'AAV injecté en IV. Dans un premier temps, nous avons adopté une approche globale plutôt que de cribler *in vivo* l'impact des différents facteurs de ces systèmes un à un sur l'AAV. Ces deux cascades enzymatiques du sang sont dépendantes des ions calcium et/ou magnésium pour leur activité. Nous avons donc procédé à une chélation globale pour définir si un ou plusieurs processus biologiques dépendant d'ions métalliques joue sur la transduction de l'AAV, et si oui dans quel sens : inhibition ou potentialisation de l'infection. Pour ce faire, nous avons administré de l'EDTA (sel disodique d'acide éthylène-diamine-tétraacétique) *in vivo* aux souris Balb/c avant de procéder à l'administration intraveineuse d'un vecteur AAV2- ou AAV9-CMV-mSeAP.



**Figure 40 – Impact de l'EDTA sur la transduction systémique des vecteurs AAV2 et AAV9.**

Le vecteur AAV2- ou AAV9-CMV-mSeAP est injecté en IV à la dose de  $1.10^{11}$  vg 30 minutes après l'injection IV d'EDTA (300  $\mu$ l à 7 mM). La mSeAP est dosée dans le sang des souris prélevées chaque semaine après les injections. Les résultats sont présentés sous forme de courbes moyennes  $\pm$  les écart types ; le nombre d'animaux par groupe est précisé en bout de courbes.

La concentration plasmatique de la mSeAP obtenue au cours du temps dans ces expériences est présentée dans la **figure 40**. La comparaison des courbes de sécrétion moyennes de la protéine transgénique chez les souris traitées ne montre pas de différence significative avec celles des souris contrôle. Dans le cas où plusieurs facteurs dépendant des ions métalliques

\* Capacité de certains virus à s'adsorber sur la surface des globules rouges (en se liant à l'acide N-acétylneuraminique par exemple), se qui provoque l'agglutination de ces globules rouges *in vitro*.

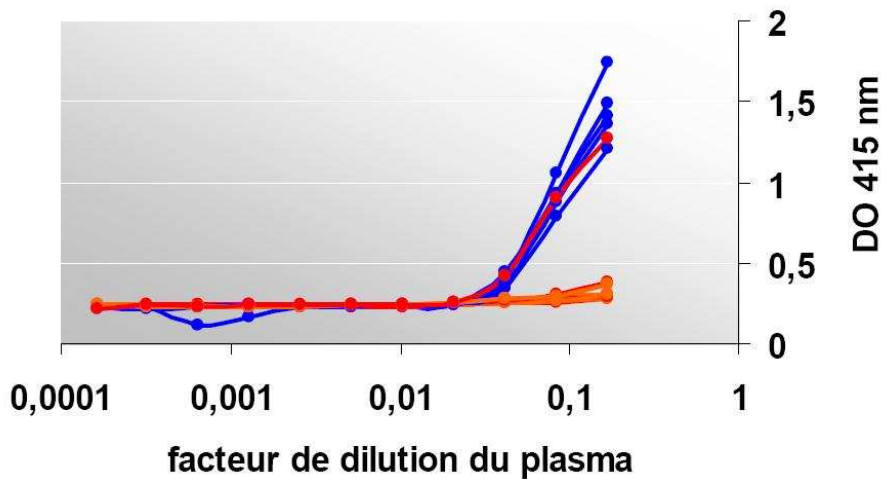


moduleraient l'infection du vecteur, il est possible que leurs actions antagonistes conduisent à des courbes de sécrétion similaires aux courbes contrôle. Cependant il est aussi possible que le traitement EDTA n'ait eu aucun impact sur la transduction du vecteur AAV car les facteurs modulateurs sont indépendants des ions métalliques bivalents, ou encore parce que leur activité biologique n'est pas nécessaire à l'interaction avec la capsid AAV.

## 2.2. Le complément

Jusqu'ici nous avons envisagé le mode d'action de la pK à travers son interaction potentielle avec le vecteur et ses cellules cibles. Mais nous gardons à l'esprit que la pK pourrait aussi agir sur des cofacteurs sanguins modulant l'infection de l'AAV. Christian Plank, qui a étudié le mode d'action de la polylysine en tant que vecteur non viral, s'est intéressé à l'interaction de cette molécule avec le complément. Ses résultats montrent que la polylysine est opsonisée par le complément de manière dose dépendante et corrélée à sa masse moléculaire [99, 100]. Or ce sont deux propriétés que nous retrouvons dans le cadre de nos expériences de modification de la biodistribution de l'AAV par la pK, dont l'effet est dose dépendant et corrélé en intensité avec le degré de polymérisation de la polylysine. Ces pistes nous ont amenés à vérifier l'impact du complément sur la transduction systémique de l'AAV2.

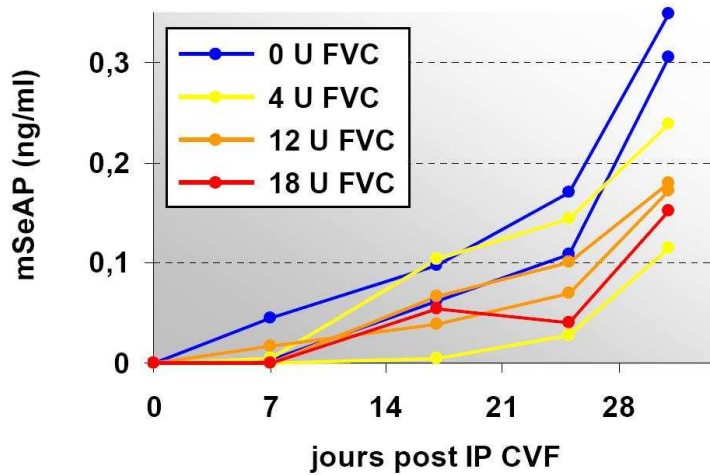
Dans un premier temps nous avons déplété le complément *in vivo* grâce à un facteur de venin de cobra (FVC). Le FVC est un composant non toxique du venin de cobra (purifié de ses phospholipases), il active la voie du complément en formant des convertases qui consomment les composants C3 et C5 du complément [101]. Contrairement aux convertases normales, celles formées avec le FVC sont résistantes aux facteur H et I régulateurs de la cascade d'activation du complément. Les convertases formées par le FVC sont donc capables de consommer la quasi-totalité du complément circulant en produits de clivage de faible demi-vie. Cette approche est bien documentée chez la souris, mais il existe divers protocoles d'injection et divers FVC dont l'activité varie selon l'espèce de cobra dont ils proviennent. C'est pourquoi nous avons commencé par valider l'efficacité du FVC dont nous disposions chez la souris Balb/c.



**Figure 41 – Test du facteur de venin de cobra dans la souche Balb/c.**

Un groupe de 6 souris est injecté à J0 par voie intrapéritonéale (IP) avec des doses croissantes de facteur de venin de cobra (FVC) : 8, 18 et 25 U (2 souris par dose). Du sang est prélevé sur ces animaux 24 heures avant le traitement, puis 24 et 48 h après (soit à J-1, J1 et J2). Le complément présent dans les plasmas est évalué par un test d'hémolyse d'hématies de mouton *in vitro*. Si le complément forme des complexes d'attaque membranaire les hématies libèrent leur hémoglobine qui est mesurée par spectrophotométrie à 415 nm. Les courbes bleues correspondent à J-1, les courbes orange à J1, et les rouges à J2.

La **figure 41** montre que l'activité du complément présente chez les souris Balb/c à J-1 (courbes bleues) est inhibée dans les plasmas collectés à J1 et J2 après le traitement au FVC (courbes orange et rouges). La déplétion en complément est donc obtenue *in vivo* à toutes les doses testées chez toutes les souris à J1, et elle persiste chez la majorité des animaux à J2. En effet, une des 2 souris traitée avec 18 unités de FVC présente une déplétion du complément à J1 mais récupère un niveau normal 48 heures après l'injection (seule courbe rouge ayant une activité normale du complément). Ce protocole préliminaire valide donc chez la souris Balb/c la procédure d'injection de vecteur AAV2 24 heures après le traitement FVC, de manière à ce que l'infection se réalise en l'absence de la majorité du complément circulant.



**Figure 42 – Transduction systémique de l’AAV2 chez les souris déplétées en complément.**

Le vecteur AAV2-CMV-mSeAP ( $1.10^{11}$  vg) est administré en IV 24 heure après une injection IP de FVC. La sécrétion de mSeAP est alors dosée dans le sang, chaque courbe correspond à une souris. Les courbes bleues correspondent aux souris contrôle non traitées par le FVC, les courbes jaunes à rouge correspondent aux souris traitées avec des quantités croissantes de FVC.

L’injection de vecteur AAV2 chez des souris déplétées en complément est présentée dans la **figure 42**. On observe une inhibition de la sécrétion de mSeAP chez les souris traitées par le FVC, ce qui indique que le complément est un facteur favorisant l’infection du vecteur AAV2 injecté par voie intraveineuse. Or il a été montré récemment que la présence de protéine C3 du complément dans le sérum favorise la capture de l’AAV2 par des macrophages primaires de souris *in vitro* [62]. Si l’AAV2 est également opsonisé par le complément *in vivo*, son élimination est donc médiée par phagocytose dans les macrophages et autres cellules de l’immunité possédant des récepteurs du complément (macrophages, lymphocytes, CPA...). Or le promoteur CMV utilisé dans notre expérience est actif en transcription chez les macrophages [102]. Ainsi l’inhibition de sécrétion observée avec la déplétion du complément par le FVC pourrait correspondre à une perte d’expression chez les macrophages transduits par l’AAV2.

Plank et coll. ont montré que la pK opsonise le complément [100], mais si l’effet de la pK était exclusivement une inhibition du complément, alors nous observerions dans nos expériences de pré-injection une baisse de sécrétion analogue à la **figure 42**, ce qui n’est pas le cas. Pour expliquer l’augmentation des niveaux de mSeAP chez les animaux pré-traités avec la pK, tout en tenant compte des résultats avec le FVC, nous pouvons proposer l’hypothèse suivante : la pK rend le vecteur temporairement « furtif » vis-à-vis d’une partie du système immunitaire inné en empêchant la capture et la transduction de macrophages par l’AAV2, ce qui correspond à une baisse de sécrétion de la mSeAP du même ordre que ce que nous observons avec le FVC. Mais la pK produit également un effet de pontage entre capsid AAV2 et HSPG, ce qui augmente la transduction systémique dans divers organes dont les muscles. Cette dualité de l’effet de la pK est supportée par la comparaison des expériences utilisant le promoteur CMV et le promoteur muscle-spécifique MCK. En effet, on observe que la majorité de la sécrétion de mSeAP plasmatique obtenue après l’IV d’AAV2 est dûe à

une expression provenant d'autres cellules que le muscle (cellules de Kupffer, hépatocytes...). Alors qu'avec la pré-injection de pK4, on observe un gain énorme de la sécrétion musculaire de mSeAP de l'ordre de 160 fois dans l'expérience utilisant le promoteur MCK. Dans le cas de l'utilisation d'un promoteur CMV, la pK inhiberait la transduction des macrophages, ce qui réduirait la sécrétion de mSeAP. Mais le gain obtenu par pontage avec les HSPG dans le muscle et les autres organes renverserait la tendance, ce qui expliquerait le gain global de sécrétion de l'ordre de 6 à 7 fois. Cette hypothèse sur l'action double de la pK par pontage avec les HSPG et par inhibition du complément expliquerait donc le gain inférieur de sécrétion avec la pré-injection de pK et le promoteur CMV, alors qu'il est beaucoup plus important quand on restreint l'expression aux cellules musculaires.

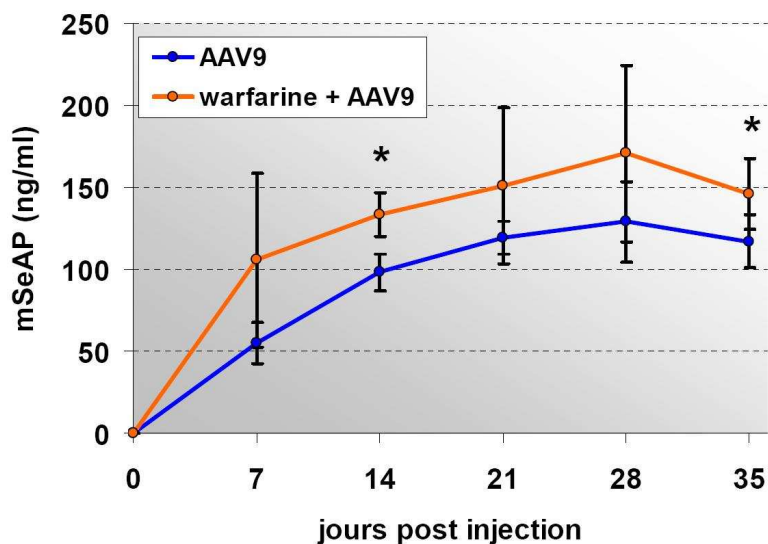
### 2.3. Facteurs de coagulation

L'héparine non fractionnée étant inhibitrice de l'AAV2, la mise au point d'essais cliniques utilisant ce sérotype injecté par cathéter a nécessité la recherche d'un anticoagulant neutre. Et à cette occasion Arruda et coll. ont montré que les protéases de la coagulation peuvent influencer sur la transduction de l'AAV2 *in vivo* [42]. Leur modèle d'étude consiste en l'administration de divers traitements anticoagulants avant l'injection par voie IV d'un AAV2 codant le facteur IX humain sous le contrôle d'un promoteur foie spécifique. La transduction est suivie par dosage du facteur IX humain dans le sang des souris. Ils montrent ainsi que les anticoagulants hirudine et TAP (Tick Anticoagulant Peptide) inhibent la transduction de l'AAV2, que l'héparine de bas poids moléculaire est neutre et que la génération de thrombine améliore la transduction. L'inhibition qu'ils observent provient d'une baisse de la transduction du foie par l'AAV2. Et l'effet des anticoagulants utilisés est dépendant du sérotype puisque contrairement à l'AAV2, aucune inhibition n'est notée avec l'AAV5 et l'AAV8.

L'héparine est capable de bloquer la transduction de l'AAV2 *in vitro* de manière dose dépendante, cependant l'action des anticoagulants n'est trouvée qu'*in vivo*. Nous avons donc testé directement *in vivo* l'impact de l'anticoagulant warfarine sur la transduction de l'AAV9. La warfarine inhibe la vitamine K époxide réductase, une enzyme clé du recyclage de la vitamine K oxydée en sa forme réduite après qu'elle ait participé à la carboxylation de différents facteurs de coagulation, principalement la prothrombine et le facteur VII. La warfarine est donc inhibitrice de la synthèse des zymogènes vitamine K dépendants de la coagulation, son activité est donc plus lente que les autres anticoagulants mais elle a un spectre d'action plus large. L'AAV9 a été choisi car ce sérotype n'a jamais été testé en présence d'anticoagulants, et car sa grande efficacité de transduction par voie systémique permet un suivi aisé de l'expression sur coupe histologique.

Dans un premier temps nous avons vérifié l'efficacité de la warfarine à la dose envisagée pour les expériences sur la souris Balb/c. Ceci a été réalisé en mesurant le temps de Quick (temps de coagulation, voir protocole p206) de plasmas de souris traitées ou non avec la warfarine (3

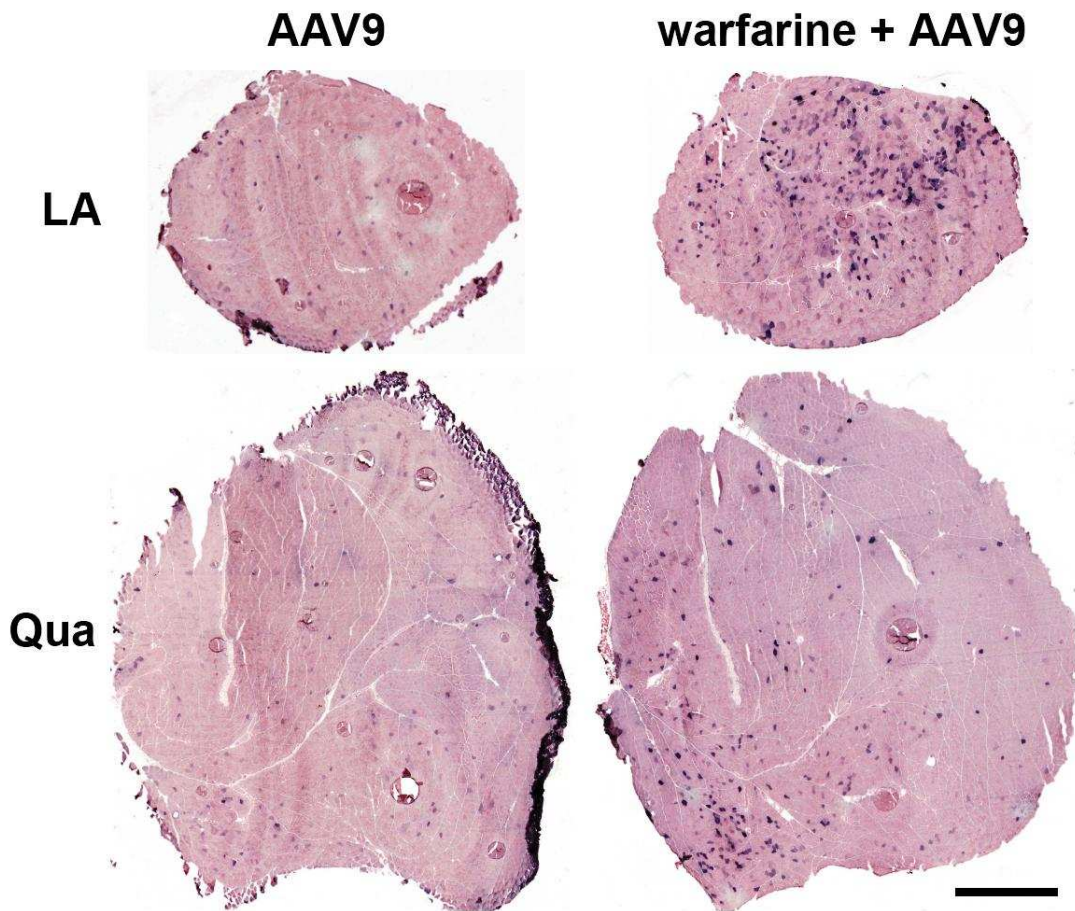
à 4 souris par groupe). Les souris non traitées ont un temps de coagulation moyen de 26,5 secondes, alors que les plasmas des souris traitées à la warfarine sont essentiellement incoagulables avec des temps  $\geq$  à 5 minutes. Après cette vérification, nous avons traité ou non deux groupes de souris avec ce protocole anticoagulant efficace, puis nous les avons injecté en IV avec le vecteur AAV9-CMV-mSeAP.



**Figure 43 – Impact de la warfarine sur la transduction systémique du vecteur AAV9.**

Le vecteur AAV9-CMV-mSeAP est injecté en IV à la dose de  $1.10^{11}$  vg chez des souris traitées ou non par la warfarine (voir matériel et méthode p195). La mSeAP est dosée dans le sang des souris prélevées chaque semaine après l'injection du vecteur. Les résultats sont présentés sous forme de courbes moyennes  $\pm$  les écart types ; n=4 souris par groupe. Les astérisques (\*) indiquent une différence significative entre la moyenne des souris traitées à la warfarine et celle des souris contrôle ( $p < 0,05$ ).

La **figure 43** montre que la sécrétion de mSeAP est modérément augmentée chez les souris traitées avec la warfarine comparé aux souris contrôle. La transduction a par la suite été analysée dans le cœur, le diaphragme, la loge antérieure et le quadriceps en révélant la mSeAP sur coupes histologiques.



**Figure 44 – Marquage de la mSeAP sur coupes histologiques du protocole warfarine.**

Loge antérieure (LA) et quadriceps (Qua) représentatifs des souris injectées par le vecteur AAV9 avec ou sans pré-traitement à la warfarine (n=4 souris par groupe). Barre d'échelle de 1 mm.

Aucune différence notable n'a été trouvée dans le diaphragme et le cœur entre les souris contrôle et les souris traitées (résultats non montrés). En revanche, un léger gain du nombre et de l'intensité des fibres musculaires positives pour la mSeAP est visible dans les quadriceps, et un gain notable de transduction est trouvé dans la loge antérieure (comparer les photos des souris traitées à gauche de la **figure 44** avec les souris contrôle à droite).

Arruda et coll. montrent que divers traitements anticoagulants modulent la transduction du foie par l'AAV2 [42]. Et il a été montré que la warfarine inhibe la transduction du foie par le vecteur adénoviral de sérotype 5 [96]. Nous avons donc quantifié la quantité de génomes viraux dans le foie des souris. En moyenne on trouve  $0,75 \pm 0,19$  copies/noyau chez les souris traitées à la warfarine, ce qui n'est statistiquement pas différent de la quantité trouvée dans le foie des souris contrôle :  $0,68 \pm 0,06$  copies/noyau. Le gain de transduction observé dans les muscles ne provient donc pas d'une fraction de vecteur libérée par un shunt du foie en l'absence de zymogènes vitamine K dépendants. Il reste également possible que les facteurs de coagulation favorisent l'infection d'un organe autre que le foie (et dans lequel le CMV est inactif). Mais l'hypothèse du shunt semble peu probable dans la mesure où nous n'observons pas de variation de transduction dans le cœur alors que l'AAV9 possède un fort cardiotropisme.

Le fait que la chélation par l'EDTA au moment de l'injection n'ait pas réduit la sécrétion de mSeAP, indique que l'influence des facteurs de coagulation sur la transduction musculaire ne nécessite pas leur activité biologique qui est calcium-dépendante. La seule présence des facteurs de coagulation inhibe donc une partie de la transduction des muscles par l'AAV9 injecté en IV.

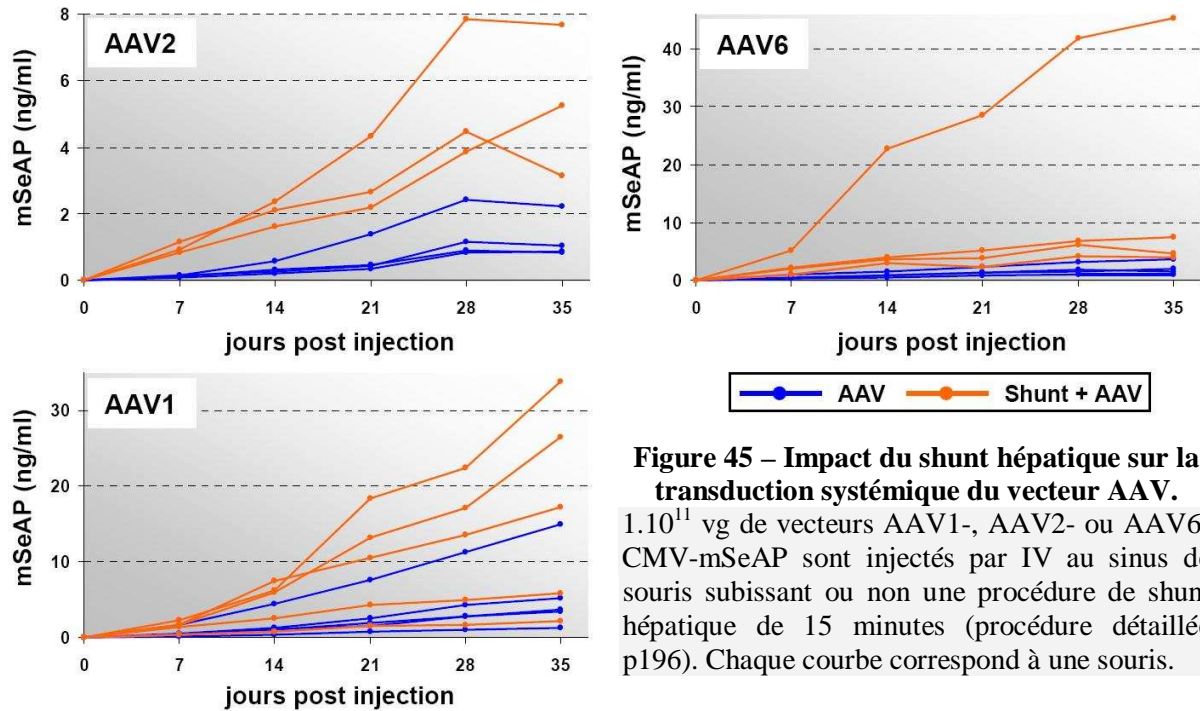
En théorie l'effet des facteurs de coagulation sur l'AAV est saturable, qu'il soit négatif ou positif sur la transduction. Arruda et coll. précisent que l'effet inhibiteur observé avec leurs traitements anticoagulants est moindre quand la dose de vecteur est augmentée de  $4.10^{12}$  à  $1.10^{13}$  vg/kg [42]. La dose d'AAV9 de notre expérience correspond à  $5.10^{12}$  vg/kg (si on se base sur une masse de 20 g pour une souris), ce qui est proche de la dose où ils constatent une inhibition notable dans leurs expériences. Nous n'avons pas testé l'impact de la dose de vecteur dans notre système, mais l'étude du mécanisme précis d'inhibition de la transduction de l'AAV9 par les facteurs de coagulation permettrait d'optimiser le vecteur. En conclusion, nos analyses indiquent qu'il est possible d'augmenter la transduction de certains muscles par l'AAV9 avec le traitement anticoagulant warfarine. Et cet effet est indépendant du tropisme cardiaque de l'AAV9 (puisque aucun gain n'est visible dans cet organe), et il ne passe pas non plus par un shunt du foie. Un ou plusieurs facteur(s) de coagulation semble donc se lier à la capsid AAV9 de manière indépendante du calcium, et il inhiberait sélectivement la liaison à certains muscles indépendamment du récepteur LamR (présent dans le cœur).

### **3. Facteurs exogènes et procédure d'administration**

#### **3.1. Shunt hépatique**

Dans la mesure où le foie capte une grande partie du vecteur AAV injecté en IV nous nous sommes demandé si l'isolement du système porte hépatique durant l'injection pouvait significativement modifier le profil de transduction systémique du vecteur.

Une procédure de shunt hépatique transitoire a donc été réalisée, en isolant le foie de la circulation durant 15 minutes juste avant l'injection de vecteur AAV. Cette chirurgie invasive nécessite une anesthésie générale, et provoque donc une vasoconstriction limitant la possibilité d'injection à la veine caudale. L'administration du vecteur est donc faite par voie veineuse au niveau du sinus, de même pour les souris contrôle qui sont également anesthésiées sans toutefois subir le shunt. Nous avons réalisé cette expérience de shunt avec 3 sérotypes : AAV1, AAV2 et AAV6.



La **figure 45** présente les courbes de sécrétion de la mSeAP après cette procédure. Le shunt du foie permet d'obtenir une sécrétion moyenne significativement supérieure aux souris contrôle avec les sérotypes 2 et 6. La réponse est variable dans le cas du sérotype 1, avec 3 souris sur 5 présentant un gain de sécrétion. Ce gain de sécrétion s'explique par le fait que l'expression obtenue avec l'AAV dans le foie est moindre que celle obtenue dans les autres organes cibles pour une même dose de vecteur administrée. En effet, la cinétique d'expression dans le foie est plus lente, et varie d'un sérotype à l'autre, les sérotypes 1, 2 et 6 transduisant le foie moins efficacement que l'AAV8 par exemple. Le shunt de la circulation hépatique portale ne peut excéder 15 minutes, cependant ces résultats indiquent que ce temps est suffisant pour modifier la biodistribution de l'AAV en « redistribuant » une fraction du vecteur vers les autres organes cibles. Actuellement l'administration loco-régionale par perfusion de membre isolé pour transduire les muscles est à l'étude. L'administration du vecteur AAV durant un shunt hépatique pourrait également être envisagée pour améliorer la transduction systémique.

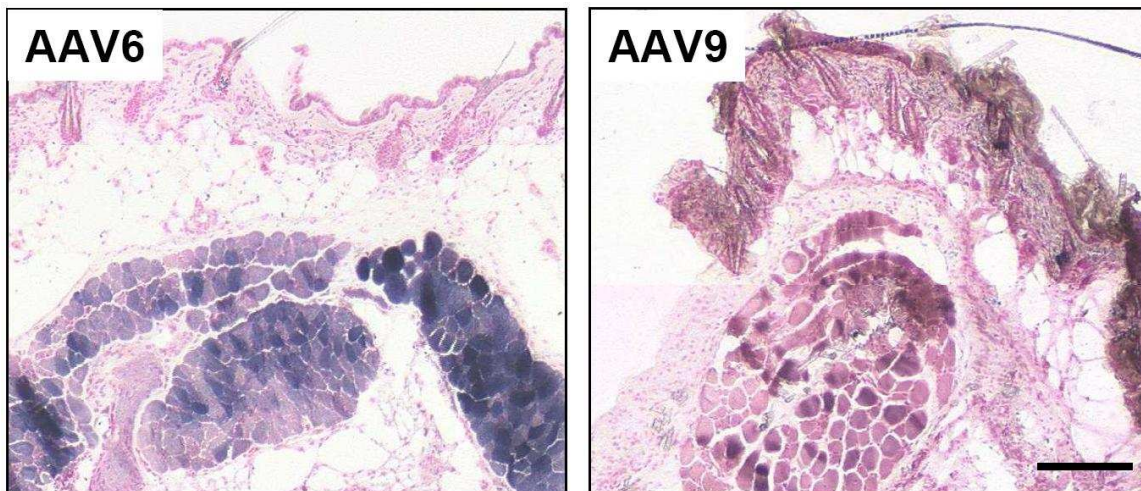
### 3.2. Administration de l'AAV par voie sous-cutanée

La voie sous-cutanée est une méthode d'administration non invasive couramment employée pour délivrer un traitement avec une cinétique lente. Contrairement à l'administration de protéine recombinante thérapeutique qui nécessite des administrations régulières, la thérapie génique pourrait permettre une sécrétion constante dans le sang. Dans cette optique l'administration d'AAV2 en sous-cutanée a été testée en 1999 chez la souris Balb/c immunocompétente [103]. Les auteurs de cette étude montrent que l'AAV2 ainsi injecté



transduit une couche de muscle strié sous le tissu adipeux nommée panniculus carnosus, et que ce muscle permet la sécrétion de divers transgènes thérapeutiques dans le sang de la souris.

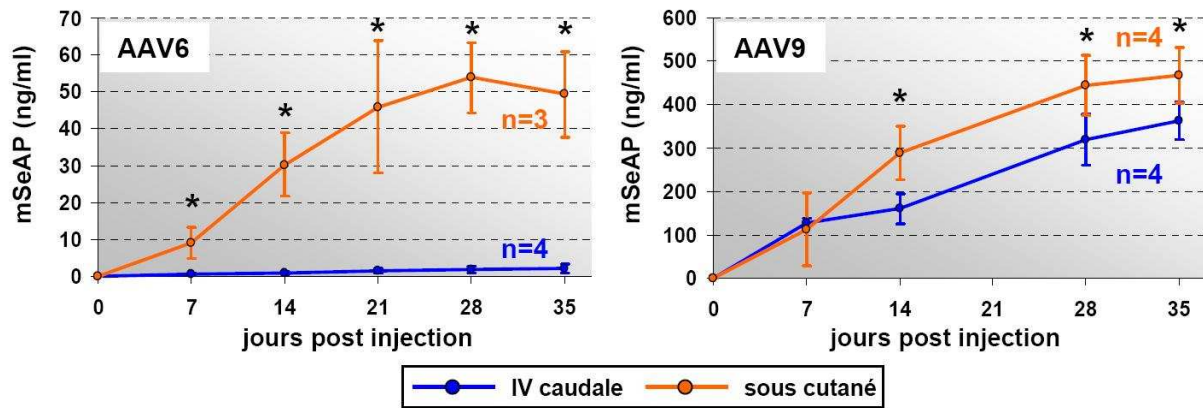
Les différents sérotypes AAV existants démontrent des propriétés de franchissement tissulaire distinctes, notamment au niveau de l'endothélium vasculaire. Les sérotypes AAV6 et 9 ont tous les deux un tropisme musculaire fort, mais lors d'une injection en IV à dose égale l'AAV9 montre un meilleur profil de distribution et une expression tissulaire forte [58]. Nous avons étudié dans quelle mesure ces deux sérotypes franchissent le derme et permettent une transduction systémique après leur administration sous-cutanée comparé à une injection directe dans le sang.



**Figure 46 – Marquage de coupe histologique du site d'injection sous-cutanée d'AAV.**

Marquage de la mSeAP sur une coupe de peau et du muscle sous-cutané de souris injectées avec  $1.10^{11}$  vg d'AAV6- ou d'AAV9-CMV-mSeAP, prélèvement à J35 post injection. Les coupes sont contre-colorées avec du rouge à noyau pour visualiser le tissu cutané. Les photographies présentées sont représentatives de groupes de 3 et 4 souris pour l'AAV6 et l'AAV9 respectivement. Barre d'échelle de 200  $\mu$ m.

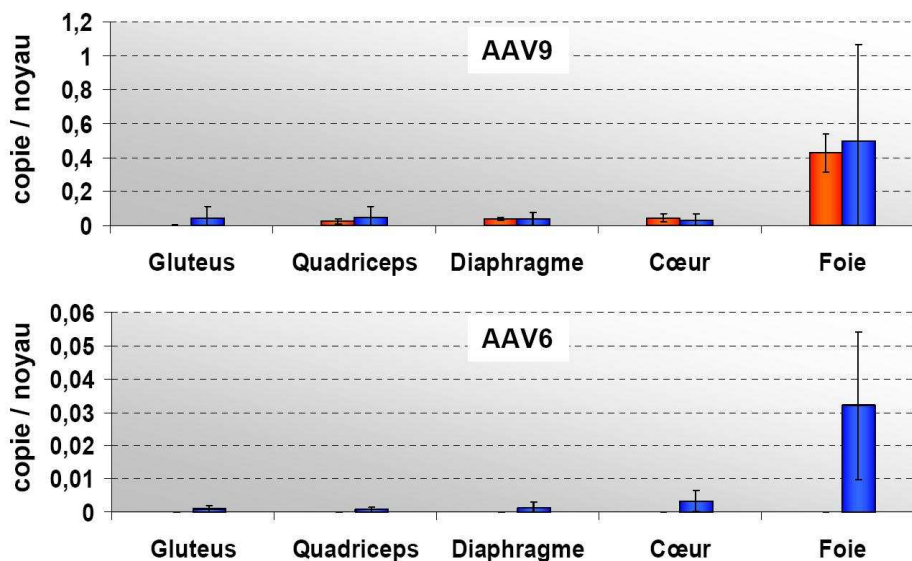
Pour commencer nous avons effectué une analyse histologique de l'expression du transgène au niveau du site d'injection. Aucune cellule constituant la peau (kératinocytes, cellules souche du bulbe, adipocytes...) n'exprime le transgène mSeAP suite à l'administration sous-cutanée d'AAV6 ou d'AAV9 (*fig. 46*). Cependant, on observe bien une transduction du muscle panniculus carnosus situé sous l'hypoderme, et l'AAV6 transduit cette couche musculaire beaucoup plus efficacement que l'AAV9. Notons que cette expérience n'exclue pas une infection du tissu cutané par l'AAV dans la mesure où le promoteur CMV n'est peut être pas actif dans ces cellules.



**Figure 47 – Sécrétion de mSeAP dans le sang des souris injectées en sous-cutanée.**

Sécrétion de mSeAP dans le sang des souris de l'expérience d'injection sous-cutanée comparée à l'injection en IV caudale de la même dose de vecteur ( $1.10^{11}$  vg). Les résultats sont présentés sous forme de courbes moyennes  $\pm$  les écart types ; le nombre de souris par groupe est indiqué en bout de courbe (n=). Les astérisques (\*) indiquent les points des souris injectées en sous-cutanée dont la moyenne est significativement différente de celle des souris injectées à la veine caudale ( $p < 0,05$ ).

Afin d'évaluer la transduction systémique de l'AAV par cette voie d'injection locale nous avons comparé sa cinétique d'expression avec celle obtenue lors d'une intraveineuse dans la **figure 47**. La sécrétion de mSeAP est augmentée suite à l'injection sous-cutanée comparé à l'intraveineuse, et le gain est beaucoup plus important dans le cas de l'AAV6. Ceci correspond bien aux marquages de la **figure 46**, le gain de sécrétion étant corrélé à l'efficacité de transduction locale du muscle situé sous le point d'injection. Afin de déterminer la dissémination du vecteur nous avons quantifié les génomes viraux présents dans des organes distants du point d'injection ; cette biodistribution suivie par QPCR est présentée dans la **figure 48**.



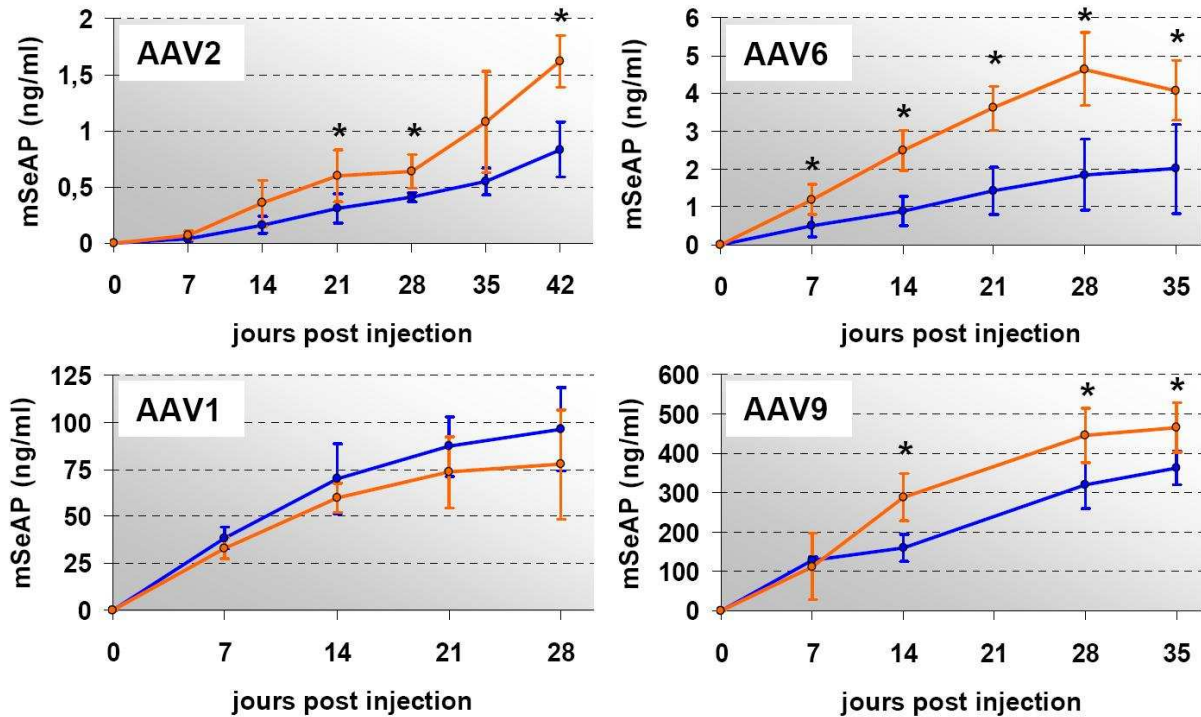
**Figure 48 – Biodistribution de l'AAV6 et de l'AAV9 après une injection sous-cutanée.**

Les génomes viraux présents dans les broyats de muscles et du foie sont quantifiés par PCR en temps réel. Les colonnes bleues correspondent aux souris contrôle injectées par IV caudale, et les colonnes orange correspondent aux souris injectées en sous-cutanée.

Le vecteur AAV9 injecté en sous-cutanée transduit les muscles et le foie de manière comparable ou inférieure à ce qui est trouvé dans les souris contrôles injectées en IV caudale (**fig. 48**). Ce profil de biodistribution mis en parallèle des résultats histologiques et des cinétiques de sécrétion de la mSeAP indique qu'une faible quantité de vecteur AAV9 injecté en sous-cutané est captée par le muscle sous le point d'injection. L'AAV9 semble rapidement passer du tissu cutané à la circulation sanguine où il transduit les muscles et le foie de manière comparable à ce que nous obtenons après une administration vasculaire directe. En revanche, nous montrons que le sérotype 6 transduit beaucoup plus efficacement le muscle sous-cutané que l'AAV9. De plus, aucun génome viral n'est détecté dans les différents tissus (sous le seuil de détection), au contraire du profil de biodistribution trouvé lors d'une injection IV d'AAV6. Or l'AAV6 et l'AAV9 ont des efficacités de transduction comparables lors d'une administration intramusculaire directe. Cette particularité de l'AAV6 pourrait être expliquée par un accès plus difficile à la circulation sanguine comparé à l'AAV9 car il traverserait moins efficacement le système lymphatique et/ou l'endothélium vasculaire. Cela impliquerait une rétention plus longue au niveau du tissu cutané, et donc une meilleure transduction du muscle localement. L'AAV6 constitue donc un sérotype efficace pour faire sécréter un facteur thérapeutique suite à une injection sous-cutanée. Il serait également intéressant de tester cette approche sous-cutanée avec l'AAV6 au niveau d'un muscle squelettique chez le gros animal. Cette stratégie pourrait ainsi être envisagée pour la transduction du muscle pathologique en évitant le traumatisme inflammatoire conséquent à l'injection directe.

### 3.3. Mise à jeun

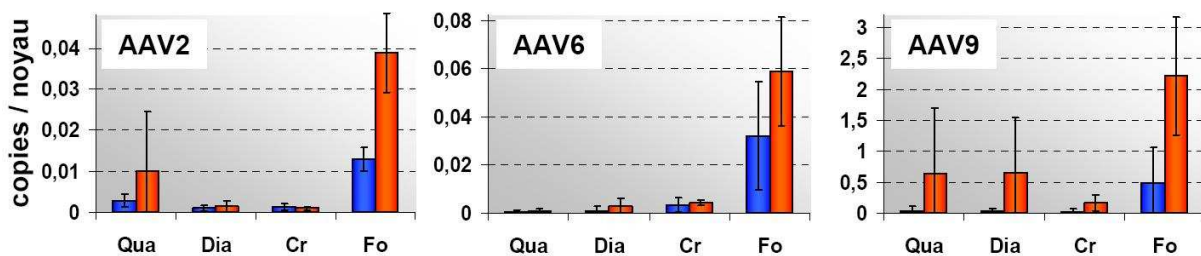
Nous avons abordé dans l'introduction les différents facteurs exogènes et endogènes pouvant influencer sur la transduction de l'AAV. Par exemple, il paraît évident que la dose de vecteur injectée détermine l'intensité de l'expression obtenue (facteur exogène). L'AAV exploite le stress cellulaire pour transduire ; des inhibiteurs du protéasome ou des agents génotoxiques modulent ainsi son routage intracellulaire et augmentent sa transduction de manière cellules et sérotypes dépendantes [33]. Nous avons étudié l'impact d'un stress particulier sur la transduction systémique de l'AAV : le jeûne. Ce stress peut en effet agir à deux niveaux potentiellement modulateurs de l'infection par l'AAV. Tout d'abord le jeûne modifie globalement le métabolisme et les niveaux plasmatiques en lipides, glucides et protides. La concentration des facteurs plasmatiques interagissant avec la capsid AAV pourrait donc être modifiée. Enfin, le jeûne est inducteur d'autophagie pouvant également moduler l'infection. Nous avons donc procédé à l'injection IV de vecteurs AAV chez des souris Balb/c ayant été mises à jeun ou non la veille de l'expérience.



**Figure 49 – Impact du jeûne sur la transduction du vecteur AAV.**

Dans cette expérience deux groupes de souris Balb/c de 8 à 10 semaines sont injectés de la même manière en IV caudale avec le vecteur AAV1-, AAV2-, AAV6- ou AAV9-CMV-mSeAP. Le groupe test est mis à jeun en moyenne 18 heures avant l'injection (courbes orange), alors que le second groupe contrôle accède normalement à la nourriture (courbes bleues). Les résultats sont présentés sous forme de courbes moyennes  $\pm$  les écart types. A l'exception de l'AAV2, tous les vecteurs sont injectés à la dose de  $2.10^{11}$  vg avec 4 souris par groupe. Le sérotype AAV2 est injecté à la dose  $1.10^{11}$  vg avec 5 souris par groupe. Une astérisques (\*) indique une sécrétion moyenne significativement différente entre souris à jeun et souris contrôle ( $p < 0,05$ ).

A l'exception de l'AAV1, tous les sérotypes testés présentent un gain statistiquement significatif de sécrétion de mSeAP chez les souris mises à jeun (*fig. 49*). Les souris injectées avec l'AAV1 n'ont pas été analysées au-delà, mais la biodistribution dans quelques muscles et dans le foie a été analysée pour les autres sérotypes.



**Figure 50 – Biodistribution chez les souris transduites par l'AAV après une période de jeûne.**

Quantification des génomes viraux dans le quadriceps (Qua), le diaphragme (Dia), le cœur (Cr) et le foie (Fo) des souris de l'expérience de jeûne.

La *figure 50* indique que l'augmentation de la concentration de mSeAP plasmatique – quand les souris sont mises à jeun avant l'injection – est due à une augmentation globale de la

transduction dans différents organes. Et cette quantification des génomes viraux par QPCR présente de grands écarts type dans les groupes de souris mis à jeûn, ce qui rend compte d'une variabilité dans le gain de transduction d'une souris à l'autre pour un même organe.

Ces expériences indiquent donc que le jeûne peut améliorer la transduction systémique de certains sérotypes AAV.

## Conclusion et discussion

La preuve de principe de la faisabilité de transduction de l'ensemble de la masse musculaire chez la souris et le hamster a été obtenue lors d'injections intraveineuses (IV) d'AAV6 ou d'AAV8 [41, 80]. Des études sont actuellement en cours pour reproduire ces résultats chez le gros animal. Ces résultats ouvrent évidemment des perspectives thérapeutiques pour des maladies génétiques telles que la dystrophie musculaire de Duchenne. Cependant, pour obtenir des résultats sur l'ensemble de la musculature des doses très importantes de virus doivent être injectées : on estime qu'il faudra injecter par voie IV chez l'homme de l'ordre de  $1.10^{15}$  à  $1.10^{16}$  vg. Ceci pose au moins 2 problèmes : 1) un problème de faisabilité au niveau de la production en qualité GMP\* de telles quantités de virus et, 2) il se pose des questions au niveau de la sécurité de l'injection de telles quantités d'AAV.

Une manière de surmonter ces limitations serait d'améliorer l'efficacité de transduction du vecteur AAV et/ou de modifier son tropisme de manière à injecter des doses inférieures de vecteur. Diverses approches de modification génétique de la capsid AAV ont ainsi été décrites. Avec par exemple l'incorporation de peptides ligands sélectionnés par phage display à la surface de la capsid AAV [104, 105]. Une autre approche consiste à modifier de manière aléatoire les gènes codant la capsid puis à cribler les vecteurs obtenus contre les cellules d'intérêt [88].

Quelques approches non génétiques visant à améliorer la transduction du vecteur AAV ont également été développées. Walters et coll. ont par exemple montré que le fait de coprecipiter l'AAV2 avec du calcium phosphate améliore le transfert de gène vers l'épithélium des voies respiratoires après une instillation intranasale [106]. Plus récemment, il a été montré que l'addition de lipides cationiques à l'AAV9 améliorerait l'efficacité de transduction des poumons [107]. La modification covalente de la capsid avec des chaînes de polyéthylenglycol [108] ou par des copolymères HPMA a également été évaluée [109].

Nous nous sommes attachés à trouver des stratégies adjuvantes permettant d'améliorer la transduction systémique du vecteur et en particulier la transduction du muscle afin de pouvoir injecter des doses inférieures de vecteur. Dans un second temps, nous avons également exploré d'autres pistes : 1) modification de facteurs sanguins pouvant influencer la transduction systémique de l'AAV, 2) influence du jeûne ou encore 3) influence de la voie d'administration.

---

\* Good Manufacturing Practices : « Bonnes pratiques de fabrication » pour la clinique.

### **Stratégie adjuvante utilisant des polymères cationiques :**

Le vecteur AAV2 transduit peu le muscle après une injection IV, y compris à la forte dose de  $1.10^{12}$  vg. Nous montrons que la pré-injection du polycation poly-L-lysine (pK) en IV avant l'administration du vecteur AAV2 permet d'augmenter globalement la transduction dans les organes cibles du vecteur tel que le foie, et les muscles avec en particulier une amélioration de la transduction des muscles vitaux que sont le cœur et le diaphragme. Cet effet de la pré-injection de pK est également retrouvé avec les vecteurs AAV de sérotype 5, 6 et 9. Dans le cas de l'AAV6 le profil de gain avec la pK est très proche de ce que l'on trouve avec l'AAV2, alors que pour l'AAV9 le gain est visible dans le cœur et le foie mais pas dans les autres muscles squelettiques évalués.

### **Mode d'action de l'adjuvant pK sur l'AAV2 :**

Au départ, nous avons émis l'hypothèse qu'un polymère cationique de polylysine pourrait modifier la biodistribution du vecteur AAV2. Cette « idée » était basée sur la connaissance de la liaison électrostatique entre le vecteur AAV2 et son récepteur. En effet, le domaine de liaison de l'AAV2 à son récepteur primaire HSPG (négatif) correspond à des résidus basiques formant une zone positive à la surface de la capsid [83]. Le polymère cationique pK est lui aussi capable de se lier aux HSPG [85]. Injecté avant le virus, il pourrait donc saturer les HSPG, ce qui inhiberait la transduction du vecteur. Cependant, nos résultats ne vont pas dans ce sens ; en effet, nous montrons que la pK n'entre pas en compétition avec le vecteur AAV2 mais au contraire elle permet d'améliorer la transduction des organes cibles. Cet effet est également retrouvé avec un autre polymère cationique : la poly-L-arginine (pR).

L'effet de la pK augmente avec le degré de polymérisation. De plus, le gain d'expression plasmatique observé (sécrétion de mSeAP) augmente avec la dose de pK (ou de pR) injectée jusqu'à une dose optimale. En revanche, jouer sur la quantité de vecteur AAV2 ne semble pas modifier l'intensité du gain de transduction pour une dose de pK fixe. Ces observations suggèrent que l'effet de la pK est saturable, et qu'elle agirait sur les cellules cibles plus que sur le vecteur.

Nous montrons également que le délai entre l'injection de pK et d'AAV2 doit être bref pour obtenir le gain de sécrétion de mSeAP maximal ; une voie d'administration plus lente comme l'intrapéritonéale se révélant moins efficace que l'IV pour un même délai entre l'administration du polymère et du vecteur. La saturation des cellules cibles par la pK est également confortée par le fait que la co-administration de la pK avec le vecteur donne une efficacité comparable ou moindre (selon le degré de polymérisation de la pK) comparée à la pré-injection 5 minutes avant l'AAV2.

L'utilisation d'un vecteur AAV2 possédant une cassette d'expression de la mSeAP sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique (MCK) confirme l'efficacité de cette approche dans le muscle, le gain de sécrétion de mSeAP étant beaucoup plus important que ce qui est observé sous le contrôle du promoteur CMV (facteur 160 vs 6).

Notons que les marquages histologiques ainsi que le dosage de la mSeAP dans les organes montrent que l'amélioration de transduction est particulièrement importante dans le diaphragme et le cœur qui sont des muscles essentiellement lents. Sachant que les fibres lentes expriment plus abondamment les HSPG [79, 90], et que l'AAV2 transduit préférentiellement ces fibres, il semble donc que la pK potentialise le tropisme naturel de l'AAV2 dans ces muscles.

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats et le fait que la polylysine est capable de se lier aux HSPG, nous proposons l'hypothèse selon laquelle la pK modifie la biodistribution du vecteur AAV2 en le concentrant vers les zones riches en HSPG via un effet que nous qualifions de « pontage ». En effet, le vecteur AAV2 injecté par voie vasculaire (IV) serait capté au niveau de zones électronégatives de sa capsidie par la pK qui formerait alors un « pont » entre le vecteur et les HSPG membranaires de la cellule cible. L'internalisation du vecteur dans les cellules se produirait alors par liaison aux co-récepteurs du virus ou encore par une voie alternative si l'encombrement stérique de la pK empêche ces interactions. Notons cependant que nous avons constaté dans le cœur et le diaphragme que des fibres rapides sont aussi transduites en présence de pK. Il n'est donc pas exclu que la pK forme un pont entre le vecteur et la membrane indépendamment des HSPG, ou encore qu'elle améliore la liaison aux HSPG plus faiblement exprimés à la surface des fibres rapides.

#### **Action de l'adjuvant pK sur d'autres sérotypes AAV :**

La pré-injection de pK améliore également l'expression de la mSeAP plasmatique lors de l'injection des vecteurs AAV de sérotype 5, 6 et 9. Dans le cas de l'AAV6 le profil de gain dans les organes est très proche de ce que l'on trouve avec l'AAV2, alors que son récepteur primaire n'est pas l'HSPG. Cependant il a été montré que le sérotype 6 est capable de lier l'héparine avec une affinité inférieure à celle de l'AAV2, mais que contrairement au cas de l'AAV2 cette molécule n'inhibe pas la transduction de l'AAV6 *in vitro* [98]. Le rôle de l'HSPG en tant que récepteur de l'AAV6 est donc toujours débattu. Néanmoins, ce point commun avec l'AAV2 expliquerait l'effet de la pK sur le sérotype 6 dans le cadre de l'hypothèse de pontage aux HSPG.

Notons cependant une différence concernant le mode d'action de la pK sur l'AAV6 : sa transduction systémique est améliorée ou inhibée selon la quantité de vecteur injectée pour une quantité fixe de pK4. Le fait que le gain de transduction soit perdu en augmentant le rapport vecteur/pK4 suggère que la quantité de pK interagissant avec le vecteur AAV6 est le point limitant, et qu'une quantité minimale de pK4 est nécessaire pour améliorer la transduction. Il est possible que le gain de transduction corresponde à une liaison de l'AAV6 aux HSPG via la pK4, et que dans le cas où une faible quantité de pK4 se lierait à l'AAV6 il en résulterait plutôt une inhibition de l'infection passant par le récepteur de l'AAV6.

Le fait que la pK améliore également la transduction du sérotype 9, ainsi que du sérotype 5 dont la capsidie a relativement divergé au niveau évolutif [21] de celles des AAV2, 6 et 9



(dont la séquence VP1 est homologue à plus de 82 % [98]), suggère que le site de liaison de la pK à la capsid AAV est assez conservé.

L'exception à cette règle est l'AAV1 puisque nous n'avons constaté aucune différence de transduction avec ce sérotype en présence de pK. Cela est informatif dans la mesure où l'AAV1 partage 99 % d'identité de séquence en acides aminés avec le sérotype 6 au niveau de la séquence de VP1 [25]. La comparaison des séquences des protéines de capsid VP de l'AAV1 et de l'AAV6 pourrait ainsi permettre l'identification des acides aminés impliqués dans la liaison de la pK4 à l'AAV6.

### **Stratégie adjuvante utilisant des polymères anioniques :**

Les molécules anioniques analogues de glycosaminoglycanes (GAG) entrent souvent en compétition *in vivo* avec les virus utilisant ces mêmes GAG en tant que récepteurs lors de l'infection de leurs cellules cibles, comme lors de la compétition de l'héparine soluble avec le récepteur HSPG de l'AAV2. Cependant, l'analogue de GAG sulfate de dextran présente diverses propriétés intéressantes potentiellement modulatrices des interactions électrostatiques de l'AAV initiant l'infection. En effet le sulfate de dextran se lie aux récepteurs scavenger, et il a été montré *in vivo* qu'il est capable d'améliorer la transduction du muscle mature par le vecteur HSV en se liant à la surface cellulaire et en se comportant comme un récepteur pour une glycoprotéine chargée positivement de la membrane de l'HSV-1 [93]. Cependant, le sulfate de dextran ne semble pas pouvoir interagir avec l'AAV2 *in vivo* puisque nous n'avons constaté aucune modification de la transduction par ce vecteur lors d'une pré-injection du polymère en IV, ou lors d'une co-administration en intramusculaire.

Une autre approche utilisant un polymère anionique pour modifier la biodistribution de l'AAV serait d'inhiber spécifiquement la transduction d'une population cellulaire au profit d'une autre. Nous montrons ainsi lors de la saturation des récepteurs scavenger par injection d'acide polyinosinique qu'une fraction du vecteur AAV2 injectée est captée par des cellules présentatrices d'antigènes via ces récepteurs. Cette approche rend une fraction de vecteur disponible pour d'autres populations cellulaires d'intérêt, et améliore ainsi sensiblement la transduction systémique. De plus, ce traitement à l'acide polyinosinique permet de réduire la formation de la réponse anticorps neutralisant l'AAV2 injecté chez la souris.

### **Facteurs sanguins modulateurs de l'infection par l'AAV :**

Dans un premier temps nous avons utilisé une approche de chélation par l'EDTA *in vivo* avant l'injection du vecteur AAV2, mais cela n'a pas modifié le profil l'expression du transgène rapporteur mSeAP. Les facteurs dépendants des ions métalliques bivalents ne semblent donc pas interagir avec le vecteur *in vivo*, ou bien, si c'est le cas leur activité biologique n'est pas nécessaire à l'interaction avec la capsid AAV.

Puis, nous nous sommes intéressés aux systèmes du complément et de la coagulation et à leur impact potentiel sur la transduction de l'AAV injecté en IV.

La déplétion du **complément** *in vivo* grâce au facteur de venin de cobra (FVC) a été réalisée avant l'injection du vecteur AAV2-CMV-mSeAP. Nous avons observé une inhibition de la sécrétion de mSeAP chez les souris traitées par le FVC, ce qui indique que le complément favorise la transduction d'une population cellulaire par le vecteur AAV2 injecté en IV. Ces cellules pourraient être des macrophages car le promoteur CMV est actif en transcription dans ces cellules, et elles possèdent des récepteurs du complément.

Arruda et coll. observent une inhibition de la transduction du foie par l'AAV en présence d'**anticoagulants** [42], cette inhibition étant sérotype dépendante puisque trouvée avec l'AAV2 mais pas avec les sérotypes 5 et 8.

Nous montrons pour la première fois qu'une stratégie anticoagulante utilisant la warfarine permet d'améliorer sensiblement la transduction par l'AAV9 de certains muscles chez la souris tels que le quadriceps et la loge antérieure comprenant le muscle tibial. Nous montrons également que ce gain de transduction dans les muscles squelettiques est indépendant du tropisme cardiaque de l'AAV9, et qu'il ne passe pas par la libération d'une fraction de vecteur en shuntant le foie comme cela a été montré avec d'autres anticoagulants dans le cas du vecteur AAV2 [42]. Un ou plusieurs facteur(s) de coagulation semblent donc se lier à la capsid AAV9 de manière indépendante du calcium (cf expérience EDTA), et il inhiberait sélectivement la liaison du vecteur à certains muscles. Il est possible que ces facteurs de coagulation exercent leur inhibition de l'AAV au niveau de l'interaction avec leur récepteur primaire. En effet, on constate que la baisse de transduction est importante dans les organes pour lesquels ces sérotypes ont un fort tropisme : forte expression d'HSPG dans le foie pour l'AAV2, et tropisme musculaire de l'AAV9 (récepteur de la laminine ?) [110].

Identifier les interactions complexes entre les récepteurs primaires, les co-récepteurs et la capsid de l'AAV, ainsi que les interactions avec les cellules et protéine du sang est d'une importance fondamentale pour améliorer le vecteur. Ces connaissances pourraient permettre des approches de modification ciblée de la capsid AAV pour améliorer la transduction lors de l'administration systémique.

### **Facteurs exogènes et procédure d'administration modifiant la transduction par l'AAV :**

Le **shunt de la circulation hépatique** portale ne peut excéder 15 à 20 minutes, cependant nos résultats indiquent que ce temps est suffisant pour modifier la biodistribution de l'AAV en « redistribuant » une fraction du vecteur vers les autres organes cibles. Notons que la majorité de la transduction de l'AAV injecté en IV a lieu dans les 4 heures [57]. L'AAV circule donc longtemps dans le sang contrairement à l'adénovirus dont plus de 90 % est éliminé du sang en moins de 10 minutes. La clairance de l'AAV dans le sang varie d'un sérotype à l'autre [58], il serait donc utile de vérifier si le sérotype AAV joue sur l'efficacité

du shunt hépatique. Dans notre cas, nous observons les gains de sécrétion de mSeAP plasmatique les plus importants lors du shunt hépatique avec les sérotypes 2 et 6. Le point commun de ces sérotypes est leur capacité de liaison à l'héparine [98]. Il serait relativement logique de penser que l'effet du shunt hépatique est d'autant plus marqué que le sérotype AAV utilisé est capté par le foie notamment via les HSPG très exprimés dans cet organe.

Le **jeûne** peut améliorer la transduction systémique de certains sérotypes AAV chez la souris : AAV2, 6 et 9, mais pas dans le cas de l'AAV1. Il serait intéressant de vérifier cette observation chez le gros animal et chez l'homme, car cette simple modification d'un protocole clinique pourrait améliorer la transduction des organes cibles lors d'une administration IV.

L'AAV6 injecté en **sous-cutanée** transduit beaucoup plus efficacement le muscle panniculus carnosus situé sous l'hypoderme que l'AAV9 dans les mêmes conditions. En effet, l'AAV9 semble rapidement passer du tissu cutané à la circulation sanguine où il transduit les muscles et le foie de manière comparable à ce que nous obtenons après une administration vasculaire directe. Au contraire de l'AAV6 qui accède plus difficilement à la circulation sanguine après son injection sous-cutanée (différence de passage du système lymphatique et/ou de l'endothélium vasculaire), ce qui se traduit par une rétention locale plus longue dans le tissu et donc par une meilleure transduction du muscle sous cutané.

### **Application théorique de ces différentes approches à l'homme :**

#### **Poly-L-lysine :**

La toxicité de la pK4 chez la souris constitue un obstacle pour son administration chez l'homme. Cependant, nous montrons que l'injection d'autres polymères cationiques tels que la poly-L-arginine possède les mêmes propriétés adjuvantes sur l'AAV2. Nous montrons également un gain de transduction dans le muscle avec des pK de différents degré de polymérisation lors de l'expérience utilisant le promoteur muscle spécifique MCK. Il pourrait donc être possible de trouver soit une dose non toxique chez l'homme soit un autre polymère – plus compatible pour une utilisation chez l'homme – possédant toutes les propriétés nécessaires à l'amélioration de la transduction.

Concernant l'intérêt de cette stratégie avec l'AAV2 :

Il est clair que l'AAV2 n'est pas le vecteur idéal car la transduction que nous obtenons dans le muscle, et le cœur en particulier, peut être obtenue chez la souris sans stratégie pK avec les sérotypes AAV8 et 9. Cependant, le cardiotropisme de l'AAV9 n'est pas retrouvé chez le gros animal comme le chien par exemple, et à l'heure actuelle personne n'a injecté de vecteur AAV9 chez l'homme en systémique dans le but de transduire le muscle. Personne n'est donc en mesure d'affirmer que le sérotype 9 possède un tropisme pour le cœur humain. En

revanche, notre stratégie adjuvante potentialise la transduction du vecteur AAV2 normalement inefficace dans le cœur ; il est donc possible que cette stratégie permette une transduction intéressante des cœurs du chien ou de l'homme. Notons également que nous montrons la possibilité d'améliorer la transduction du cœur par l'AAV9 de plus d'un facteur 2 chez la souris avec la pré-injection de pK4.

Dans le cas d'une application de la stratégie de type pK à la dystrophie musculaire de Duchenne, notons que la thérapie génique AAV doit être administrée de préférence tôt chez l'enfant, si possible avant l'apparition des signes cliniques. Or le muscle immature exprime plus abondamment l'HSPG, ce qui est favorable à l'action du polycation dans le cadre de l'hypothèse de pontage aux HSPG. De la même manière, un contexte dystrophique installé ne devrait pas gêner cette approche puisque la régénération permanente rend le muscle plus immature, et que le muscle dystrophique compense en partie son phénotype par une transition de ses fibres musculaires vers le type lent exprimant plus abondamment l'HSPG [79, 90].

Si l'on sort du contexte des maladies neuromusculaires, le vecteur AAV est aussi utilisé lors d'administration systémique pour transduire le foie afin de sécréter dans le sang une protéine thérapeutique tel qu'un facteur de coagulation chez des patients hémophiles par exemple. Or nous avons démontré que la poly-L-lysine peut significativement améliorer la transduction du foie par différents vecteurs AAV tels que les sérotypes 2, 6 et 9. L'effet étant relativement important dans le cas du sérotype 9. Notre stratégie non invasive pourrait donc s'avérer utile pour ces thérapies géniques où le niveau de transgène doit impérativement dépasser un seuil thérapeutique.

L'amélioration de la transduction musculaire en présence de pK indique que le polymère peut traverser l'épithélium vasculaire. Il serait intéressant d'effectuer des expériences de marquage de pK de différentes masses moléculaires pour voir dans quelle mesure le produit diffuse à travers le muscle depuis les vaisseaux, et si la transduction observée est limitée aux zones proches de la vascularisation ou non.

### **Acide polyinosinique :**

Cette approche est limitée dans le cas de l'application à l'AAV2 chez l'homme car une grande partie de la population humaine possède des cellules immunitaires mémoires contre l'AAV2. Dans ce cas l'effet de l'acide polyinosinique (pI) devrait se limiter à shunter la population de cellules présentatrices d'antigènes pour améliorer la transduction systémique de l'AAV2, mais aucun bénéfice n'est alors attendu chez l'homme au niveau de la réponse humorale contre le vecteur AAV2. Notons cependant que les récepteurs scavenger devraient en théorie être capables de capter d'autres sérotypes que l'AAV2 dans la mesure où cette liaison avec le ligand de charge nette globale négative est essentiellement électrostatique. Cette hypothèse est confortée par la tendance à la baisse du titre en anticorps neutralisant observée chez la souris

avec d'autres sérotypes AAV suite au traitement au pI. Le pI pourrait donc être employé chez l'homme pour réduire la réponse humorale neutralisante contre des vecteurs AAV ayant une faible immunoprévalence et ainsi favoriser leur ré-administration. Néanmoins, il est difficile de spéculer sur de tels effets sans les tester *in vivo* puisqu'il a été montré que de faibles titres d'anticorps neutralisants peuvent fortement inhiber la transduction de l'AAV chez l'homme [46].

### **Shunt hépatique :**

Actuellement l'administration loco-régionale par perfusion de membre isolé pour transduire les muscles est à l'étude chez le gros animal dans le but de transposer la technique chez l'homme. L'administration du vecteur AAV durant un shunt hépatique pourrait également être envisagée pour améliorer la transduction systémique. Chez l'homme la circulation portale peut être bloquée jusqu'à 20 minutes en utilisant un cathéter à ballon, ce qui est moins invasif que la chirurgie que nous avons utilisée chez la souris.

**Partie II - Étude dans un modèle dystrophique : utilisation  
du muscle *mdx* comme producteur de protéine  
transgénique sécrétée TNFR-Is/mIgG1**

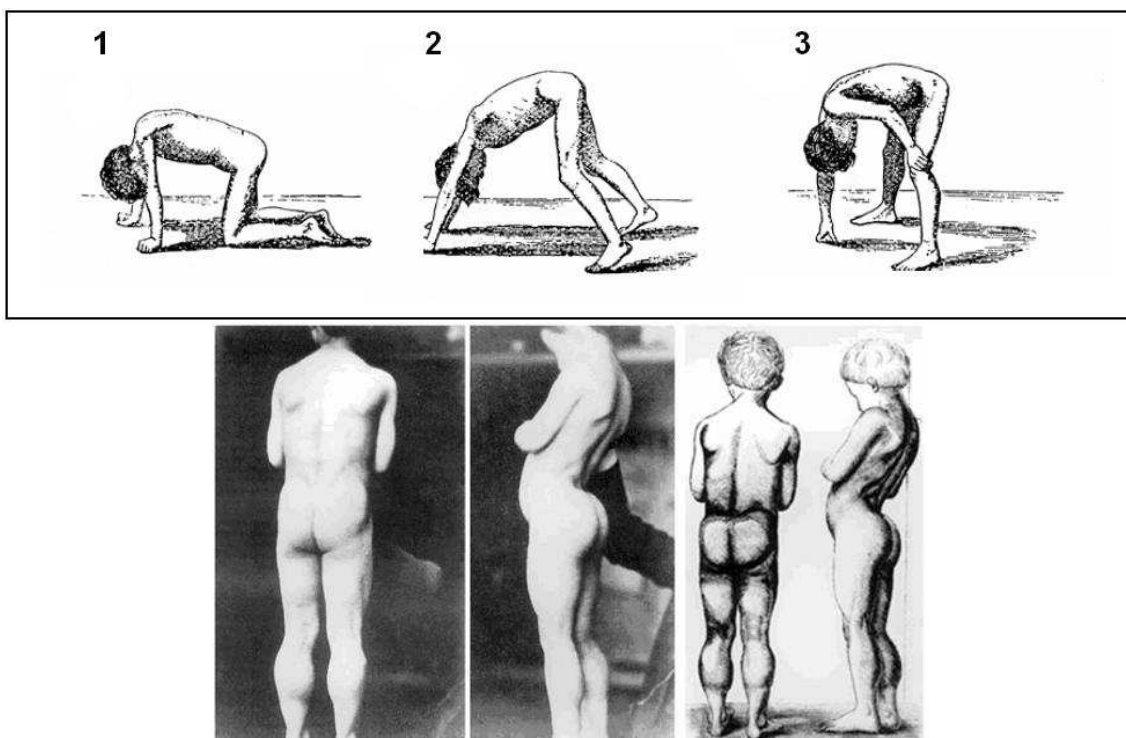
## Introduction

### 1. La dystrophie musculaire de Duchenne

#### 1.1. Historique

Une dystrophie musculaire progressive est une affection d'origine génétique liée à une dégénérescence primitive du tissu musculaire, se manifestant par un déficit de la force musculaire et par une amyotrophie qui évolue progressivement.

Historiquement la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) fut décrite par Guillaume Benjamin Armand Duchenne en 1861 (aussi appelé Duchenne de Boulogne ; 1806-1875) dans son ouvrage sur la stimulation électrique du muscle, puis plus précisément en 1868 [111]. Ultérieurement, William Richard Gowers insiste sur le sexe mâle des malades et sur la transmission par les femmes [112]. Il décrit également la manœuvre qui porte son nom basée sur l'observation des enfants atteints qui se relèvent de la position accroupie de manière caractéristique en prenant appui sur les membres supérieurs (voir *fig. 51* ci-après).



**Figure 51 – Signes cliniques de la dystrophie musculaire de Duchenne.**

En haut : manœuvre de Gowers avec un dessin représentant un enfant atteint de dystrophie musculaire de Duchenne se relevant du sol en prenant des appuis caractéristiques. En bas : Photos et dessin d'un patient réalisés par Duchenne de Boulogne. Adapté de Tyler et coll. [113].

Les lésions histopathologiques consistant en la nécrose des fibres musculaires suivie de mécanismes de régénérations furent décrites par Erb en 1891 [114], et c'est lui qui proposa sur cette base histopathologique le terme de dystrophie musculaire progressive pour caractériser les myopathies d'origine génétique.

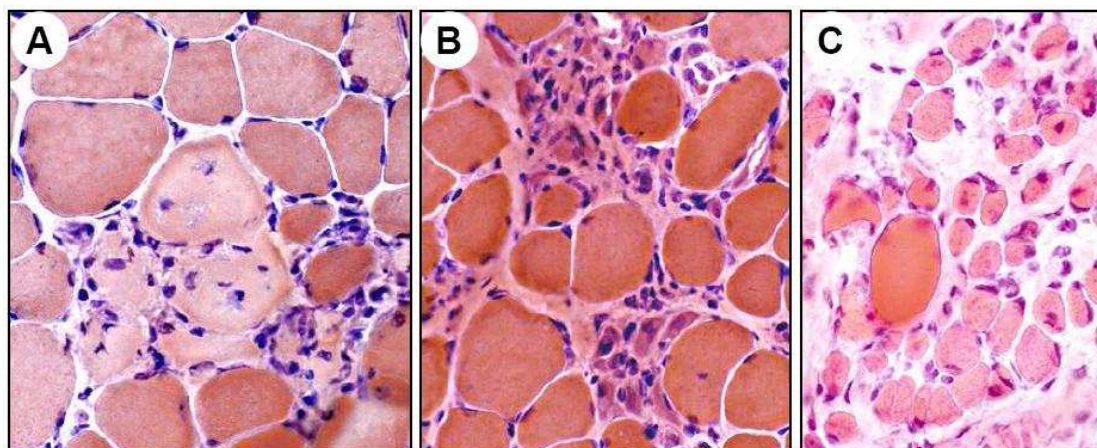
La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique de transmission gonosomique récessive liée au chromosome X, due à des mutations dans le gène de la dystrophine (Xp21.2). C'est la dystrophie musculaire la plus grave et la plus fréquente car elle est létale pour les garçons et touche une naissance mâle sur 3500. La fréquence de mères transmettrices est de 1/2500 et un tiers des patients possède une néo-mutation. Les mères porteuses de l'allèle muté de la dystrophine sur l'un de leurs chromosomes X sont dites « porteurs sains » car non atteintes, les enfants mâles ont donc une chance sur deux d'être atteints, et les filles ne sont pas atteintes mais ont une chance sur deux de posséder le gène muté. Cependant certaines mères conductrices de la maladie peuvent présenter des signes cliniques du fait de l'inactivation aléatoire de l'un des deux chromosomes X.

## 1.2. Signes cliniques

Cliniquement, l'affection débute de manière précoce voire anténatale puisque des lésions histologiques caractéristiques ont été trouvées dans le muscle fœtal [115]. De même le taux de créatine kinase (CK) sérique – une enzyme musculaire relarguée dans le sang par les fibres musculaires dont l'intégrité de la membrane est atteinte – est très augmenté au stade pré-clinique. Cependant aucune manifestation clinique n'est visible à la naissance. Les premiers troubles apparaissent à l'acquisition de la marche, qui peut être retardée et a tendance à s'effectuer sur la pointe des pieds. Ces signes sont discrets, et c'est seulement vers 3 à 5 ans que les troubles de la marche attirent l'attention avec une difficulté à courir, sauter, monter des escaliers, des chutes fréquentes et la diminution quasi linéaire de la force. Entre 5 et 6 ans les signes cliniques deviennent évidents avec un déficit moteur prédominant dans les muscles de la ceinture pelvienne, et l'exécution de manœuvre de Gowers par l'enfant (*fig. 51*). La position de l'enfant debout est typique avec un bassin basculé en arrière entraînant une lordose lombaire et un abdomen proéminent (*fig. 51*). La marche devient dandinante et la rétraction des tendons d'Achille accentue le déplacement sur la pointe des pieds. Parallèlement une hypertrophie musculaire dans les membres inférieurs se développe et touche les muscles des mollets, et parfois les quadriceps, les fessiers et les vastes externes. Entre 7 et 10 ans le déficit des muscles de la ceinture pelvienne s'accroît, l'enfant ne peut plus se relever seul et les chutes sont de plus en plus fréquentes. Les troubles de la marche s'aggravent considérablement et les muscles des jambes sont atteints : quadriceps, jambiers antérieurs et péroniers latéraux. Le déficit touche également les membres supérieurs avec la ceinture scapulo-humérale, puis s'étend aux triceps, biceps, extenseurs du poignet et fléchisseurs du cou. Les muscles innervés par les nerfs crâniens sont en revanche respectés.



L'amyotrophie progresse dans les muscles atteints cités et on note une diminution ou une absence de réflexe ostéo-tendineux dans les territoires concernés. Au niveau histologique, les biopsies musculaires montrent des fibres musculaires de calibre inégal (certaines atrophiques et d'autres hypertrophiques), et un phénomène de dégénération/régénération. Les zones de régénération sont caractérisées par des fibres de petit diamètre aux noyaux centralisés. Les fibres qui dégèrent sont sujettes à la phagocytose et on trouve une infiltration de cellules inflammatoires composée de macrophages et de lymphocytes CD4+ [116] (voir histologie dans la *fig. 52*).



**Figure 52 – Coupe histologique de muscle de patient atteint de DMD.**

La photographie **A** montre la phagocytose d'un groupe de fibres musculaires nécrotiques par des macrophages infiltrants. La photographie **B** montre un groupement de petites fibres en régénération suite à une nécrose. La photographie **C** montre un stade plus avancé de la maladie avec des fibres de calibre hétérogène et l'augmentation de la quantité de tissu conjonctif endomysial (entre les fibres musculaires). Colorations HE obtenues sur le site internet du « Department of Neurology at Washington University School of Medicine » [117].

Avec la progression de la maladie on constate une métaplasie adipeuse (remplacement des fibres musculaires par des adipocytes) et une fibrose. Les analyses sanguines montrent un taux de CK 50 à 200 fois supérieur à la normale du fait de la nécrose des fibres musculaires. L'étude immunohistochimique où le western blot utilisant un anticorps visant la partie C terminale de la dystrophine révèle une absence totale de la protéine. L'analyse moléculaire montre le plus souvent des délétions du gène de la dystrophine.

L'utilisation du fauteuil roulant devient nécessaire vers 10 à 12 ans quand la perte de la marche survient. L'atrophie musculaire est alors majeure et la paralysie qu'elle entraîne favorise l'apparition de rétractions fibro-musculaires (surtout dans les fléchisseurs), et elle est à l'origine d'attitudes vicieuses irréductibles des articulations et du dos. L'état nutritionnel du patient est à surveiller de près car au cours de l'évolution de la maladie obésité et dénutrition peuvent apparaître. En effet l'activité physique baisse en phase symptomatique et plus particulièrement lors de la perte de la marche, de ce fait la dépense énergétique est moindre et l'énergie excédentaire sera accumulée sous forme de graisse. Avec la progression de la fonte musculaire et l'apparition de troubles de la déglutition, une dénutrition peut survenir, qui

participe à l'atrophie musculaire tandis que le tissu adipeux est plus longtemps conservé. Notons également qu'environ un tiers des patients présente un retard mental [118], mais contrairement à l'atteinte musculaire, ce phénotype n'est pas progressif. La faiblesse des muscles lisses entraîne également des désordres gastro-intestinaux du fait d'une motilité intestinale réduite.

Vers la vingtième année les muscles squelettiques sont tous complètement paralysés à l'exception des muscles faciaux, pharyngés et oculomoteurs. Les fléchisseurs des doigts gardent également une très légère force. Une atteinte cardiaque existe dans la majorité des cas, il s'agit d'une cardiomyopathie dilatée avec insuffisance cardiaque prédominante dans le ventricule gauche. Elle peut être détectée dès 5 ans (mais les signes cliniques n'apparaissent qu'à 12 ans) et sera la cause de décès dans 10 % des cas environ. Le déficit du diaphragme et des autres muscles respiratoires est à l'origine d'une insuffisance respiratoire sévère, de complications (encombrement bronchique et surinfections broncho-pulmonaires), et d'épisodes de chute de la saturation de l'hémoglobine. La faiblesse des muscles lisses réduit également la capacité de relâchement des vaisseaux sanguins durant l'augmentation du flux sanguin ce qui participe aux problèmes respiratoires. L'insuffisance respiratoire apparaît vers 14 ans puis s'aggrave et est généralement à l'origine du décès. Les progrès réalisés dans la prise en charge de cette pathologie ont permis un léger allongement de l'espérance de vie des patients, l'âge du décès variant entre 10 et 29 ans en moyenne.

### **1.3. Traitements**

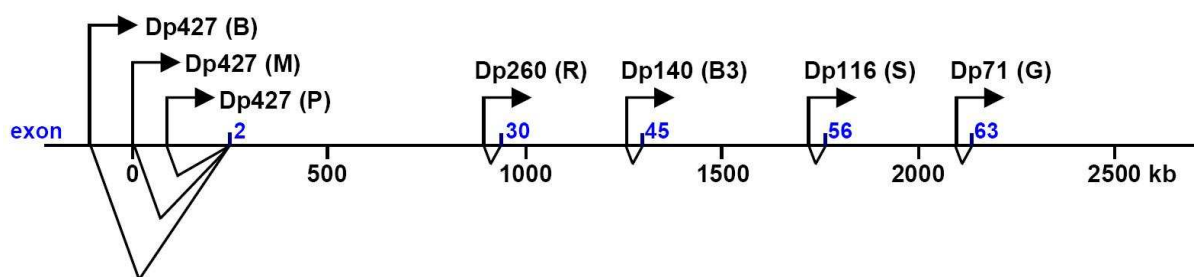
Actuellement le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne est essentiellement symptomatique et concerne bien sûr les muscles squelettiques, mais également le cœur, l'appareil respiratoire et l'état nutritionnel et la qualité de la déglutition. Le traitement de l'atrophie musculaire passe donc par une kinésithérapie adaptée aidée de balnéothérapie afin de maintenir le muscle dans le meilleur état fonctionnel possible tout en prévenant l'apparition d'attitudes vicieuses à l'origine de déformations ou encore de rétractions musculo-tendineuses. Au cours de l'évolution de la maladie l'apparition de déformations affectant la fonction motrice pourra être corrigée par l'utilisation d'orthèse ou encore par chirurgie avant d'envisager l'utilisation de la chaise roulante quand la marche ne sera plus possible. L'insuffisance respiratoire est traitée par assistance respiratoire non invasive en pression positive, mais peut nécessiter une trachéotomie lorsque l'autonomie respiratoire est trop faible (les techniques actuelles permettent de maintenir l'usage de la parole). L'encombrement bronchique – venant compliquer l'insuffisance respiratoire – est traité par drainage et par expectoration à condition que le débit expiratoire du malade soit suffisant. L'atteinte cardiaque (cardiomyopathie) est traitée par prescription de diurétiques et d'anti-hypertenseurs (inhibiteurs de l'enzyme de conversion). La prise en charge des patients atteints de dystrophie musculaire est donc multidisciplinaire.

Il n'existe aucun traitement curatif à ce jour et seule l'administration d'anti-inflammatoires stéroïdiens (prednisone ou deflazacort) permet un ralentissement significatif de la progression de la dystrophie de Duchenne [119].

## 1.4. La dystrophine

### a) Gène *DMD* et isoformes de la dystrophine

Le gène *DMD* responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne a été localisé en Xp21.2 par Monaco et al. en 1986 [120], puis le clonage complet de l'ADNc fut achevé en 1987 par Koenig et coll. [121]. Il s'agit du plus grand gène humain connu actuellement : il s'étend sur 2,5 megabases soit environ 1 % du chromosome X ou encore 0,1 % du génome humain [122]. Cependant seul 0,5 % du gène code pour la dystrophine, avec en tout 79 exons produisant un ARNm faisant 14 kilobases (kb) [123]. Cette taille explique le taux élevé de mutations, le plus souvent des délétions (50 % des cas [121, 124]), les cas de duplications, de mutations ponctuelles et de mosaïcisme germinale étant plus rares.



**Figure 53 – Organisation du gène de la dystrophine humaine.**

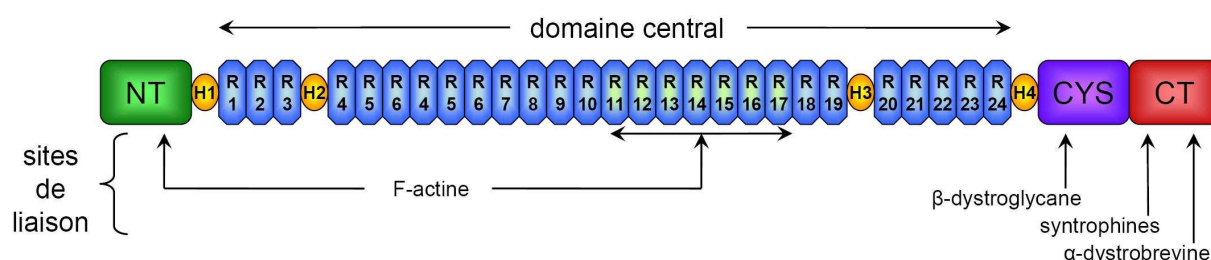
Ce schéma représente le gène *DMD* humain de 2,5 megabases. Les promoteurs connus sont symbolisés par des flèches et les exons auxquels les transcrits correspondants se rabotent sont marqués en bleu. Adapté de Blake et coll. [125].

L'expression du gène *DMD* est sous le contrôle d'au moins 7 promoteurs connus, auxquels viennent s'ajouter des événements d'épissage alternatif, régulant l'expression de différentes isoformes de la dystrophine de manière cellule- et temps/développement-spécifique [126]. Les isoformes peuvent être classées en 2 catégories : celle de même taille que la dystrophine musculaire, soit environ 427 kDa, et les isoformes plus courtes (voir **fig. 53**). Les 3 isoformes longues sont nommées Dp427-M, Dp427-B et Dp427-P du fait de leur taille d'environ 427 kDa et de leur type cellulaire (M pour musculaire, B pour cerveau et P pour les cellules de Purkinje). Les ARNm transcrits à partir de ces promoteurs comportent un exon 1 spécifique raccordé aux 78 autres exons du gène. D'autres isoformes plus courtes sont générées à partir de promoteurs internes tissus spécifiques, utilisant un premier exon qui leur est propre, et qui est rabouté respectivement aux exons 30, 45 et 56. Cela aboutit à la production de protéines plus courtes également nommées en fonction de leur poids moléculaire : Dp260, Dp140,

Dp116 qui sont exprimées préférentiellement dans la rétine, le système nerveux central et dans les cellules de Schwann (et l'encéphale embryonnaire) respectivement. L'isoforme Dp71 rabouté à l'exon 63 (et Dp40) est exprimée de façon ubiquitaire dans les tissus non musculaires. Le gène *DMD* produit également de nombreuses autres isoformes issues d'épissages alternatifs tissus-spécifiques ou par l'utilisation d'un site alternatif de polyadénylation localisé dans l'intron 70 (isoforme Dp40). En fonction des mutations sur le gène *DMD*, il se peut qu'une ou plusieurs de ces isoformes se retrouvent absentes chez les malades, ainsi Dp427-B pourrait causer le retard mental parfois observé dans certains cas DMD ou BMD [127, 128]. Plus une mutation est distale sur le gène *DMD*, plus elle affecte l'expression d'un grand nombre d'isoformes courtes de la dystrophine. La fonction précise des différentes isoformes n'a pas été véritablement élucidée. Mais il est supposé que le rôle des isoformes de 427 kDa soit comparable à celui de la forme musculaire Dp427-M dont nous allons voir la fonction et les partenaires plus en détail.

### b) La dystrophine et ses protéines associées

La protéine codée par le gène *DMD* (Dp427-M) fut identifiée par Hoffman et coll. en 1987 suite à l'isolement du locus du gène par approche de génétique inverse, elle fut donc nommée « dystrophine » d'après le phénotype [123]. Par la suite d'autres protéines trouvées par clonage positionnel de gènes humains furent nommées en utilisant ce même suffixe accolé au nom de la maladie (par exemple la huntingtine). La dystrophine a une masse moléculaire de 427 kDa, elle possède 3685 acides aminés et ne représente qu'environ 0,002 % des protéines totales du muscle strié normal [129]. En revanche elle constitue 5 % de la fraction cytosquelettique de la membrane plasmique du muscle squelettique (appelé sarcolemme) [130]. Koenig et coll. ont montré que la dystrophine possède 4 domaines distincts partageant des caractéristiques avec la spectrine et de l' $\alpha$ -actinine [131]. Ils lui prédirent également une forme de bâtonnet d'approximativement 150 nm de long.



**Figure 54 – Domaines protéiques de l'isoforme musculaire de la dystrophine humaine.**

Le diagramme montre les 4 domaines principaux : le domaine N terminal (NT), le domaine central contenant 24 unités répétées homologues à la spectrine (R) et les 4 régions charnière (H pour Hinge), le domaine riche en cystéine (CYS) et le domaine C terminal (CT).

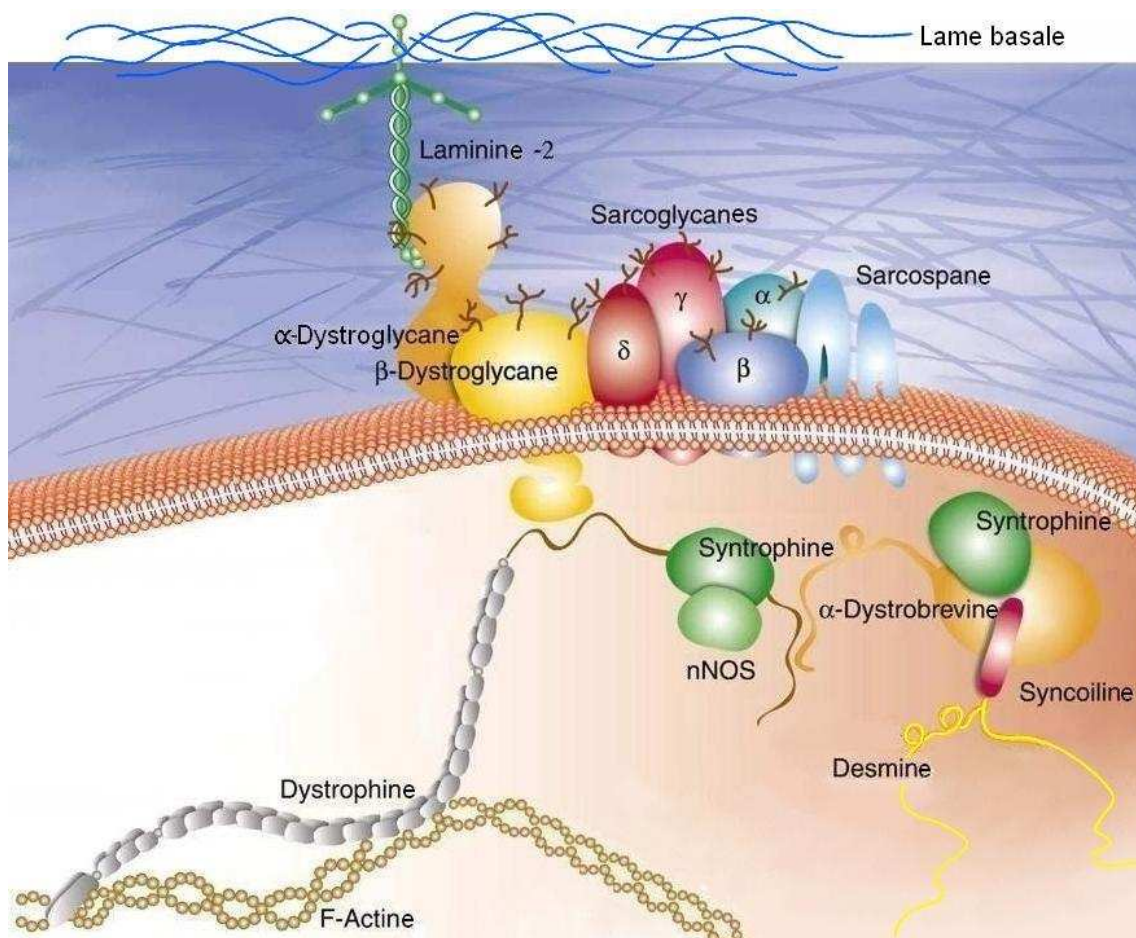
Les 4 domaines qui composent la dystrophine sont illustrés dans la *figure 54* et sont décrits ci-après :

- **Le domaine N-terminal** est composé d'environ 240 acides aminés et possède une homologie avec la région de l' $\alpha$ -actinine et de la  $\beta$ -spectrine liant la F-actine [126].

- **Le domaine central** est composé de 2840 acides aminés répartis en 24 unités répétées d'environ 109 acides aminés chacune, similaires aux éléments répétés  $\alpha$ -hélicoïdaux de l' $\alpha$ -actinine et de la  $\beta$ -spectrine. Il contient quatre zones charnières non répétées, riches en résidus proline, lui conférant de la flexibilité [132]. Ce domaine lie également la F-actine par interactions électrostatiques [133].

- **Le domaine riche en cystéine** s'étend des acides aminés 3361 à 3685. Il possède deux sites potentiels de fixation au calcium et un site de fixation au zinc (domaine ZZ). Ce domaine est capable de se lier au  $\beta$ -dystroglycane du sarcolemme [134].

- **Le domaine C-terminal** se compose des 325 derniers acides aminés et contient le site de liaison aux protéines cytoplasmiques sous-sarcolemmales dystrobrevines et syntrophines. Il interagit également avec le sarcolemme par l'intermédiaire du  $\beta$ -dystroglycane [134], une glycoprotéine associée à la dystrophine.



**Figure 55 – Complexe des protéines associées à la dystrophine (DGC).**  
Adapté de Ehmsen et coll. [135].

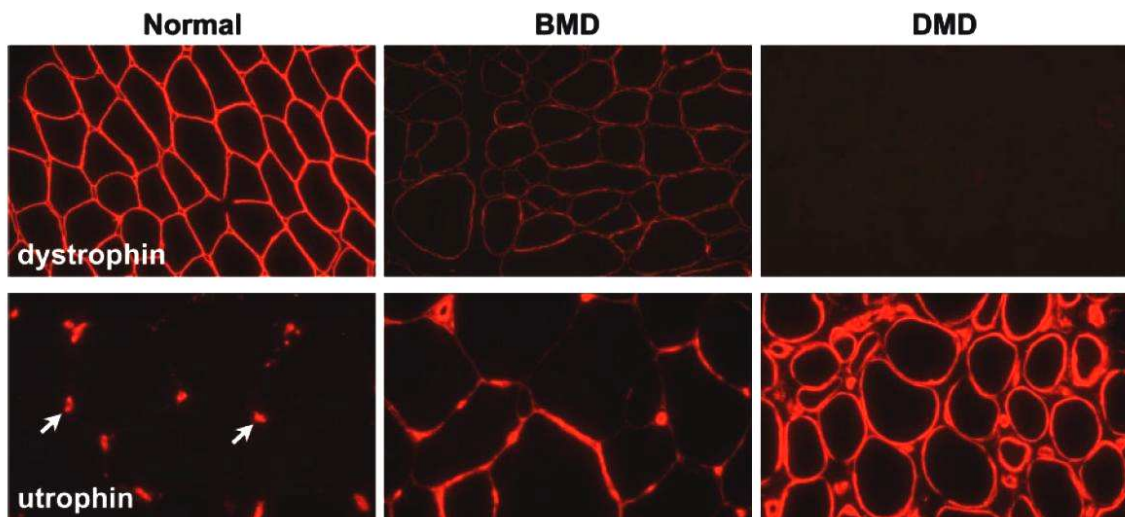
La dystrophine est située sous le sarcolemme et interagit avec de nombreuses protéines pour former un complexe transmembranaire reliant les myofilaments de F-actine du cytosquelette à la laminine  $\alpha 2$  de la matrice extracellulaire entourant chaque fibre musculaire (lame basale). Ce complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC en anglais ou encore DGC pour dystrophin-glycoprotein complex) est présenté schématiquement dans la *figure 55* et est constitué de 3 sous groupes que sont : les dystroglycanes, les sarcoglycanes et le sarcospane, et enfin un sous groupe cytoplasmique. Dystroglycanes et sarcoglycanes sont transmembranaires et étaient anciennement appelés « DAG » (pour glycoprotéines associées à la dystrophine en anglais). On trouve l' $\alpha$ -dystroglycane (ou 156-DAG) lié à la laminine  $\alpha 2$  de la lame basale, et le  $\beta$ -dystroglycane (ou 43-DAG) liant la dystrophine et l' $\alpha$ -dystroglycane. Il existe 5 sarcoglycanes formant un complexe protéique :  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - et  $\epsilon$ -sarcoglycanes. Les sarcoglycanes alpha à delta sont préférentiellement ou exclusivement exprimés dans le muscle alors que l'épsilon-sarcoglycane est ubiquitaire. Le  $\gamma$ -sarcoglycane interagit avec la dystrophine et le  $\delta$ -sarcoglycane interagit avec le complexe dystroglycane. Les mutations empêchant l'expression de l'un des sarcoglycanes du complexe sont responsables de différentes dystrophies des ceintures. La présence du sarcospane à la membrane est dépendante de l'expression normale des sarcoglycanes, elle-même dépendante de la présence de dystrophine. Enfin le complexe cytoplasmique comprend la dystrophine, les syntrophines, l'enzyme monoxyde d'azote synthétase de type neuronal (nNOS) et l'alpha dystrobrevine. Il existe trois syntrophines :  $\alpha 1$ -,  $\beta 1$ - et  $\beta 2$ -syntrophines, toutes trois exprimées dans le muscle au niveau des jonctions neuromusculaires ; elles permettent en effet l'accumulation locale de canaux sodiques voltage-dépendants. L' $\alpha 1$ -syntrophine est cependant retrouvée sous le sarcolemme tout le long des fibres musculaires striés squelettiques, de même pour la  $\beta 1$ -syntrophine mais seulement dans les fibres musculaires rapides. La nNOS est indirectement liée à la dystrophine via l' $\alpha 1$ -syntrophine. Cette enzyme est exprimée tout le long du sarcolemme mais est plus abondante au niveau de la membrane post synaptique des jonctions neuromusculaires. Elle est stimulée par l'acetylcholine et le glutamate, et est impliquée dans la modulation de la contraction musculaire, le métabolisme des glucides et la transmission de l'influx nerveux.

En plus de toutes les protéines du complexe associé à la dystrophine que nous venons de voir, la dystrophine possède 3 protéines homologues codées par d'autres gènes. Celles-ci peuvent se substituer à la dystrophine selon la localisation cellulaire du complexe – comme l'utrophine – ou encore interagir directement avec la dystrophine comme c'est le cas pour une des dystrobrevines (alpha). Les protéines homologues à la dystrophine que sont la  $\beta$ -dystrobrevine et la DRP2 ne sont cependant pas exprimées dans les cellules musculaires et n'interagissent pas avec la dystrophine. L'utrophine est homologue à la M-dystrophine et est exprimée de manière ubiquitaire. Chez l'adulte on la retrouve plus particulièrement dans le muscle lisse, les cellules endothéliales et les cellules de Schwann. Contrairement à la dystrophine seule la partie N-terminale de l'utrophine est capable de lier la F-actine [136]. L'utrophine relie le cytosquelette de F-actine à la membrane basale via l' $\alpha$ -dystroglycane au

niveau des jonctions neuromusculaires. En revanche au stade fœtal et embryonnaire elle est exprimée sous le sarcolemme des myofibres. L'utrophine est progressivement remplacée par la dystrophine dès les stades tardifs de la gestation [137]. Son expression dans le muscle adulte en dehors de la jonction neuromusculaire est limitée aux myoblastes et fibres en régénération [138], et est également retrouvée le long du sarcolemme des fibres DMD [139]. Le complexe protéique associé à la dystrophine est de composition variable en fonction du tissu (muscle squelettique, cardiaque ou lisse) et de sa localisation cellulaire (sarcolemme ou membrane post synaptique des jonctions neuromusculaires). En résumé comme présenté dans la **figure 55**, le complexe de la fibre musculaire squelettique comprend donc la dystrophine (ou l'utrophine aux jonctions neuromusculaires), les deux dystroglycanes, les sarcoglycanes  $\alpha$  à  $\delta$ , le sarcospane, deux des trois syntrophines, l' $\alpha$ -dystrobrevine et nNOS.

### 1.5. Pathophysiologie des dystrophies musculaires de Duchenne et Becker

Dans la maladie de Duchenne les délétions du gène DMD sont soit localisées dans les exons, soit entraînent des pertes du cadre de lecture. La protéine produite est alors tronquée et non fonctionnelle. L'absence de dystrophine sauvage est associée à une diminution de l'immunomarquage de toutes les glycoprotéines associées à la dystrophine (dystroglycanes, sarcoglycanes et sarcospane), la nNOS est trouvée anormalement diffuse dans le sarcoplasme au lieu d'être sous-sarcolemmale. De même on observe une surexpression de la protéine utrophine (voir **fig. 56** ci-dessous).



**Figure 56 – Immunomarquage de la dystrophine et de l'utrophine dans le muscle dystrophique.** Expression de dystrophine (en haut) et de l'utrophine (en bas) dans des muscles de patients sains (normal), atteints de BMD ou de DMD. Les flèches indiquent les capillaires endomyosiaux qui expriment fortement l'utrophine. D'après Blake et coll. [125].

Actuellement il existe différentes hypothèses concernant la pathophysiologie de DMD. Les deux principales étant l'hypothèse structurale et l'atteinte de l'homéostasie du calcium. L'hypothèse d'un rôle structural de la dystrophine maintenant la stabilité membranaire découle du constat d'une libération d'enzyme spécifique du muscle (CK) dans le sang des patients dystrophiques, mais également de l'observation au microscope électronique de lésions dites « delta » sur le sarcolemme. De plus, la dystrophine possède une analogie structurale de son domaine central avec la spectrine, une protéine permettant la déformabilité et le maintien de l'intégrité des globules rouges durant le franchissement des capillaires [140]. En effet la dystrophine crée un lien mécanique entre le cytosquelette de la fibre musculaire et la matrice extracellulaire via le complexe DGC. L'absence des protéines du complexe DGC au sarcolemme consécutive à l'absence de dystrophine conduit à une faiblesse et une vulnérabilité accrue de la membrane musculaire durant les tensions de la contraction musculaire [125, 141, 142]. Au niveau cytoplasmique la dystrophine interagit avec le cytosquelette de F-actine, et avec les filaments intermédiaires indirectement à travers la syncoiline qui interagit avec la desmine [143] (voir *fig. 55* précédente), mais il a également été montré récemment une interaction avec le troisième composant du cytosquelette : le microtubule [144]. Des travaux suggèrent d'ailleurs que la déstructuration du cytosquelette de microtubule dans le muscle dystrophique consécutive à l'absence de dystrophine contribue à l'atteinte structurale mais également à une répartition anormale de l'appareil de golgi dans la fibre musculaire [145]. Il a également été observé une augmentation de l'influx calcique dans le muscle dystrophique principalement via les canaux calciques mécano-sensibles voltage indépendants [146, 147]. Malgré cela un niveau de calcium cytoplasmique quasi physiologique est maintenu dans la fibre musculaire, mais en présence de microlésions du sarcolemme la cellule n'est plus en mesure de réguler l'influx massif d'ions calcium. Ceci active les protéases calcium dépendantes, en particulier les calpaïnes [148, 149], et accroît la destruction des composants membranaires, ce qui participe à l'entrée du calcium. La surcharge calcique provoque un stress mitochondrial aboutissant à une crise métabolique et une éventuelle nécrose [150]. Enfin, il semblerait que l'absence de nNOS (synthétisant normalement le NO, inducteur de vasodilatation) contribue à la pathologie du fait d'une vasodilatation adaptative défailante lors de l'exercice musculaire. Il s'en suivrait une dérégulation du pH intracellulaire [151] et une ischémie [152]. L'ensemble de ces phénomènes induit une nécrose des fibres musculaires, et provoque un état inflammatoire chronique contribuant à l'atteinte secondaire du muscle. Cette description classique de la pathophysiologie de DMD articulée autour de l'atteinte structurale est valable mais n'explique pas entièrement le phénotype. Je reviendrais donc en détail dans le chapitre « Inflammation, TNF et DMD » sur les derniers travaux de recherche sur l'initiation de la pathologie, et en particulier l'hypothèse de la dérégulation de la signalisation intracellulaire et de l'inflammation.

Je terminerai ce chapitre consacré à la pathophysiologie de DMD en mentionnant deux autres pathologies liées à une mutation du gène de la dystrophine : les cardiopathies dilatées et la dystrophie de Becker (BMD). Environ 20 000 personnes seraient atteintes de

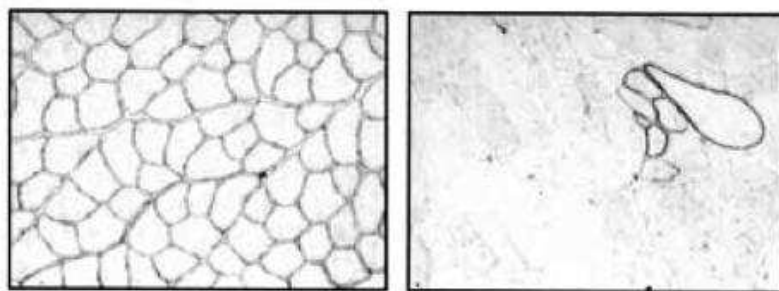


cardiopathie dilatée en France, et parmi elles 30 % ont une origine génétique. Parmi ces 30 % se trouvent des mutations du gène de la dystrophine provoquant une perte de l'expression ou de la fonction de la dystrophine restreinte au cœur. On observe ainsi dans ces cas un taux élevé de créatine kinase dans le sang, mais l'atteinte primaire est cardiaque sans qu'il y ait de phénotype musculaire contrairement à DMD.

La BMD est moins fréquente que DMD (environ 1 homme sur 20 000) et son phénotype est similaire à DMD en terme de distribution de l'atteinte musculaire [118], cependant le phénotype est beaucoup plus variable du fait de la présence d'une dystrophine de taille, stabilité, et fonctionnalité différente d'un malade à l'autre. On retrouve la plupart du temps une élévation du taux de créatine kinase et une hypertrophie des muscles du mollet, et parfois une atteinte cardiaque. L'évolution de la maladie est plus lente et l'incapacité locomotrice peut survenir dans l'adolescence ou ne jamais se manifester, ainsi un patient Becker peut vivre quasi normalement avec seulement des crampes et des douleurs musculaires dans les formes les plus légères. Ce phénotype Becker, moins grave, est dû à la présence de la protéine dystrophine qui est tronquée mais fonctionnelle. Contrairement aux patients DMD, l'expression de dystrophine de taille plus courte que la normale est détectée chez les patients BMD. Le niveau d'expression de la dystrophine est quasi normal chez les patients les moins affectés, ou réduit dans les formes les plus sévères (*fig. 56*) [153], ce qui suggère que la quantité de protéine est plus importante que sa taille dans cette pathologie. Il apparaît comme postulé par Monaco et ses collaborateurs en 1988 [154] que dans la majorité des cas les délétions dans DMD provoquent une interruption du cadre de lecture, induisant l'apparition de mutations ou de codons stop prématurés, alors que BMD serait due à des délétions préservant le cadre de lecture (d'où une protéine plus courte partiellement fonctionnelle).

### 1.6. Modèle murin *mdx*

Bien qu'il existe d'autres modèles animaux de la dystrophie de Duchenne comme le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy), le chat HFMD (Hypertrophic Feline Muscular Dystrophy) et des invertébrés, je décrirais seulement la souris *mdx* qui a été utilisée dans mes études. La souris *mdx* (pour X chromosome-linked muscular dystrophy) est le premier modèle animal de DMD découvert et le plus étudié. Cette souris a été découverte incidemment par Bulfield en 1981 dans la lignée C57BL/10ScSn (B10) suite au dosage biochimique de routine d'un taux élevé de l'isoforme musculaire de la créatine kinase [155]. Il a par la suite été montré l'absence de dystrophine dans les muscles de la souris *mdx*. En effet cette souris modèle spontanée possède une mutation non sens C vers T au nucléotide 3185 sur le gène de la dystrophine dans l'exon 23 faisant apparaître un codon stop (TAA) à la place d'une glutamine (CAA). Il en résulte l'arrêt prématuré de la traduction et la production d'une dystrophine tronquée faisant 27 % de la taille de la dystrophine normale, qui est rapidement dégradée et ne peut être détectée dans la fibre musculaire [156].



**Figure 57 – Immunomarcage de la dystrophine dans le muscle de la souris *mdx*.**

Expression de la dystrophine dans le muscle tibialis antérieur révélé avec un anticorps contre la partie C terminale. On note la présence de dystrophine au sarcolemme des souris saines B10 (à gauche) et l'absence de marquage dans le muscle *mdx* (à droite) en dehors de fibres révertantes. D'après Ferrer et coll. [157].

Seules quelques fibres révertantes expriment une dystrophine détectable avec un anticorps contre la partie C terminale (voir *fig. 57*) ; ce phénomène est dû à des mutations secondaires somatiques ou à un épissage anormal restaurant le cadre de lecture et permettant la transcription puis la traduction d'un ARNm fonctionnel mais raccourci [158-160]. On trouve entre 0,1 et 1 % de fibres révertantes dans le muscle *mdx*, cette quantité augmentant avec l'âge [160, 161].

La mutation étant située avant le promoteur Dp260 (cf *fig. 53* p85), elle n'affecte donc que la M-dystrophine, les isoformes courtes étant exprimées. La souris *mdx* possède une transmission de la mutation sur un mode récessif lié à l'X tout comme chez l'homme. La dystrophine est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution des vertébrés, et son gène est probablement situé sur le chromosome X chez tous les mammifères placentaires. La souris *mdx* est fertile et les souris utilisées en recherche sont les mâles dystrophiques et les femelles homozygotes. La taille des portées est deux fois moindre que la normale et la mortalité des souriceaux avant 4 semaines est multipliée par trois [162]. Le phénotype est normal et sans amyotrophie visible jusqu'à l'âge de 18 mois ; la souris *mdx* est nettement moins sévèrement touchée au plan clinique ou lésionnel que le malade DMD. Sa prise de poids est normale, voire même légèrement supérieure à la souris sauvage C57BL/10ScSn (par la suite nommée B10) du fait d'une hypertrophie musculaire [163]. Les souris femelles hétérozygotes sont asymptomatiques. Le taux de créatine kinase est anormalement élevé dès les premiers jours de vie et ne baisse que tardivement vers 1 an en même temps que la nécrose musculaire diminue [164]. La faiblesse musculaire est minime et transitoire chez la souris jeune [165], et chez la souris âgée les résultats sont contradictoires puisque selon l'auteur, on note soit une baisse de force après 20 mois comparé aux souris saines [166] ou aucune différence [167]. Cependant, le poids de la *mdx* diminue nettement après 52 semaines et sa durée de vie est inférieure aux souris B10 (20 à 24 mois contre 30) [168]. La souris *mdx* présente au niveau cérébral un déficit de la mémoire au long terme associé à une moindre plasticité synaptique [169]. Au niveau histologique le phénotype lésionnel des muscles squelettiques de la souris *mdx* évolue en **5 phases distinctes**. Au **stade pré-nécrotique** avant l'âge de trois semaines seule une légère hypertrophie diffuse est visible avec quelques fibres

hyalines (grande fibre arrondie au cytoplasme hyperacidophile vitreux) surtout dans les muscles des membres [170]. Puis une **vague de nécrose musculaire** massive apparaît brutalement à partir de trois semaines et touche de grands volumes de fibres adjacentes. Entre 3 et 5 semaines la majorité des myofibres va subir une ou plusieurs vagues de nécrose/régénération [156]. L'apparition de nouveaux myotubes est visible 2 à 3 jours après la nécrose [171]. A cette étape la répartition des muscles atteints rappelle les groupes touchés dans DMD : les muscles des membres sont plus sévèrement touchés que ceux de la tête, du cou et du tronc, alors que les muscles oculomoteurs sont épargnés [170].

Le pic de nécrose situé entre 3 et 5 semaines selon les auteurs est suivi d'une **régénération musculaire** compensatrice intense et efficace jusqu'à l'âge de 12 semaines. Les fibres ayant régénéré sont repérables à leur petite taille, leur basophilie, et un noyau restant longtemps central (70 à 80 % des fibres sont centronuclées vers 2-3 mois). On observe durant cette période (après 3 semaine d'âge) une grande hétérogénéité du calibre des fibres dans les muscles des membres : le diamètre des fibres chez *mdx* étant compris entre moins de 10 et plus de 140  $\mu\text{m}$  alors que dans un muscle sain l'intervalle est compris entre 20 et 70  $\mu\text{m}$  [172]. Après le pic les fibres touchées par la nécrose sont isolées. Enfin la quantité de mastocytes conjonctifs est multipliée par trois dans le muscle [173].

Entre 3 mois et un an la pathologie de la souris *mdx* entre dans une **phase dystrophique légère et chronique**. En effet la nécrose se stabilise à un niveau bas avec de rares fibres nécrosées, de petits groupes de fibres isolées en régénération, la persistance de noyaux centraux dans plus de 80 % des fibres et une absence de fibrose [156]. On observe encore une hétérogénéité de la taille des fibres, notamment du fait de la présence de fibres hypertrophiées – dont beaucoup sont fragmentées – augmentant en moyenne de 50 % la taille des fibres de souris *mdx* à 6 mois [168]. Le phénotype musculaire de la souris *mdx* adulte est donc différent de l'atteinte chez le malade DMD, et ceci est souvent attribué à une régénération efficace alors que dans le muscle DMD les cycles de nécrose et régénération épuisent le stock de cellules souches myogéniques (cellules satellites) et les fibres nécrosées sont remplacées par du tissu conjonctif et adipeux. Ce point est bien illustré par les souris knock-out (KO) pour MyoD (important facteur de différenciation myogénique). En effet la souris KO MyoD a un phénotype pratiquement normal alors que les doubles KO MyoD/dystrophine (souris *MyoD<sup>-/-</sup>/mdx*) présentent une myopathie beaucoup plus sévère que *mdx* et meurent en 6 à 20 semaines [174].

Après 1 an et jusqu'à l'âge de la mort (2 ans) le phénotype *mdx* progresse jusqu'à un **état lésionnel sévère** dans le muscle squelettique strié touchant principalement les muscles proximaux des membres [170]. Les fibres en cours de régénération ou hypertrophiques se raréfient et les fibres dégénératives et nécrotiques persistent de manière isolée. Entre 12 et 15 mois la fragmentation s'intensifie parallèlement à une atrophie des fibres et à une fibrose endomysiale [168]. Dans les derniers mois de vie le phénotype lésionnel est sévère et très proche de DMD [175], la fibrose est marquée et on peut parfois observer une infiltration de tissu adipeux blanc.

Notons que le diaphragme de la souris *mdx* présente une atteinte à lésions progressives plus prononcées que dans les autres muscles squelettiques, et qui modélise très bien l'atteinte observable chez les enfants atteints de DMD. Le diaphragme de la souris *mdx* présente une nécrose d'amas de quelques fibres dès 25 jours accompagnée d'une inflammation mononucléée marquée. Après 1 mois la nécrose continue et contrairement aux autres muscles la régénération est moins efficace puisqu'entre 2 et 4 mois seulement 35 % de fibres sont centronuclées [172]. Dès 6 mois la taille des fibres du diaphragme est hétérogène et en moyenne inférieure aux témoins. Les fibres sont progressivement remplacées par du tissu conjonctif et un peu de tissu adipeux. En fin de vie les fibres rapides de type II initialement prédominantes sont éliminées au profit de fibres de type I et le diaphragme devient un « muscle lent » [170].

### 1.7. Stratégies de thérapie génique pour la dystrophie musculaire de Duchenne

Actuellement, un grand nombre de stratégies thérapeutiques innovantes sont étudiées, voire testées chez l'animal ou chez l'humain afin d'améliorer la qualité de vie et/ou l'espérance de vie des malades. Parmi celles-ci on retrouve des approches pharmacologiques, des thérapies cellulaires et enfin des approches de thérapies géniques. Je vais maintenant présenter une liste non exhaustive de différentes thérapies géniques actuellement en développement pour traiter la DMD, afin de situer le contexte de l'étude que j'ai menée.

#### a) Approche correctrice : la dystrophine

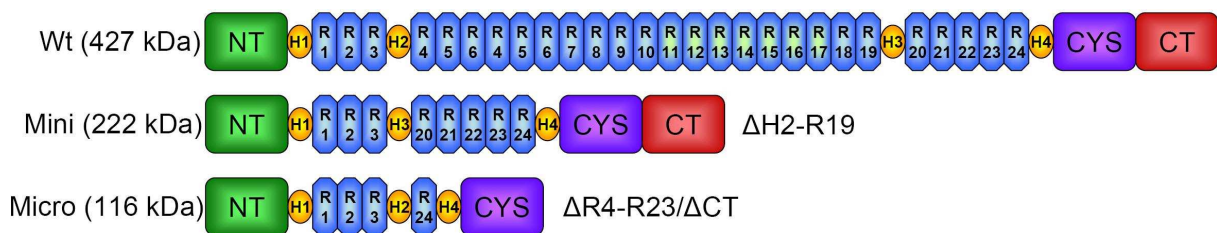
Il existe **trois grandes approches** de thérapie génique visant à restaurer la localisation du DGC (complexe de protéines associé à la dystrophine) au sarcolemme. Pour simplifier il s'agit d'exprimer dans le muscle une dystrophine de taille complète, ou bien une dystrophine tronquée mais partiellement fonctionnelle, ou encore une protéine homologue comme l'utrophine.

La situation « idéale » consisterait à corriger une mutation *in situ*, mais une telle application est limitée puisque la majorité des mutations dans le gène DMD correspond à de grandes délétions. Une des stratégies de réparation utilisant l'outil chiméraplaste a été appliquée à la souris *mdx* [176] et au chien GRMD [177] sans grande efficacité. Les chiméraplastes sont des oligonucléotides ADN/ARN permettant la correction de l'ADN par échange du nucléotide muté avec le sauvage (ou par insertion ou délétion d'une ou plusieurs paires de bases). Cet outil exploite le mécanisme endogène de réparation de mésappariement intranucléaire pour exciser la mutation et la remplacer par le nucléotide sauvage apporté.

Le transfert de gène additif quant à lui présente une première difficulté : l'ADNc de la dystrophine fait 14 kb (séquence codante de 11 kb) ce qui excède la capacité de la majorité des vecteurs de thérapie génique efficaces dans le muscle. L'**expression de novo de la**

**dystrophine entière** a donc été obtenue par approche non virale apportant l'ADNc dans un plasmide chez la souris *mdx* [178, 179] et chez l'homme [180], ou encore avec un vecteur adénoviral « gutless » de grande capacité d'encapsulation [181]. Mais ces deux systèmes de vectorisation sont peu efficaces ou immunogène dans le muscle ce qui limite le nombre de fibres musculaires exprimant la dystrophine.

Dans les années 90 un certain nombre d'équipes notèrent des épissages d'exons dans la dystrophine sans conséquence fonctionnelle apparente [182-184]. De ce constat est né l'idée de construire des **minigènes de dystrophine** que l'on pourrait insérer dans des vecteurs viraux efficaces dans le muscle ; pour un ordre d'idée un ADNc de minidystrophine qualifié de « Becker » peut faire de l'ordre de 6,5 kb, mais des constructions plus petites furent développées (voir *fig. 58*).



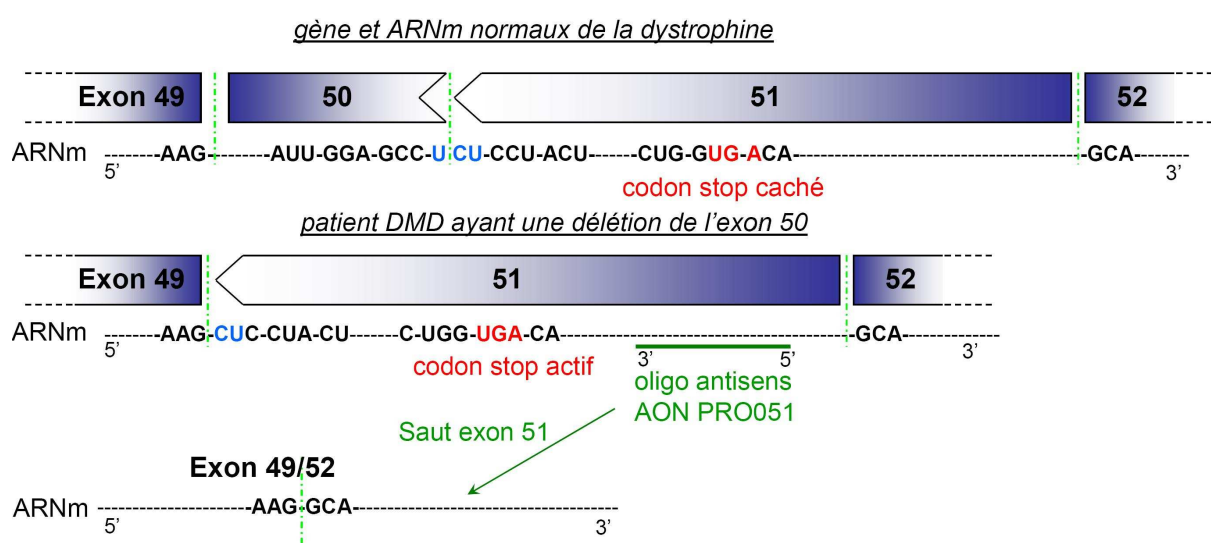
**Figure 58 – Mini- et micro-dystrophines.**

Ce schéma présente 2 exemples de dystrophines tronquées générées à partir de délétions ( $\Delta$ ) dans l'ADNc sauvage : une mini- et une micro-dystrophine. La dystrophine musculaire sauvage est présentée en haut (wt). Les 4 types de domaines protéiques sont indiqués comme suit : domaine N terminal (NT), domaine central (R) et régions charnières (H), domaine riche en cystéine (CYS), et domaine C terminal (CT). Notons que la micro-dystrophine présentée n'a plus de domaine CT, ce qui empêche son interaction avec la nNOS via la liaison à la syntrophine. Adapté de Blankinship et coll. [185].

Ces minigènes furent utilisés avec succès dans la souris *mdx* : avec par exemple le vecteur adénoviral codant une mini-dystrophine [186] puis l'AAV codant la mini-dystrophine [187], et enfin l'AAV codant une micro-dystrophine [188, 189] permettant un retour à un aspect histologique normal et une résistance aux dommages induit par l'exercice localement dans les muscles injectés. Notons cependant que certains de ces minigènes peuvent ne pas contenir des séquences codant pour des domaines fonctionnels importants (liaison à nNOS par exemple [190]).

Dans le même ordre d'idée il fut observé chez les malades et dans *mdx* des fibres dites révertantes capables de produire un ARNm fonctionnel mais raccourci de la dystrophine (suite à des mutations secondaires somatiques ou à un épissage anormal restaurant le cadre de lecture). Ce phénomène fut donc proposé en temps qu'application de thérapie génique [159]. Ces stratégies de **saut d'exon** (exon skipping) utilisent des acides nucléiques antisens interférant avec l'épissage spécifique d'un ou plusieurs exons mutés au niveau de l'ARNm en veillant à conserver le cadre de lecture entre les exons raboutés. Ces approches mutations-spécifiques ont pour but de revenir vers un phénotype de type Becker (phénotype moins sévère que DMD car une dystrophine tronquée partiellement fonctionnelle est exprimée). Le

saut d'exon fut testé avec succès *in vitro* sur des myotubes de patient DMD [191, 192], et dans la souris *mdx* à l'aide d'oligonucléotide ARN/ADN [193], d'oligonucléotides antisens 2'-O-méthylés [194], et enfin au laboratoire Généthon avec une unique injection d'AAV codant une séquence antisens liée à un snRNA U7 modifié (petit ARN nucléaire impliqué dans le spliceosome) [1]. Un essai clinique de phase I fut plus récemment mené chez quatre malades DMD ayant une délétion de l'exon 50. Ils reçurent une injection intramusculaire d'oligo antisens intra-exonique PRO051 efficace pour le saut de l'exon 51. Cet essai encourageant montra l'expression de dystrophine au sarcolemme dans 64 à 97 % des fibres musculaire des biopsies. Un essai clinique de phase I/II en injection systémique est en cours [195]. La **figure 59** ci-après illustre l'exon skipping à travers l'exemple du saut de l'exon 51 humain que nous venons d'aborder.



**Figure 59 – Saut de l'exon 51 de la dystrophine humaine.**

Ce schéma représente la stratégie de saut de l'exon 51 chez le malade DMD ayant une délétion de l'exon 50. Les jonctions entre exons sont représentées par des lignes verticales en pointillés verts. On remarque, en comparant le cas normal en haut et le cas pathologique en bas, que la délétion de l'exon 50 provoque la perte du premier nucléotide du codon ARN à cheval entre l'exon 50 et 51 (nucléotides en bleu). Cela provoque un décalage du cadre de lecture de un nucléotide vers la droite. Cette perte du cadre de lecture normal induit l'incorporation d'acides aminés incorrects durant la traduction jusqu'à ce que le ribosome rencontre un codon stop prématuré dans la nouvelle phase de lecture (nucléotide en rouge). L'oligonucléotide antisens PRO051 se fixe sur l'ARN pré-messager au niveau de l'exon 51 et provoque son épissage. Un ARNm mature connectant directement les séquences de l'exon 49 et 52 est ainsi créé. Ces 2 exons sont en phase car ils terminent et commencent respectivement par un codon complet. Une protéine tronquée partiellement fonctionnelle à laquelle il manque 77 acides aminés peut alors être produite.

La troisième approche de thérapie génique pour DMD consiste enfin en l'apport de l'homologue fonctionnel de la dystrophine : l'utrophine [196, 197]. Il a en effet été montré que plus le niveau endogène d'utrophine est fort chez les garçons atteints de DMD, plus l'âge de perte de l'ambulation est tardif [198].

En supplément des résultats histologiques et fonctionnels intéressants apportés par les thérapies géniques que nous venons de voir, un certain nombre d'études indiquent que la restauration de la dystrophine (ou homologue) possède le potentiel thérapeutique le plus probant. Citons par exemple des travaux sur la femelle *mdx* hétérozygote qui ont montré qu'un cœur exprimant 50 % du niveau normal de dystrophine (expression non uniforme du fait de l'inactivation aléatoire d'un des chromosomes X) ne développe pas de cardiomyopathie induite au  $\beta$ -isoproterenol contrairement au cœur de la souris *mdx* homozygote [199]. La littérature indique actuellement qu'il faut exprimer environ 30 % de la quantité normale de dystrophine dans le muscle squelettique pour obtenir un effet thérapeutique.

### **b) Approches palliatives**

La thérapie génique pour DMD ne se limite pas au remplacement de la dystrophine déficiente, mais inclut également d'autres stratégies utilisant des gènes « compensateurs » pouvant améliorer la fonction cellulaire, promouvoir la régénération et compenser les atteintes secondaires telles que l'instabilité de la membrane, la nécrose, la fibrose, l'infiltration adipeuse et l'inflammation chronique. Encore une fois la souris *mdx* a été largement utilisée pour démontrer l'utilité d'approche de thérapie génique augmentant la croissance musculaire et la régénération avec par exemple des inhibiteurs de la myostatine [200, 201] ou encore la surexpression d'IGF-1 (Insulin growth factor, isoforme musculaire) [202]. La surexpression de CT (cytotoxic T cell carbohydrate) suite à l'injection intramusculaire d'AAV codant l'enzyme Galgt2 à l'origine de sa synthèse a également montré son efficacité contre le phénotype histologique dystrophique de la souris *mdx*, le mécanisme thérapeutique restant cependant inconnu [203].

De même il a été montré que la surexpression de certains gènes dans le muscle dystrophique était bénéfique : l' $\alpha$ 7-intégrine stabilise le sarcolemme [204] ; la mini-agrine améliore la formation de la membrane basale dans la dystrophie déficiente en laminine- $\alpha$ 2 (liaison entre la laminine- $\alpha$ 5 et le dystroglycane) [205] ; ADAM12 améliore la stabilité cellulaire en absence de dystrophine tout en baissant la nécrose et l'inflammation [206] ; enfin citons la calpastatine qui empêche la nécrose et nNOS qui inhibe l'inflammation. Le rationnel des approches inhibitrices de l'inflammation pour les dystrophies et DMD en particulier sera abordé en détail plus loin puisqu'il s'agit de l'approche que nous utilisons dans nos travaux.

Enfin il est intéressant de noter que ces approches palliatives ou compensatrices s'adressant aux symptômes secondaires de la pathologie bénéficieraient d'autant plus au muscle dystrophique en synergie d'une thérapie génique restaurant la dystrophine. Il a en effet été montré chez la souris *mdx* jeune que l'apport de mini- ou micro-dystrophine corrige l'atteinte membranaire, empêche le phénotype de centronucléation, et protège en partie le muscle contre les contractions excentriques sans cependant restaurer les propriétés contractiles normales [207, 208]. Cela peut être dû au niveau d'expression obtenue, ou encore au fait que

les minigènes ou le saut d'exon ne peuvent que ramener à un phénotype proche de la dystrophie de Becker. La preuve de principe d'une action synergique d'une approche primaire et d'une approche compensatrice de thérapie génique a par exemple été obtenue dans la souris *mdx* lors de l'injection simultanée de deux AAV : l'un codant une microdystrophine et l'autre codant l'IGF-1 murin [202].

## 2. Thérapie génique du muscle squelettique

La thérapie génique du muscle squelettique ne peut être envisagée sans prendre en compte la réponse immunitaire locale induite par le transfert de gènes. Avant de voir des exemples précis d'immunogénicité du vecteur et/ou du transgène dans le muscle je présenterais donc l'immunobiologie dans le muscle sain ou inflammé. J'aborderais ensuite le défi que représente le muscle dystrophique en thérapie génique, avant de terminer par la présentation du potentiel de sécrétion de protéines transgéniques par le muscle.

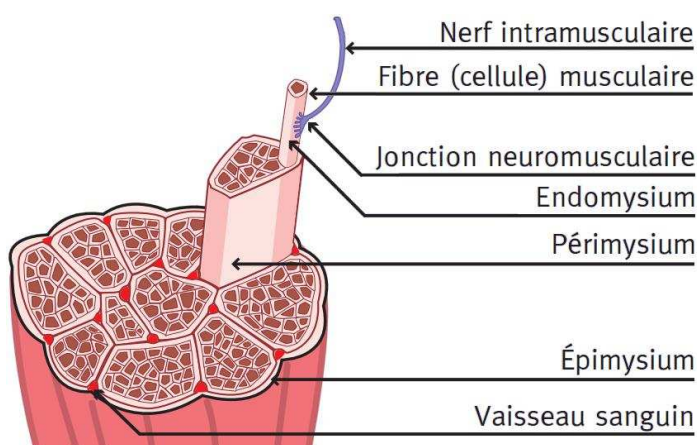
### 2.1. Immunobiologie du muscle sain ou inflammé

#### a) Cellules de l'immunité présentes dans le muscle

Le muscle a peu de surveillance immunitaire comparé à un organe comme la peau qui est en « première ligne » des expositions antigéniques. Il y a en effet peu de cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles dans le muscle. La proximité entre les CPA et les fibres musculaires est surtout rencontrée dans le compartiment capillaire du périnysium (voir *fig. 60* suivante).

Figure 60 – Anatomie du muscle squelettique.

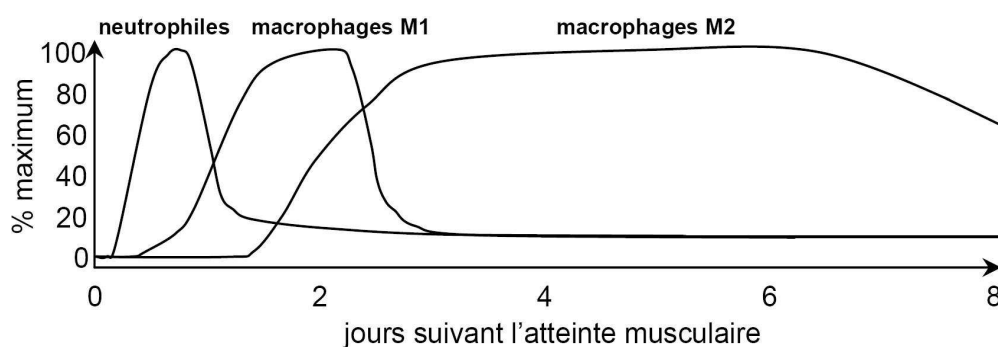
Ce schéma d'une coupe transversale de muscle squelettique présente les différents niveaux d'organisation du tissu musculaire. En progressant de l'extérieur du muscle vers les fibres musculaires on rencontre 3 types d'enveloppes conjonctives : l'épi-, le péri- et l'endomysium. L'épimysium recouvre l'ensemble du muscle, le périnysium délimite les faisceaux de fibres musculaires, et l'endomysium correspond à la lame basale recouvrant chaque fibre musculaire. Ici seuls les vaisseaux sanguins ayant traversé l'épimysium sont présentés, ils forment un réseau capillaire qui traverse par la suite le périnysium et vient au contact de l'endomysium pour vasculariser chaque fibre musculaire. Le prolongement des nerfs moteurs forme également une arborisation innervant au final chaque fibre musculaire en se terminant par la jonction neuromusculaire. Adapté de Anon [209].





Le muscle de rat normal possède en revanche une population de cellules mononuclées du système phagocytaire (macrophages résidants) distribuée dans le tissu conjonctif du périmysium et de l'endomysium entre les fibres musculaires [210]. Les CPA comprennent les macrophages, les lymphocytes B et les cellules dendritiques. Cependant, même si les macrophages expriment les CMH de type II (antigène Ia), leur rôle de CPA se limite à l'activation des lymphocytes mémoire T et B, mais pas des cellules T naïves. En effet, les macrophages ont une efficacité activatrice de lymphocyte T négligeable comparée aux cellules dendritiques qui sont les initiatrices de la réponse primaire (appelée sensibilisation) [211]. Les macrophages résidants pourraient donc avoir un rôle dans la régulation de l'homéostasie immunologique locale en réprimant les cellules T et dendritiques comme cela existe dans les poumons [212], et ils ont un rôle dans le recrutement d'autres cellules mononuclées durant l'inflammation.

En dehors des cellules résidentes de nombreuses cellules de l'immunité sont recrutées lors de l'inflammation consécutive à une lésion musculaire comme illustré dans la **figure 61**.



**Figure 61 – Séquence des infiltrations inflammatoires dans le muscle blessé.**

La première population de cellules myéloïdes infiltrant le muscle blessé correspond aux neutrophiles. Par la suite 2 populations de macrophages de phénotypes différents interviennent. D'abord les macrophages M1 entretenant l'inflammation et causant des dommages supplémentaires en relargant notamment du NO. Puis la population de macrophages M2 ayant un rôle dans la résolution de l'inflammation, et favorisant la croissance et la régénération musculaire.

Durant l'inflammation les cellules de l'immunité résidentes sont activées, et d'autres comme des CPA professionnelles sont recrutées [213]. Des modèles expérimentaux d'inflammation aiguë induite par blessure musculaire indiquent que la première vague de cellules infiltrantes correspond aux neutrophiles [214]. En effet, des études *in vitro* montrent que des facteurs solubles produits dès 3 heures après l'atteinte musculaire par les macrophages résidents et augmentant dans les 24 heures, comme le FGF ou le PDGF (fibroblast growth factor et platelet derived growth factor), ont une activité chimioattractante des neutrophiles et macrophages [215]. Les neutrophiles sont présents dans les 30 à 60 minutes suivant l'initiation de la myonécrose induite expérimentalement et leur nombre augmente jusqu'à atteindre un pic à 12 heures [216]. Ils sont alors graduellement remplacés par des macrophages à activité phagocytaire. Les macrophages sont également le type cellulaire prédominant dans les infiltrats inflammatoires de la myosite induite [217]. Gorospe et coll.

ont également constaté chez la souris un recrutement de mastocytes circulants suite à un dommage musculaire léger (une injection), avec une cinétique d'apparition intercalée entre les neutrophiles et les macrophages commençant dès 8 heures post injection [173]. Les mastocytes sont surtout connus pour leur activité dans l'initiation de l'allergie, mais ce sont aussi des cellules immuno-compétentes à activité présentatrice d'antigènes, et capables de libérer des cytokines et molécules inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6, le TNF- $\alpha$  et la chymase. Par la suite les macrophages résidants ainsi que les macrophages et neutrophiles nouvellement recrutés produisent des cytokines attirant des leucocytes additionnels sur le site atteint [218]. Les macrophages activés en plus de leur activité de phagocytose des débris musculaires participent à la régénération en sécrétant du FGF et du PDGF ayant également une activité chimioattractante des cellules précurseurs du muscle [215].

Le processus inflammatoire normal dans le muscle participe donc à la régénération musculaire et à l'induction de l'immunité contre d'éventuels agents pathogènes présents.

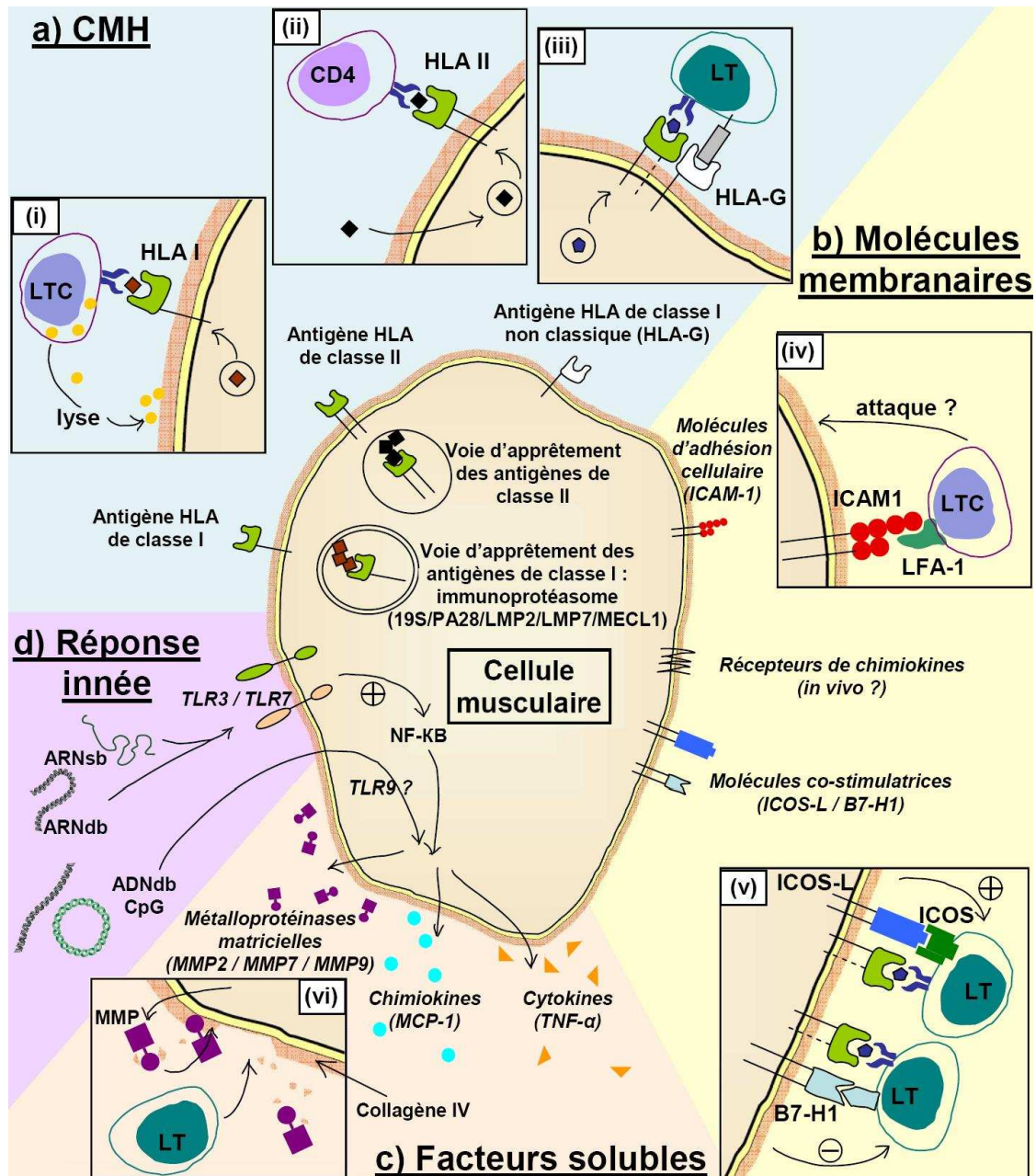
La présentation antigénique aux cellules T CD4 dépend de l'expression constitutive ou induite d'HLA de classe II sur les CPA. En dehors des CPA professionnelles infiltrantes ou résidentes, nous allons voir que le muscle est de plus en plus considéré comme un acteur de la réponse immune car les cellules musculaires sont capables d'exprimer un grand nombre de molécules relatives à l'immunité à leur surface.

### **b) Capacités immunes de la cellule musculaire**

La cellule musculaire a la capacité fonctionnelle d'agir en tant que cellule présentatrice d'antigènes (CPA) non professionnelle\* sous certaines conditions. En effet, la cellule musculaire a une activité immune exacerbée durant l'inflammation. Les protéines de la cellule musculaire utiles à l'interaction avec le système immunitaire seront décrites dans ce paragraphe et illustrées par la *figure 62* ci-après.

---

\* On parle également de cellules présentatrice d'antigènes facultatives.



**Figure 62 – Immunocompétence du muscle.**

a) Le muscle humain exprime les antigènes HLA (CMH) de classe I (HLA-A, B et C). L'expression d'antigène HLA de classe I non classique (HLA-G) ou de classe II (HLA-DR, DP et DQ) peut également être induite. (i) Les cellules musculaires peuvent présenter des antigènes endogènes aux LTC CD8+ via le CMH I. Après cette activation les LTC peuvent induire la nécrose de la cellule musculaire par relargage de granzymes lytiques. (ii) La cellule musculaire peut présenter des antigènes via le CMH de classe II aux LT CD4+. (iii) Les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression de HLA-G, ce qui inhibe fortement le LT, et protège donc la cellule des dommages induits par les lymphocytes. b) La cellule musculaire exprime également diverses molécules membranaires qui sont surexprimées en condition inflammatoire. (iv) ICAM1 pourrait participer à la cytotoxicité contre les fibres musculaires en recrutant localement des LTC. (v) Les molécules co-stimulatrices comme ICOS-L sont nécessaires à la (ré)activation de la fonction des LT. Les cytokines pro-inflammatoires peuvent aussi induire l'expression de la molécule co-stimulatrice B7-H1. B7-H1 inhibe fortement l'activation des LT durant la présentation antigénique par le CMH de classe I ou II. c) La cellule musculaire sécrète également différents facteurs solubles. (vi) Les MMPs sécrétées par la cellule musculaire participent également à son accessibilité aux LT. d) La cellule musculaire peut reconnaître différents acides nucléiques antigéniques via des récepteurs de type toll comme TLR3 et TLR7 qui lient respectivement l'ARN double et simple brin, ce qui induit la voie inflammatoire NF-κB. L'ADNdb à motifs CpG quant à lui induit l'expression de MCP-1, ce qui attire les cellules inflammatoires sécrétrices d'IFN-γ. Adapté de Wiendl et coll. [219].

Les muscles squelettiques représentent le plus grand compartiment cellulaire du corps, mais aucune expression de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) n'est détectée par marquage immunohistologique dans ce tissu en conditions physiologiques [220, 221]. Il a cependant été montré que la cellule musculaire *in vitro*, et *in vivo* en contexte inflammatoire exprime les molécules du CMH de classe I et II (**fig. 62A**).

*In vitro* le myoblaste\* humain exprime de manière constitutive le HLA de classe I (human leukocyte antigen) [222-224], et ce niveau augmente avec la stimulation par des cytokines pro-inflammatoires (interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukine 1 $\alpha$  et  $\beta$  (IL-1)). *In vivo* le CMH de classe I est exprimé en condition pathologique, et plus particulièrement dans les myopathies inflammatoires telle que la polymyosite (PM), ou encore dans la dystrophie de Duchenne [9, 220, 221]. La cellule musculaire est capable d'exprimer les protéines de l'immunoprotéasome nécessaires à la présentation de peptide antigène intracytoplasmique par le CMH de classe I (voir **fig. 62A**) [225]. Les cellules musculaires saines peuvent également être reconnues par les lymphocytes T cytotoxiques (LTC) via le CMH de classe I [226]. La présentation des antigènes endogènes aux LTC peut donc avoir lieu à la surface de la fibre musculaire, et après activation, ces LTC peuvent provoquer la nécrose de la fibre musculaire en relarguant des granzymes lytique (**fig. 62i**). De la même manière, après un stimulus inflammatoire *in vitro* (IFN- $\gamma$ ) [223, 224, 227] ou chez un patient atteint de myopathie inflammatoire, on détecte l'expression de molécules du CMH de classe II (**fig. 62A**) [228-230]. De plus, il a été montré que les cellules musculaires humaines sont équipées de toutes les molécules nécessaires à la présentation d'antigènes sur le CMH de classe II [228, 230, 231]. Les cellules musculaires en condition inflammatoire peuvent donc présenter des antigènes extracellulaires ou intravésiculaires (viraux, bactériens, auto-antigènes et allo-antigènes musculaires) aux lymphocytes T CD4 via le CMH de classe II (**fig. 62ii**). Enfin, il est possible d'induire l'expression d'une molécule non classique du CMH de classe I : HLA-G [222]. HLA-G a surtout été rapporté comme induisant la tolérance immune [232]. Les cytokines pro-inflammatoires induisent l'expression de HLA-G ce qui inhibe fortement les lymphocytes T, et protège donc le muscle des dégâts induits par ces cellules (**Fig. 62iii**).

En plus des molécules du CMH les cellules musculaires expriment différentes molécules membranaires telles que les CAMs (molécules d'adhésion intercellulaire), des récepteurs de cytokines et chimiokines, ou encore des molécules de co-stimulation, et ce spécialement en condition inflammatoire (**Fig. 62B**) [219]. Il a par exemple été proposé que les CAMs participent à la cytotoxicité contre les fibres musculaires en recrutant localement des lymphocytes T CD8. En effet, dans le cas de myopathies inflammatoires, l'expression de ICAM-1 est trouvée au niveau du sarcolemme des fibres non nécrotiques infiltrées par des cellules mononuclées, et les LTC expriment le ligand de ICAM-1 : LFA-1 [233] (**fig. 62iv**). L'expression de récepteurs de cytokines à la surface des cellules musculaires est présumée *in vivo* sur la base de cultures de myoblastes qui répondent *in vitro* à diverses cytokines. Des

---

\* Cellule souche musculaire.

récepteurs de chimiokine tels que CCR1 et CCR5 ont été trouvés sur des fibres musculaires saines. De même le récepteur CCR2B est exprimé sur les cellules satellites et sur les fibres en régénération [233]. Parmi les molécules co-stimulatrices on retrouve ICOS-L qui est exprimée par les cellules musculaires de manière faible en condition physiologique normale, et dont l'expression augmente en condition inflammatoire (stimulation par le TNF- $\alpha$ ) [234, 235]. L'interaction de ICOS-L avec son récepteur ICOS sur les lymphocytes T CD4 ou CD8 constitue une voie immuno-stimulatrice majeure durant l'inflammation musculaire [234, 236]. D'autres molécules exprimées par le muscle en condition inflammatoire sont en revanche co-inhibitrices des lymphocytes T. C'est le cas de B7-H1 (inductible par l'IFN- $\gamma$  *in vitro*) qui a été proposé en tant que régulateur négatif local de l'inflammation dans le muscle (**fig. 62v**) [237, 238].

Il apparaît également qu'un certain nombre de facteurs solubles impliqués de l'initiation à la résolution de l'inflammation, et sécrétés par les cellules immunocompétentes infiltrantes, seraient aussi sécrétés par les cellules musculaires. Ce serait le cas pour des cytokines, des chimiokines et des MMP (matrix metalloproteinases) (**fig. 62C**). Dans le muscle normal aucune expression de cytokine n'est trouvée. Mais dans le cas des myopathies inflammatoires, les cellules musculaires tout comme les lymphocytes, participent à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires [233] et expriment MMP-2, MMP-7 et MMP-9 [239, 240]. Le collagène IV étant abondant à la membrane basale des fibres, il a été proposé que la surexpression de ces MMPs – par les fibres non nécrotiques dans ces pathologies inflammatoires – faciliterait l'adhésion et l'accès des LTC aux fibres en dégradant cette matrice extracellulaire (**fig. 62vi**) [239].

Enfin l'expression de récepteurs de type Toll (TLR) est trouvée dans les cellules musculaires ; c'est par exemple le cas *in vitro* et *in vivo* pour le TLR3 [241], mais également pour TLR7 qui est surexprimé dans le muscle des malades DMD [242]. Cette famille de récepteurs de l'immunité innée reconnaît diverses molécules de pathogènes, en l'occurrence TLR3 reconnaît l'ARN double brin et TLR7 l'ARN simple brin, tous deux induisent l'activation de la voie pro-inflammatoire NF-kB. Toujours concernant l'immunité innée, il a également été montré que l'injection d'oligonucléotides contenant des motifs CpG non méthylés induisait la synthèse de chimiokines (MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1) par les fibres musculaires ce qui attire les cellules inflammatoires sécrétrices d'IFN- $\gamma$  [243] (**fig. 62D**).

Nous avons donc vu que l'inflammation joue un rôle central dans la réponse immune musculaire. Elle favorise le recrutement des CPA professionnelles qui autrement sont peu nombreuses dans le muscle, et elle stimule l'expression des molécules du CMH ainsi que des molécules co-stimulatrices des lymphocytes T à la surface des myoblastes. Ainsi le myoblaste peut se comporter comme une CPA non professionnelle dans des réactions immunes CMH I ou CMH II dépendantes [224, 234, 237], et peut donc former *in vitro* une synapse immunologique avec des cellules T. L'efficacité stimulatrice de cette synapse immunologique peut être discutée, en effet expérimentalement les CPA non professionnelles dépourvues de molécules de co-stimulation appropriées induisent le plus souvent une tolérance [244].

Cependant le muscle semble présenter un micro-environnement approprié où présentation d'antigènes et co-stimulation n'ont pas besoin d'être effectuées par les mêmes cellules (trans-co-stimulation). Et même si la fibre musculaire mature exprime moins abondamment les molécules présentées dans la *figure 62* que le myoblaste, il semblerait qu'elle puisse participer aux réactions immunes.

## **2.2. Réponse immune induite lors d'une injection intramusculaire**

### **a) Réponse immune dirigée contre le vecteur**

Je n'aborderais ce point que pour les vecteurs que j'ai utilisés sur le muscle lors de mes travaux, à savoir : l'ADN nu, l'électrotransfert et l'AAV.

L'ADN peut être injecté dans le muscle sous forme plasmidique, on parle également d'ADN « nu » car il n'est pas associé à un système de vectorisation. Une telle injection peut permettre l'expression sur plusieurs mois du transgène à un faible niveau [245]. En effet ce vecteur seul transfecte peu le muscle, l'expression de protéine transgénique obtenue est donc faible. Quand une réponse immune est générée par un plasmide elle est soit due à un effet adjuvant de contaminants tels que les endotoxines, soit due à une réponse immune innée contre des motifs CpG non méthylés. En effet, il a été montré que les dinucléotides CpG sont toujours méthylés et statistiquement sous représentés dans le génome des vertébrés, au contraire du cas des génomes de nombreux procaryotes chez qui l'on trouve une fréquence normale de CpG toujours non méthylés. Il apparaît que cette différence sélectionnée au cours de l'évolution correspond à un système de défense immunitaire inné. Ainsi, les dinucléotides CpG sont particulièrement immunostimulateurs quand ils sont flanqués de deux purines en 5' et de deux pyrimidines en 3', on parle alors de motif CpG (par exemple chez l'homme : GTCGTT) [246]. Les plasmides sont produits dans des bactéries, ainsi les CpG de la séquence plasmidique ne sont pas méthylés. *In vivo*, les oligonucléotides ADN et les plasmides à motifs CpG non méthylés endocytés par des cellules immunes (lymphocytes, cellules natural killer (NK)...) activent l'immunité innée via le TLR9, et peuvent participer à l'initiation de réponses immunes adaptatives au site d'injection. De même des études sur la vaccination ADN par intramusculaire montrent que les motifs CpG non méthylés induisent l'expression de chimiokines (MCP-1) par les fibres musculaires ce qui attire les cellules inflammatoires sécrétrices d'IFN- $\gamma$  (LT et NK). L'IFN- $\gamma$  induit l'expression de CMH de classe II et d'autres molécules impliquées dans la présentation d'antigènes à la surface des cellules musculaires [243]. Ainsi activée, la cellule musculaire transfectée est capable de présenter des peptides de la protéine transgénique aux cellules T CD4+ via le CMH de classe II ; il apparaît en effet qu'en plus de la présentation d'antigènes exogènes par la voie classique du CMH II, les myoblastes murins et humains sont capables de présenter des antigènes endogènes via le CMH II [243, 247]. Néanmoins, cette vectorisation présente l'avantage de

pouvoir être ré-administrée dans le cas de maladies chroniques puisque la réponse immune de type Th1 est transitoire, et aucun anticorps n'est généré contre l'ADN.

Afin d'améliorer la transfection du muscle par le plasmide, des méthodes physiques comme la biolistique ou l'électrotransfert ont été développées. L'**électrotransfert** est la vectorisation non virale la plus efficace dans le muscle (décrite en détails plus loin dans la partie 2.5) ; cette méthode physique de transfert de gènes utilisant un courant électrique peut être à l'origine d'une réponse immune due à l'ADN et/ou au traumatisme induit. Il a été montré que l'électrotransfert n'induit pas l'expression de gènes liés au stress dans certaines conditions optimisées [248], cependant la procédure reste traumatisante et inflammatoire, et elle est à l'origine de lésions transitoires qui disparaissent en une semaine comme le montrent Rizzuto et coll. [249]. Cette méthode est polyvalente puisque selon le contexte et les paramètres du champ électrique utilisés elle permettra dans un cas la création d'un effet adjuvant en vaccination ADN [250], et dans l'autre elle ne génèrera pas plus de réponse immune que l'injection du plasmide seul [157].

Comme nous l'avons vu dans la **partie I** le **vecteur AAV** administré par voie vasculaire est connu pour être un immunogène faible comparé à l'adénovirus. Il en va de même pour une injection du muscle sain, qui ne provoque pas de réponse immune innée marquée, mais le vecteur AAV n'est pas pour autant immunologiquement inerte. Après une administration intramusculaire de vecteur AAV, celui-ci est retrouvé dans divers fluides biologiques et notamment dans le sérum. Ainsi, une réponse humorale efficace des lymphocytes B est mise en place contre la capsidite suite à l'injection d'un muscle, avec possibilité de production d'anticorps neutralisants. Selon les cas différents niveaux d'activation des cellules T peuvent également être observés. Actuellement des recherches sur une potentielle réponse innée contre le vecteur AAV sont en cours. En effet, d'autres modèles d'infection suggèrent qu'elle existe puisque l'immunité innée est importante pour l'activation d'une réponse adaptative B et T. Lors d'une primo-infection la capsidite des virus non enveloppés peut être opsonisée, mais il apparaît que l'acide nucléique viral est particulièrement important pour monter une réponse innée. Brièvement, les « senseurs » cellulaires d'acides nucléiques viraux font partie de la famille des PRR (Pattern Recognition Receptors) comprenant les récepteurs de type toll (TLR) qui sont enchâssés dans la membrane plasmique, et dont l'activité peut être déclenchée à la surface cellulaire ou durant l'endocytose. Ces interactions conduisent à l'activation de l'inflammasome et à la production d'interféron de type I [251]. Les cellules dendritiques (qui sont des CPA) jouent un rôle majeur dans ces processus innés de reconnaissance des infections. Les recherches s'orientent donc vers le TLR9 présent dans ces cellules et capable de reconnaître l'ADN simple brin du vecteur AAV. Le faible potentiel immunogène de l'AAV dans le muscle serait donc en partie dû au fait qu'il transduit mal les cellules présentatrices d'antigènes – d'ailleurs peu abondantes dans ce tissu – et au fait que la cellule musculaire a un niveau très faible d'ARNm du TLR9 comparé aux CPA comme cela a été montré par RT-PCR [241]. Les essais cliniques utilisant l'injection de vecteur AAV dans le muscle ne rencontrent donc pas d'effets secondaires sérieux ni de toxicité chez l'homme. Comme pour le vecteur, la capsidite du virus

AAV sauvage peut induire une réponse B, dès lors le choix de sérotypes ayant une faible immunoprévalence dans la population traitée peut être envisagé. C'est par exemple le cas de l'AAV5 qui a un faible profil immunologique chez l'homme.

Bien entendu il faut garder à l'esprit que l'injection en elle-même ainsi que le volume administré sont déjà potentiellement à l'origine d'une inflammation transitoire du tissu [173, 249], et que toutes les réponses immunes décrites ci-dessus peuvent être amplifiées ou différentes dans un contexte musculaire pathologique.

### **b) Réponse immune contre la protéine transgénique**

En plus de la réponse contre le vecteur, il peut y avoir une réponse immune contre la protéine transgénique. Cette réponse immune a un type (Th1 ou Th2) et une intensité dépendant du vecteur, du transgène, et du contexte. Le vecteur a son importance concernant la réponse contre la protéine transgénique car il transfectera telle ou telle population cellulaire (comprenant ou non des CPA). De plus le vecteur peut avoir un effet adjuvant et activer l'immunité innée et induire une réponse inflammatoire [251]. Au delà de la dose de vecteur injecté, qui a un impact direct sur le niveau d'expression du transgène et sur le niveau d'activation de la réponse innée, la cinétique d'expression de la protéine transgénique est également importante. Une expression à cinétique lente est en pratique moins immunogène du fait de la présence moindre de l'antigène durant la phase inflammatoire induite par l'administration du vecteur.

La sensibilisation des lymphocytes T activant une réponse immune spécifique contre la protéine transgénique peut être due à 3 cas de figures :

- soit les cellules musculaires transfectées présentent les peptides dérivés des protéines endogènes aux lymphocytes T via des molécules du CMH de classe I,
- soit des CPA sont transfectées,
- soit l'antigène produit par les cellules transfectées est relargué puis recapturé par les CPA professionnelles résidentes ou infiltrées.

Ce dernier cas de figure correspond à de la présentation croisée (cross-presentation).

Des expériences de greffes de myoblastes transfectés de manière stable dans des souris naïves à CMH chimérique indiquent que la sécrétion d'une protéine étrangère est suffisante pour induire une réponse immune contre cette protéine. En effet, la protéine transgénique sécrétée par les myocytes résultant de la greffe est recapturée par des CPA dérivées de la moelle osseuse qui sensibilisent alors les lymphocytes T spécifiques [252]. En théorie une protéine transgénique sécrétée activera plus efficacement la présentation croisée, mais cette efficacité de recapture dépend aussi en partie du niveau d'expression de l'antigène, et donc dans le cas de la thérapie génique de l'efficacité du vecteur et du promoteur utilisé. Notons également qu'il existe une possibilité de contamination du lot de vecteur AAV par la protéine transgénique, malgré les purifications. Celle-ci provient d'une expression par les cellules productrices d'AAV qui sont transfectées par le plasmide du génome viral.



Concernant l'ADN nu, il a été montré que l'injection de plasmide dans le muscle transfecte des cellules dendritiques résidentes [253]. Ces cellules dendritiques transfectées migrent alors vers les nodules lymphatiques drainants où elles sensibilisent les lymphocytes T spécifiques des antigènes présentés. Notons, comme évoqué plus tôt, que les motifs CpG peuvent stimuler *in vitro* les myoblastes transfectés et les faire passer du statut de CPA facultatif à CPA efficace pour la présentation d'antigènes endogènes via le CMH II. Cependant, il semble que les myoblastes soient incapables *in vitro* d'effectuer de la présentation croisée de la protéine transgénique sécrétée [243].

En revanche, il semble que l'administration de vecteurs AAV dans le muscle soit peu immunogène. Citons par exemple l'observation d'une réaction immune cellulaire cytotoxique contre les fibres musculaires transduites par le vecteur adénoviral et exprimant la  $\beta$ -galactosidase, alors que le même transgène vectorisé par l'AAV permet une expression au long terme dans le muscle [254]. Cette « évasion immune » de la protéine transgénique suite à l'administration de vecteurs AAV dans le muscle pourrait être expliquée par la relative inefficacité de transduction des cellules dendritiques murines matures par le vecteur AAV [255]. Cette hypothèse est renforcée par la disparition de la réponse immune cellulaire, et l'observation uniquement d'une réponse humorale contre le transgène quand son expression est restreinte aux cellules cibles par un promoteur spécifique [256]. Néanmoins, dans le cas d'un antigène relativement immunogène vectorisé par un AAV, comme le transgène sécrété Ova (ovalbumine), l'utilisation d'un promoteur tissu cible spécifique (ici musculaire) ne peut empêcher la formation d'une réponse cellulaire [257]. Il semble que la faible transduction des cellules dendritiques par l'AAV soit due à l'étape limitante de conversion du génome viral en double brin. En effet, il est possible de transduire des cellules dendritiques immatures et matures avec un AAV double brin [258].

Notons également, dans le cas de l'AAV, qu'une période de plusieurs semaines est nécessaire pour qu'un transgène atteigne son maximum d'expression après une injection intramusculaire. Ce délai rend compte de la stabilisation et du temps de conversion du génome simple brin de l'AAV en ADN double brin transcriptible. Cette cinétique d'expression lente pourrait également expliquer la faible réponse immune observée contre des protéines transgéniques pourtant connues pour leur immunogénicité dans le contexte du vecteur adénoviral [255].

En dehors de certains événements de tolérance observés avec le vecteur AAV, les transgènes provenant d'une autre espèce sont en général reconnus par le système immunitaire. En effet le niveau d'identité de séquence en acides aminés entre les gènes homologues de l'espèce donneuse et cible définit les épitopes considérés comme non soi par l'hôte. Par exemple la thérapie génique utilisant un plasmide codant une dystrophine murine dans la souris n'induit pas de réponse immune alors qu'une inflammation et une destruction des fibres exprimant la dystrophine humaine est observée chez la souris immunocompétente [259]. L'alignement des séquences d'acides aminés entre les dystrophines des deux espèces donne en effet un score d'identité de 85 %. Des expressions plus longues sont donc obtenues avec des transgènes provenant de la même espèce que le receveur [260]. Malgré cette précaution un transgène peut tout de même être considéré néo-antigène dans le cas où l'hôte possède un

polymorphisme ou même une mutation du gène en question. Le développement d'une réponse immune contre une protéine inconnue du système immunitaire est donc un obstacle à la thérapie génique dans le cas d'une maladie monogénique. Le malade est en effet immunologiquement naïf vis-à-vis de la protéine sauvage, la sienne étant mutée et/ou non exprimée.

Enfin, en plus de son implication dans l'initiation de la réponse adaptative, un contexte inflammatoire peut également atténuer ou éteindre l'expression du promoteur utilisé du fait de la production de cytokines par les cellules immunes infiltrées. Cet effet est par exemple retrouvé avec les promoteurs CMV, RSV, SV40 et MMLV-LTR, mais les promoteurs tissus spécifiques semblent en général épargnés [261].

L'impact du contexte pathologique musculaire sur la thérapie génique est abordé ci-après avec le cas du muscle dystrophique auquel notre étude s'intéresse.

### **2.3. Immunobiologie du muscle dystrophique et thérapie génique**

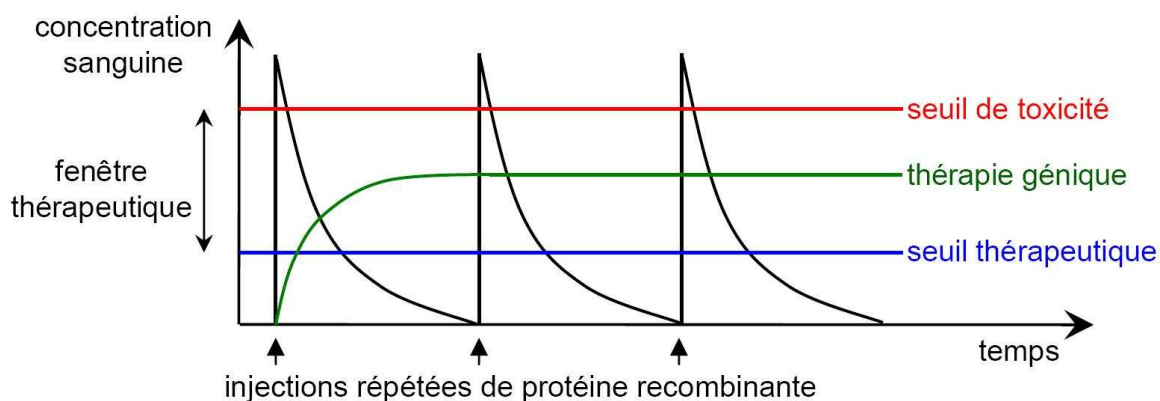
Nous avons abordé plus tôt dans le chapitre consacré à l'immunobiologie du muscle sain le fait que les cellules musculaires n'expriment pas de molécules du CMH, hormis durant un état inflammatoire. Or, il apparaît que les cellules musculaires des malades DMD expriment fortement les molécules du CMH de classe I [262]. Ceci favorise les réactions cytotoxiques médiées par les lymphocytes CD8<sup>+</sup> contre les fibres musculaires transfectées exprimant une protéine transgénique immunogène ou présentant des antigènes provenant du vecteur. Contrairement au cas de myopathies inflammatoires aucun marquage de molécule CMH de classe II n'est détectable sur les cellules musculaires des biopsies de muscles provenant de malades DMD [262]. L'hypothèse de la cellule musculaire ayant une activité CPA facultative reste donc à explorer dans le contexte inflammatoire particulier de DMD. En revanche, l'infiltrat de cellules mononucléées a été largement caractérisé chez DMD ou dans la souris *mdx*. Il apparaît chez DMD que ce sont majoritairement des macrophages et des lymphocytes T CD4 activés (exprimant des antigènes du CMH de classe II), mais également en moindre quantité des lymphocytes T CD8 et des cellules dendritiques [116]. Et chez la souris *mdx* âgée de plus de 7 semaines on trouve jusqu'à 20 fois plus de macrophages et 7 fois plus de cellules dendritiques que dans le muscle des souris saines [263]. On peut donc s'attendre à ce que la voie de présentation du CMH de classe I induisant une réponse cellulaire soit plus efficace dans le muscle dystrophique du fait du plus grand nombre de CPA résidentes. En dehors de l'état inflammatoire du muscle dystrophique, l'aspect nécrotique de celui-ci peut également être responsable de la destruction de fibres musculaires transfectées, et éventuellement d'une présentation croisée plus efficace du fait de fuite du cytoplasme dans le milieu interstitiel.

En plus du niveau inflammatoire endogène, l'état du muscle dystrophique rend aussi les injections dans ce tissu malade plus promptes à recruter une infiltration inflammatoire et ce, aussi bien avec une solution physiologique qu'avec un vecteur adénoviral. En effet, dès 3 jours après l'injection on trouve plus de macrophages et de cellules dendritiques dans le

muscle dystrophique injecté comparé au muscle sain. Cette réponse due au traumatisme de l'injection est non spécifique ; de même l'infiltrat de lymphocytes T dont le pic est atteint 7 jours post injection est également plus important dans le muscle dystrophique, bien que l'intensité de la réponse dépende ici du vecteur et de l'expression du transgène, et donc de la force et de la spécificité du promoteur [263]. L'administration de vecteur AAV6 dans le muscle canin dystrophique indique également qu'il est nécessaire d'administrer un régime immunosuppresseur plus fort que dans le muscle sain durant la thérapie génique pour obtenir le même résultat. En effet la combinaison des immunosuppresseurs cyclosporine et mycophenolate mofetil prévient les réactions immunitaires chez le chien sain, alors qu'il est nécessaire de combiner la globuline anti-thymocyte à ce régime chez le chien cxmd pour obtenir une expression à long terme du transgène micro-dystrophine canin [81]. Ceci est probablement dû à la nature inflammatoire pré-existante dans le muscle dystrophique. Le muscle dystrophique, comparé au muscle sain, est donc un tissu ayant une activité immunitaire exacerbée pouvant rendre la thérapie génique difficile à cause d'une réponse immune contre le vecteur et/ou la protéine transgénique exprimée.

#### 2.4. Le muscle en tant que sécréteur

La sécrétion de protéines thérapeutiques permet d'obtenir un effet systémique et d'agir sur des cibles lointaines et/ou multiples. C'est donc une stratégie intéressante pour le traitement des muscles squelettiques dans les dystrophies musculaires.



**Figure 63 – Avantage de la thérapie génique comparé à une protéothérapie.**

L'utilisation de la thérapie génique afin de produire et sécréter une protéine thérapeutique présente de nombreux avantages comparés à l'administration de protéines recombinantes. En effet, le coût de la production à grande échelle de protéines recombinantes est élevé. Et ces protéothérapies nécessitent des réadministrations régulières du fait de l'élimination rapide dans la circulation sanguine. Cette demi-vie restreinte impose également l'injection de fortes doses pouvant entraîner des effets indésirables, voire une toxicité. La thérapie génique, en

revanche, permet une production constante et potentiellement régulée de protéines thérapeutiques (voir *fig. 63*).

Dans ce cadre, le muscle s'est avéré une cible de thérapie génique particulièrement pratique et efficace. Le tissu musculaire est en effet abondant et facile d'accès, essentiellement différencié et post mitotique, et très bien vascularisé ce qui constitue un avantage pour la sécrétion. Enfin, d'un point de vue éthique et réglementaire, il est possible d'exciser le tissu transfecté. Les fibres musculaires sont capables d'exprimer et de sécréter des protéines transgéniques biologiquement actives qui ne sont normalement pas synthétisées par le tissu musculaire [264], tel que le facteur de coagulation IX (FIX) [264, 265] ou l' $\alpha$ 1-antitrypsine [266].

Quel que soit le vecteur utilisé pour transfecter le muscle, la présence de la protéine transgénique dans le sang est expliquée par les étapes suivantes :

- 1) une sécrétion extracellulaire depuis la fibre musculaire transfectée de la protéine transgénique possédant la séquence signal de sécrétion appropriée,
- 2) la diffusion de la protéine sécrétée à travers la matrice extracellulaire des fibres,
- 3) et finalement l'accès au réseau microcapillaire dense du muscle et le passage au travers de l'endothélium.

Dans notre étude nous utiliserons la vectorisation AAV efficace et peu immunogène dans le muscle, mais également l'électrotransfert, afin de faire sécréter nos transgènes d'intérêt.

## 2.5. Électrotransfert du muscle

L'électrotransfert est une technique favorisant l'entrée de l'ADN nu dans les cellules cibles en leur appliquant un courant électrique. Un champ électrique imposé à une cellule induit une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane appelé potentiel transmembranaire (TMP). L'électroperméabilisation sur laquelle se base l'électrotransfert correspond à une destructuration ou perméabilisation de la membrane qui est obtenue au-delà d'un certain seuil du TMP. La membrane cellulaire ainsi perméabilisée est capable d'internaliser des molécules dans son cytoplasme. Expérimentalement la perméabilisation efficace pour une transfection est obtenue quand on atteint une valeur minimale du TMP de l'ordre de 200 à 300 mV [267]. La formule suivante permet le calcul du TMP pour un type cellulaire donné :

$$\Delta V_m = f \cdot g(\lambda) \cdot r \cdot E \cdot \cos\theta$$

En effet le TMP (ou  $\Delta V_m$ ) est fonction des paramètres suivants : le rayon de la cellule considérée sphérique ( $r$ ), le champ électrique appliqué ( $E$ ) et à son angle d'incidence ( $\theta$ ), la forme de la cellule ( $f$ ) et enfin la conductivité du milieu ( $g(\lambda)$ ). Cette relation montre que l'intensité minimale requise pour perméabiliser une membrane est inversement

proportionnelle au rayon de la cellule. Les conditions électriques utilisées *in vitro* sur des petites cellules sont donc délétères sur des fibres musculaires qui sont de longues cellules d'un diamètre de 10 à 100  $\mu\text{m}$  [268]. En partant de cette base il a été déterminé de manière empirique les conditions permettant un bon niveau d'expression suite à l'électrotransfert du muscle *in vivo* ; à savoir des impulsions répétées (8 à 10) de longue durée (4-50 ms/impulsion) et peu intenses (100-500 V/cm) à la fréquence de 1 ou 2 Hz [268, 269]. L'efficacité de l'électrotransfert dans le muscle squelettique à l'aide d'impulsions électriques de longue durée (5-50 ms) a été montrée en 1998 [270, 271]. Cette technique permet d'augmenter l'efficacité de transfection de plusieurs ordres de grandeur (100 à 10 000 fois) par rapport à l'injection d'ADN nu, et elle réduit considérablement la variabilité inter-individuelle d'expression protéique [268, 270].

L'utilisation d'impulsions de courant continu (signal carré) est préférée *in vivo* car cela permet de fixer l'intensité du champ électrique et la durée des impulsions indépendamment de la résistance électrique du muscle. Expérimentalement il a également été montré que l'ADN doit être présent *in situ* dans le muscle avant l'application des impulsions électriques pour observer une efficacité de transfection. Ceci diffère du cas de petites molécules hydrophiles marquées (EDTA-<sup>51</sup>Cr) qui rentrent aussi bien dans les fibres musculaires qu'elles soient injectées avant ou après l'application des impulsions électriques [268]. Cela suggère un effet actif du champ électrique sur les molécules d'ADN pour promouvoir leur entrée dans les cellules. L'hypothèse mécanistique actuelle décrivant l'électrotransfert d'ADN est donc un processus biphasique nécessitant la perméabilisation cellulaire, mais aussi une électrophorèse de l'ADN. L'électrophorèse pourrait ainsi favoriser l'insertion de l'ADN dans la membrane cellulaire déstabilisée par le champ électrique et/ou favoriser le déplacement de l'ADN dans la cellule perméabilisée. Le phénomène biphasique a été démontré à l'échelle de la cellule unique, par microscopie en fluorescence [272]. Ces travaux révèlent que l'ADN chargé négativement s'accumule de manière électrophorétique du côté cathodique de la cellule suite à l'application des impulsions électriques. L'accumulation n'est possible que s'il y a une perméabilisation préalable à l'aide d'impulsions électriques de durée supérieure à 1 ms. L'interaction obtenue entre l'ADN et la membrane cellulaire forme des agrégats localisés insérés dans la membrane. Déstabilisation et électrophorèse pourraient donc induire directement l'entrée de l'ADN dans le cytoplasme, mais il est également possible que la captation d'ADN nu repose sur un mécanisme d'endocytose favorisé par cette accumulation à la membrane [273]. D'autres expériences dans le muscle *in vivo* montrent qu'après injection la majorité de l'ADN est rapidement dégradé et éliminé (dès 5 minutes après l'injection). Mais un pool d'ADN injecté est plus stable et est dégradé plus lentement, permettant ainsi d'appliquer les impulsions électriques jusqu'à 4 heures après l'injection d'ADN sans perte d'efficacité de transfection [274, 275].

L'électrotransfert est intéressant de part sa simplicité de réalisation, son faible coût et son efficacité. De plus des expressions longues (supérieures à un an) peuvent être obtenues du fait de la longue durée de vie des fibres musculaires [268]. Cette approche a été utilisée dans le

muscle afin de sécréter de nombreuses protéines thérapeutiques telles que des anti-cytokines pour la polyarthrite rhumatoïde [276, 277], ou encore l'érythropoïétine stimulant la production de la chaîne  $\gamma$  de l'hémoglobine capable de remplacer la chaîne  $\beta$  déficiente dans le cadre de la  $\beta$ -thalassémie [278].

## 2.6. Transduction du muscle par l'AAV

Le vecteur AAV est particulièrement efficace pour transduire le muscle squelettique. La taille de l'AAV (~24 nm) lui permet de traverser la matrice extracellulaire du muscle qui présente des pores de 40 nm. L'AAV est capable de transduire les fibres musculaires matures et post mitotiques, et une expression stable de la protéine transgénique peut être obtenue [90]. Le tissu musculaire transduit peut également être utilisé en tant qu'organe exocrine pour faire sécréter dans le sang une protéine transgénique d'intérêt.

Le premier sérotype qui fut testé en injection intramusculaire (IM) est l'AAV2, qui permet une transduction « modeste » du muscle comparé aux meilleurs sérotypes. En effet, son tropisme dans le muscle est caractérisé par une transduction préférentielle des fibres musculaires lentes qui sont plus riches en HSPG, son récepteur primaire (surexpression de HSPG observée dans le cytoplasme) [79, 90]. Cependant, cette préférence pour la transduction des fibres lentes disparaît avec l'augmentation de la dose de vecteur injectée, ou dans une moindre mesure, dans le cas des fibres lentes matures qui surexpriment moins l'HSPG. D'autres sérotypes comme les AAV1, 6, 8 permettent une expression de la protéine transgénique au moins 10 fois supérieure à ce que l'on obtient avec l'AAV2 à la même dose [22]. Ces sérotypes transduisent aussi efficacement les fibres musculaires lentes que rapides. A noter que l'AAV1 transduit moins bien le muscle que les sérotypes 6, 8 et 9 quand il est administré par voie vasculaire [279, 280]. Le sérotype 9 possède également un fort cardiotropisme comme nous l'avons vu dans la **partie I** [64].

L'utilisation du muscle à des fins de sécrétion a montré que l'on obtenait des cinétiques d'expression plus lentes dans le sang avec l'AAV comparé à une vectorisation non virale. Ceci étant attribué au temps de conversion du génome viral. En effet, après un électrotransfert du muscle, il est possible de détecter l'expression du transgène luciférase dès 3 heures après l'injection [268]. Généralement, les protéines sécrétées suite à une IM d'AAV sont détectées à partir du 3 ou 4<sup>ème</sup> jour après l'injection par ELISA [37].

	Pays	Maladie	Vecteur	Promoteur / transgène	Phase clinique	statut	Année
A	États-Unis d'Amérique	hémophilie B	AAV2	FIX	I	fini	1999
B	États-Unis d'Amérique	myopathie des ceintures	AAV2	sarcoglycan $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ou $\delta$	I	ouvert	1999
C	Hollande	déficience en lipoprotéine lipase	?	LPL	I/II	ouvert	2005
D	Angleterre	hémophilie B	AAV-2/8 db	LP1 / hFIX	I	Acceptation sous condition	2006
E	États-Unis d'Amérique	myopathie des ceintures type 2D	AAV1	tMCK / sarcoglycan $\alpha$ humain	I	ouvert	2006
F	États-Unis d'Amérique	dystrophie de Duchenne	AAV-2/5	CMV / minidystrophine	I	fini	2006
G	France	myopathie des ceintures type 2C	AAV1	desmine / sarcoglycan $\gamma$	I	ouvert	2006
H	États-Unis d'Amérique	maladie de Pompe	AAV1	CMV / acide $\alpha$ -glycosidase	I/II	ouvert	2008

**Tableau 3 – Essais cliniques de thérapie génique administrant un vecteur AAV en intramusculaire.**

D'après les données collectées sur le site <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical> (mise à jour décembre 2009).

Le vecteur AAV a été utilisé en IM dans divers essais cliniques de phase I et II (résumés dans le **tableau 3**) où il a démontré son innocuité, et la bonne tolérance d'injections multiples dans un même muscle. On retrouve dans ces essais cliniques l'injection de doses s'étalant de quelques millions de génomes viraux (vg) par patient dans l'essai G, à plusieurs milliards ( $1,8 \cdot 10^{12}$ ) de génomes viraux par kg du patient dans l'essai A (soit une dose totale maximale injectée en IM chez un homme de 70 kg de l'ordre de  $1$  à  $4 \cdot 10^{14}$  vg). Les injections ont été effectuées en un à plusieurs sites dans un même muscle sous anesthésie locale. Ces essais cliniques ont donné des renseignements importants sur la toxicité, l'immunogénicité, les niveaux de transduction obtenus et la clairance de l'AAV administré en IM chez l'homme. Par exemple, la clairance du vecteur AAV1 a été suivie par QPCR du jour 1 à la semaine 6 post injection dans l'essai clinique C utilisant des doses importantes de  $1 \cdot 10^{11}$  ou  $3 \cdot 10^{11}$  vg/kg. Tout d'abord, il montre de manière attendue la persistance d'un nombre élevé de génomes viraux dans le muscle injecté (jusqu'à  $1 \cdot 10^6$  copies/ $\mu$ g ADN). D'autre part, le vecteur est retrouvé de manière transitoire dans les fluides biologiques (sérum, salive, urine, sperme), avec une clairance très rapide de 1 à 2 log par semaine. Le niveau le plus fort étant trouvé dans le sérum, et le plus faible dans le sperme. A 6 semaines, tous les échantillons sont sous le seuil de détection de QPCR. Cet essai clinique a également montré une réponse T anti-capside AAV1, contre un épitope qui est commun aux sérotypes 1 à 9. Les études de toxicité chez l'animal avec le vecteur de l'essai clinique C n'ont par ailleurs montré aucune toxicité embryonnaire ni transmission à la lignée germinale (données communiquées lors du congrès ESGCT 2007).

Un dernier point évalué concerne la grande séroprévalence de l'AAV sauvage dans la population humaine, et l'impact potentiel de la présence d'anticorps neutralisants au moment de l'injection IM. Cet aspect a été évalué dans l'essai clinique A administrant de l'AAV2. Aucune inhibition de transduction du muscle n'a été observée chez les patients possédant déjà des anticorps contre l'AAV2 [79]. Le muscle est perméable à certaines immunoglobulines comme les IgG, mais pas aux IgM qui ont une masse moléculaire trop importante pour entrer

dans ce tissu. Cela indique que le muscle n'est pas isolé des anticorps neutralisants, et donc certainement que la dose d'AAV injectée dans l'essai clinique A – qui est localement très forte ( $1,5 \cdot 10^{12}$  vg par point d'injection) – sature les anticorps tissulaires.

Enfin, rappelons que dans le cas du traitement des maladies neuromusculaires comme les dystrophies, nécessitant parfois le traitement de l'intégralité de la musculature, il n'est pas envisageable d'effectuer des IM sur le corps entier. D'une part pour une raison éthique, et d'autre part du fait de l'accessibilité restreinte de certains muscles profonds et/ou fins sans procédure invasive, comme les intercostaux, le diaphragme ou le cœur. D'où l'intérêt du développement de stratégies d'administrations loco-régionales ou systémiques, ou encore de la sécrétion de facteurs thérapeutiques dans le sang du patient par thérapie génique.

### **3. Inflammation, TNF et DMD**

#### **3.1. Le facteur de nécrose tumorale**

##### **a) Historique, gène et protéine**

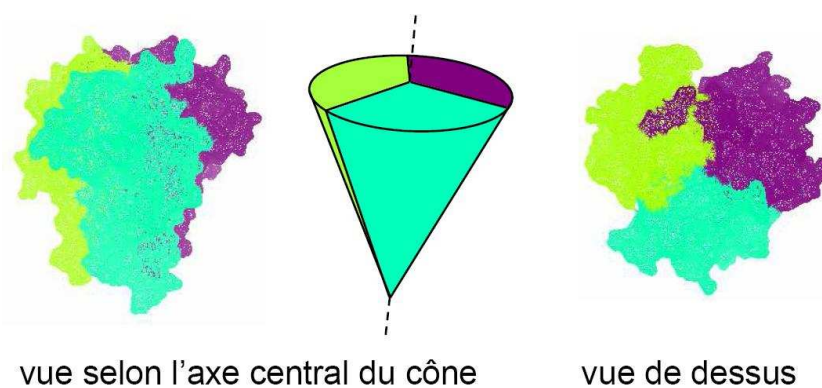
En 1962, O'Malley rapporte la production d'un facteur sérique chez des souris stimulées par l'endotoxine. Le sérum de ces mêmes souris administré à des animaux porteurs de tumeurs peut induire la nécrose de la tumeur. Le facteur sérique responsable a donc été nommé tumor necrosis serum. Ce facteur est isolé en 1975 par Carswell et coll. et renommé TNF pour tumor necrosis factor [281]. Son ADNc fut cloné et séquencé en 1985 [282].

Le TNF est le prototype de la super famille des protéines tumor necrosis factor. Cette famille est définie par homologie de séquences et de structures par rapport au système du TNF et de son récepteur le TNFR. Il existe actuellement plus de 40 systèmes ligands-récepteurs dans cette superfamille [283] qui n'existe que chez les vertébrés, et sa nomenclature tente d'être standardisée. Ainsi depuis que le TNF- $\beta$  a été renommé lymphotoxine, le nouveau nom approprié pour le TNF- $\alpha$  est simplement TNF [284] (par la suite j'utiliserais systématiquement cette nomenclature).

Le gène du TNF humain est localisé sur le chromosome 6 (6p21.33), dans une région proche de l'ensemble des gènes du CMH. La protéine est codée par un gène unique de 3,6 kb qui comporte trois introns et quatre exons [285].

Le TNF est une protéine transmembranaire de type II, avec une extrémité C-terminale externe à la cellule et un domaine cytoplasmique. Ce précurseur de 233 acides aminés (26 kDa) peut être clivé par une métalloprotéase membranaire appelée TNF convertase enzyme (TACE) pour générer une forme sécrétée.





**Figure 64 – Structure du TNF trimérique : mise en évidence de sa forme conique.**

Réalisé à l'aide du logiciel 3D Molecule Viewer (Invitrogen) d'après la structure déposée par Eck et coll. [286] sur la « RCSB Protein Data Bank » disponible à l'adresse suivante : <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1TNF>.

Le TNF ainsi libéré (17 kDa, 157 aa) peut s'assembler en trimère circulant, chaque ligand ayant ainsi trois sites de liaison [287]. La structure tridimensionnelle du TNF a été résolue simultanément par deux équipes [286, 288], et a été récemment décrite à haute résolution [289]. Le TNF trimérique soluble est décrit comme une protéine en forme de cône où chaque monomère est en contact avec les deux autres, la zone de contact entre monomères correspondant à la hauteur du cône (*fig. 64*). Chaque monomère a deux feuillets  $\beta$  anti-parallèles. Le feuillet contenant l'extrémité N-terminale est externe, hydrophile et relativement libre, tandis que le feuillet interne contenant l'extrémité C-terminale est hydrophobe et proche de l'axe central du cône formé par le trimère [290, 291]. Le TNF peut exercer sa fonction par contact intercellulaire sous sa forme membranaire, ou à distance via sa forme soluble puisqu'il s'agit d'une cytokine pro-inflammatoire. Ses deux formes sont actives mais elles ont des affinités différentes pour les récepteurs du TNF (TNFRI et TNFRII).

### b) Production du TNF

Le TNF est libéré par les leucocytes, l'endothélium et d'autres tissus généralement en réponse à un dommage ou une infection. Parmi les leucocytes, les monocytes et les macrophages sont les principales sources de TNF. Mais les lymphocytes T et B, les cellules natural killer (NK), les polynucléaires, et les mastocytes en produisent aussi. En dehors du système immunitaire les fibroblastes, chondrocytes, astrocytes, cellules microgliales, kératinocytes et les cellules épithéliales digestives sont aussi des cellules productrices de TNF [292] ; nous verrons plus loin que la fibre musculaire est également capable de produire du TNF en situation pathologique.

L'expression du gène du TNF est stimulée par une large variété d'agents. Les macrophages produisent par exemple du TNF sous l'influence de stimuli chimiques, physiques et biologiques, tels que l'ischémie, le trauma, l'irradiation (UV, rayon X, chaleur), des produits issus de virus, bactéries (LPS) ou parasites, des cellules tumorales, le complément et certaines

cytokines (IL-1, IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF, M-CSF, et TNF). Le TNF exerce donc un rétrocontrôle positif sur son expression. D'autres cytokines inhibent en revanche sa production, comme l'IL-6 et la lymphotoxine (TNF- $\beta$ ).

Le promoteur du TNF possède des sites de fixation de plusieurs facteurs de transcription, principalement du NF- $\kappa$ B et d'AP-1, mais aussi d'AP-2, de NFAT (nuclear factor of activated T cell), il possède aussi un site CRE (cyclic adenosine monophosphate response element) [293]. Nous verrons plus loin que NF- $\kappa$ B, AP-1 et NFAT sont suractivés dans la pathologie DMD. Les deux principales voies induisant l'expression du TNF (et impliquées dans son rétrocontrôle positif) sont la voie du "nuclear factor- $\kappa$ B" (NF- $\kappa$ B) et la voie des "mitogen activated protein kinase" (MAPK).

La transduction du signal par la voie du NF- $\kappa$ B fait suite à la fixation du stimulus sur un récepteur membranaire. Le NF- $\kappa$ B à l'état basal est séquestré dans le cytoplasme des cellules non activées par les molécules inhibitrices de la famille I $\kappa$ B. L'activation cellulaire provoque une phosphorylation de l'inhibiteur I $\kappa$ B par un complexe I $\kappa$ B kinase (I $\kappa$ K), ce qui provoque la dégradation de I $\kappa$ B par le système ubiquitine-protéasome et la libération du NF- $\kappa$ B. Le NF- $\kappa$ B libre transloque alors vers le noyau où il exerce son rôle d'activateur de la transcription de gènes possédant le site consensus  $\kappa$ B dans leur promoteur.

Dans le cas de la voie des MAP kinase (MAPK), la liaison du stimulus à son récepteur induit le recrutement de protéines intracellulaires (TRAF, TRADD et RIP) qui induisent une cascade de phosphorylation via JNK et p38. *In fine* cette voie active le facteur de transcription AP-1.

### **c) Régulation de la synthèse et de la sécrétion du TNF**

Le gène du TNF est un gène de la réponse inflammatoire immédiate, son niveau d'ARNm augmente brusquement en 15 à 30 minutes. La régulation transcriptionnelle du TNF peut être modulée par la synthèse de nucléosides cycliques. L'AMPC est ainsi capable d'interférer avec les facteurs de transcription du TNF au niveau du site CRE du promoteur. La synthèse de TNF est cependant augmentée par le GMPc intracellulaire. Les prostanoïdes comme la prostaglandine E2 (PGE2) et la prostacycline (PGI2) ont un effet anti-inflammatoire en bloquant la synthèse du TNF. PGE2 et PGI2, dont la synthèse est induite par le TNF, exercent un rétrocontrôle négatif sur celui-ci en augmentant la concentration intracellulaire en AMPC. La PGE2 induit aussi la synthèse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 qui a une action double [294]. L'IL-10 inhibe l'activité macrophagique et favorise la synthèse de PGD2 au détriment de la synthèse de PGE2. Or PGE2 réprime les gènes pro-inflammatoires (iNOS et TNF) des macrophages activés en inactivant les facteurs de transcription STAT-1, AP-1 et NF- $\kappa$ B.

La capacité de différents tissus à exprimer le TNF dépend de sa régulation transcriptionnelle mais aussi de la possibilité de déréguler les signaux de la région 3' non transcrite (3'UTR) de son ARNm. En effet la région 3'UTR contient des sites AURE (adenosine-uridine rich element) rendant l'ARNm du TNF instable [295]. A l'état basal (non activé), la séquence

AURE fixe des protéines AUBP (AURE binding-protein) qui agissent en bloquant la traduction de l'ARNm du TNF ou en facilitant sa dégradation [296]. Lors de l'activation de la cellule – par exemple un macrophage activé par des endotoxines – ce blocage est levé par des mécanismes qui restent à élucider. Il a cependant été montré que l'activité de certaines protéines AUBP (TIA-1 et TIAR) peut être inhibée par leur phosphorylation par la MAPK2 de la voie p38 [297, 298].

Enfin, au niveau post-traductionnel, la partie extracellulaire du TNF membranaire est libérée sous forme soluble par la métalloprotéase TACE (MMP-7, MMP-14, et MMP-17 sont aussi capables de faire ce clivage) [299].

#### **d) Rôle physiologique**

Le rôle du TNF et de ses récepteurs est bien documenté dans le cas de la défense anti-infectieuse [284] et de la réponse inflammatoire.

L'**inflammation** est une réaction de l'organisme mise en œuvre quand l'intégrité de ses constantes morphologiques et biologiques est menacée. Les causes exogènes de l'inflammation peuvent être des micro-organismes (bactéries, virus, parasites, champignons), un traumatisme, un corps étranger, ou des agressions d'origine physique (radiations) ou chimique (toxiques). Une augmentation locale de la concentration en TNF cause les signes cardinaux de l'inflammation : rougeur, chaleur (vasodilatation), œdème, douleur et atteinte fonctionnelle du membre ou de l'organe (signe plus inconstant). Le TNF a un rôle crucial dans l'inflammation, c'est une cytokine centrale dite précoce car elle est l'une des premières à être sécrétée (avec l'IL-1 et l'IL-6). Le TNF amplifie l'inflammation en induisant la transcription et la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires secondes ou tardives (chimiokines IL-8 et monocyte chemoattractant protein (MCP)), de plus il s'auto-active en induisant sa propre synthèse. L'action physiologique du TNF se fait généralement en coopération avec l'IL-1 et IL-6, et ces actions ont lieu sur de multiples cibles tissulaires et cellulaires et ont comme objectif commun la défense de l'organisme. Le TNF participe à l'infiltration des cellules inflammatoires en induisant l'expression de chimiokines dans le tissu inflammé (MCP-1, IL-8) [219, 300] et en agissant sur les cellules endothéliales. En effet, le TNF augmente la perméabilité vasculaire et induit l'expression des molécules d'adhésion des leucocytes (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine, CD44) [233, 301, 302]. Une fois que le leucocyte (neutrophile par exemple) est attiré et adhère à la paroi des cellules endothéliales, il sort de la circulation et entre dans le tissu inflammé par diapédèse. De plus, le TNF est lui-même chimiotactique pour les monocytes, et il active la phagocytose des macrophages et leur activité cytotoxique, ainsi que leur production d'IL-1, d'oxydants et de lipides pro-inflammatoires (comme la prostaglandine E2 ou PGE2). Le TNF induit également la libération de molécules de la défense immédiate (radicaux libres, monoxyde d'azote [303], métalloprotéases, PGE2, PAF) par les neutrophiles, les cellules endothéliales et d'autres types cellulaires résidants. Ces médiateurs modulent les phénomènes primaires de l'inflammation

comme la vasodilatation, la perméabilité, le chimiotactisme, et favorisent les mécanismes de destruction tissulaire. Le TNF, par son action systémique, induit aussi la synthèse des protéines de l'inflammation (C-reactive protein : CRP) d'origine hépatique via l'IL-6. Enfin il participe à la néoangiogénèse en augmentant l'expression du VEGF et de VCAM, et il participe à la réorganisation de la matrice extracellulaire en induisant la synthèse des MMP-1, -2, -3 et -9.

Notons que l'inflammation en situation classique est régulée et transitoire. Mais en situation pathologique cette régulation peut être altérée à de multiples niveaux, et l'inflammation peut devenir délétère voire même chronique avec l'entrée dans une spirale d'auto-activation. Dans ces cas pathologiques le rôle bivalent du TNF dans l'inflammation peut être difficile à cerner car il peut être délétère ou réparateur selon la phase de la maladie.

Concernant la **défense anti-infectieuse** il a été montré que la déficience en TNF ou de ses récepteurs accroît la susceptibilité aux infections des pathogènes intracellulaires [304-307]. Suite à une infection, le TNF exerce une action centrale sur la thermorégulation qui se traduit par de la fièvre et la suppression de l'appétence (faim).

Le TNF joue aussi un rôle important dans le développement des tissus lymphoïdes. En effet, les souris KO pour le TNF n'ont pas de follicule de lymphocytes B dans leur rate, et sont incapables de développer des centres germinatifs\* [308, 309]. Le TNF joue un rôle dans la génération de la réponse immune spécifique en contrôlant directement et indirectement via d'autres cytokines la prolifération et la différenciation des cellules B en cellules sécrétrices d'anticorps, et il augmente la production de lymphocytes T helper (LTh). Il peut aussi exercer une action cytotoxique sur les cellules infectées (par apoptose ou lyse cellulaire). Enfin, le TNF et ses récepteurs ont un rôle physiologique potentiel dans la régulation de cellules hématopoïétiques souches ou progénitrices [310-312].

---

\* Site de prolifération et de différenciation des lymphocytes B formé dans un follicule lymphoïde primaire (ganglion), également appelé follicule secondaire.

## e) Inhibiteurs du TNF

L'inhibition du TNF peut être réalisée à l'aide d'agents chimiques ou biologiques (anticorps, récepteurs solubles).

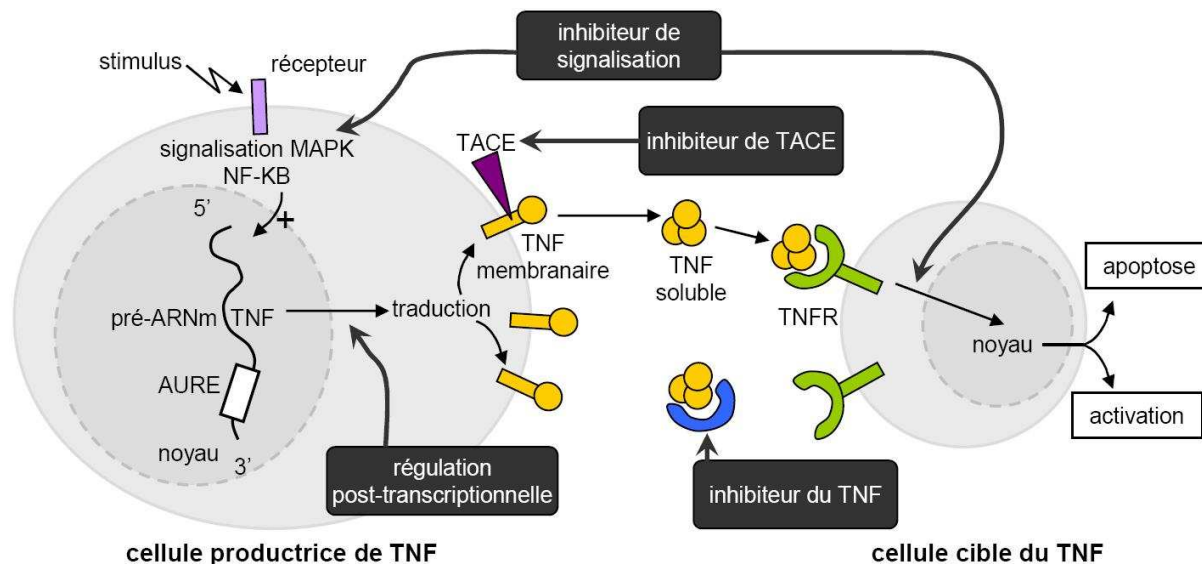


Figure 65 – Différentes stratégies anti-TNF.

Les agents synthétiques peuvent agir à toutes les étapes depuis la synthèse jusqu'à l'inhibition de l'activité biologique du TNF. On trouve par exemple des inhibiteurs des voies de signalisation régulant la synthèse du TNF (voie des MAPK ou du NF- $\kappa$ B), des composés augmentant la concentration cellulaire en AMPc (comme les prostanoides abordés précédemment), ou encore des agonistes du récepteur de l'adénosine [313]. La thalidomide est un inhibiteur de phosphodiesterase IV qui métabolise l'AMPc, elle inhibe donc la synthèse du TNF, mais ses effets secondaires importants empêche sa prescription prolongée (tératogène, neuropathies périphériques). D'autres molécules inhibitrices de l'enzyme phosphodiesterase IV sont à l'étude.

L'action inhibitrice du TNF peut aussi s'effectuer au niveau post-transcriptionnel en jouant sur la stabilité de son ARNm (régulation par les protéines AUBP). A ce propos, il a été montré une inhibition de la traduction de l'ARNm du TNF par un peptide synthétique dont l'action est dépendante d'une séquence en 3'UTR différente des séquences AURE [314].

L'inhibition de l'activité biologique peut être réalisée en empêchant la libération membranaire du TNF soluble avec des inhibiteurs de la TACE, mais cela présente l'inconvénient d'inhiber aussi la libération du TNFR-II (forme soluble du récepteur II du TNF) [315]. Le TNF, ou ses effets, peuvent également être inhibés par certains composés naturels, dont la curcumine (du curcuma) et les catéchines (du thé vert). La vaccination anti-TNF est également à l'étude chez l'animal dans des modèles de pathologie inflammatoire. Mais les modalités et les conséquences exactes de ce type d'immunisation ne sont pas encore assez connues pour envisager une approche chez l'homme. En dehors de la thalidomide la pharmacopée comprend

essentiellement des agents biologiques : anticorps, récepteurs solubles et dérivés. Ceux-ci bloquent l'activité du TNF en s'y liant et en formant un complexe qui sera dégradé. Les anticorps anti-TNF, contrairement à ce que l'on pourrait penser, constituent une approche quasi-physiologique. Il existe en effet des auto-anticorps naturels anti-TNF de manière ubiquitaire chez les individus sains [316]. Il y a actuellement quatre anticorps anti-TNF ayant reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) :

- **Infliximab** (Remicade) : anticorps chimérique comportant une partie constante d'IgG1 humaine et une partie variable murine dirigée contre le TNF murin.
- **Adalimumab** (Humira) : anticorps monoclonal humain (IgG1).
- **Golimumab** (Simponi) : anticorps monoclonal humain (IgG1).
- **Certolizumab pegol** (Cimzia) : fragment Fab' humain anti-TNF pegylé.

Les premières études ont été réalisées avec l'infliximab qui s'administre en intraveineuse (IV). Ce dernier est capable de se lier aux formes membranaires et solubles du TNF avec une forte affinité. Son efficacité thérapeutique a été évaluée en essai clinique dans de nombreuses pathologies inflammatoires : polyarthrite rhumatoïde, spondylarthropathie ankylosante, maladie de Crohn, psoriasis, choc septique, uvéite... L'infliximab a d'abord été approuvé pour son utilisation dans la maladie de Crohn, et s'est avéré, par la suite, également efficace pour traiter la polyarthrite rhumatoïde (PR) [317]. Cependant on observe le développement d'anticorps anti-infliximab chez les patients ; c'est pourquoi l'infliximab est utilisé en combinaison avec le méthotrexate dans le traitement de la PR. Ces anticorps peuvent aussi lier le TNF membranaire et donc potentiellement induire l'apoptose de la cellule par cytotoxicité dépendante de l'anticorps (ADCC) ou du complément (CDC). Cet effet bénéfique a été montré avec l'infliximab dans la PR. L'infliximab induit l'apoptose des LT CD4+ et des macrophages (producteurs de médiateurs pro-inflammatoires) infiltrant les articulations dans la PR, car ils expriment le TNF membranaire [318]. Le problème d'immunogénicité, mais aussi les problèmes de réaction d'infusion et d'hypersensibilité retardée, ont contribué au développement de l'anticorps monoclonal complètement humain adalimumab. L'utilisation d'adalimumab s'est avérée efficace seule ou en combinaison avec le méthotrexate (effet additif) dans le traitement de la PR [319], et il présente l'avantage d'être administré en sous-cutanée (deux injections par mois en général). En juin 2009, un anticorps monoclonal produit en hybridome de souris nommé golimumab a obtenu une AMM européenne. Ce produit pourra être administré par voie sous-cutanée une fois par mois pour certaines indications comme la PR par exemple. Récemment, une forme pegylée concurrente a également été développée (certolizumab pegol) dans le but d'augmenter la demi-vie de la protéine circulante. Cette protéine recombinante possède une demi-vie de 14 jours, contre 9 à 10 pour l'infliximab et adalimumab, permettant également une administration sur une base mensuelle en sous-cutanée. Les premiers essais cliniques de phase III ont montré l'apparition d'anticorps dirigés contre le certolizumab pegol chez 4 à 8,5 % ou 22,5 % des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques (PR et Crohn), selon qu'il est associé ou non avec

l'immunosuppresseur méthotrexate. L'essai clinique « PRECISE 1 » concernant des patients atteints de la maladie de Crohn, a montré une amélioration modeste du taux de réponse comparée au placebo, sans pour autant observer d'amélioration significative dans les taux de rémission [320]. Une recommandation de refus de l'autorisation de mise sur le marché européen fut émise par l'EMA (agence européenne des médicaments) en mars 2008 pour le traitement des formes modérées à sévères de la maladie de Crohn avec le certolizumab pegol. Le médicament obtint son AMM en Amérique (FDA) pour la même indication en avril 2008. Des données récentes indiquent que le certolizumab pegol en association avec le méthotrexate est significativement plus efficace que le traitement de référence seul (méthotrexate) dans le traitement de la PR. Le traitement vient ainsi d'obtenir récemment l'AMM européenne pour cette dernière indication (le 1er octobre 2009). Des essais cliniques sur l'innocuité au long terme sont toujours en cours pour le golimumab et le certolizumab pegol, étant donné le peu de recul dont on dispose.

Le principal effet secondaire connu pour ces quatre molécules anti-TNF, en dehors de l'immunogénicité pouvant gêner le traitement, correspond à un effet immunosuppresseur pouvant provoquer l'infection par des opportunistes bactériens, viraux et fongiques. Ainsi, il a été noté un risque de contracter la tuberculose, ou de réactiver des infections latentes. Ces médicaments stipulent donc l'existence de ces risques sur leur notice d'emploi et recommandent une évaluation du risque de tuberculose latente (le traitement devant être reporté après la trithérapie antituberculeuse le cas échéant). Notons tout de même que la majorité des patients développant ces infections prennent aussi en parallèle d'autres immunosuppresseurs (méthotrexate ou corticostéroïdes).

D'autres inhibiteurs du TNF seront présentés plus loin dans le chapitre sur les récepteurs solubles du TNF, après avoir abordé l'aspect inflammatoire et l'implication du TNF en particulier dans la pathologie qui nous intéresse.

### **3.2. Hypothèse de pathophysiologie DMD : signalisation via le DGC**

Dans le chapitre consacré à DMD j'ai introduit les hypothèses de la pathophysiologie que je qualifierais d'historique, à savoir que la cause primaire est la nécrose des fibres musculaires, et que cela provoque un état inflammatoire chronique contribuant à l'atteinte secondaire du muscle. Nous allons maintenant voir que tout n'est pas aussi clair en terme de causalité, et qu'il existe une hypothèse alternative : la signalisation cellulaire aberrante. Ainsi, même si la première conséquence physiopathologique est indéniablement une susceptibilité accrue à la nécrose, cette susceptibilité varie spatialement (muscles épargnés et hétérogénéité d'atteinte), temporellement (maladie évolutive), et selon l'espèce (même protéine mutée mais phénotype différent). Ceci laisse penser que la mort cellulaire est la première conséquence mais pas la cause primaire de la pathologie. En effet, un certain nombre de données collectées avant et pendant le pic initial de nécrose vont contre l'hypothèse structurelle pour ce qui concerne l'initiation de la maladie. Il apparaît par exemple que l'intégrité mécanique du muscle

dystrophique est maintenue durant la phase pré-nécrotique de la souris *mdx* [321, 322] ; de même l'augmentation du niveau de créatine kinase (CK) sérique et l'augmentation de la perméabilité de la myofibre dystrophique ne s'observent pas avant le pic de nécrose vers 21 jours dans la souris *mdx* [323]. Actuellement, on ne connaît pas le mécanisme responsable de l'initiation de la pathologie du muscle dystrophique, et on ne sait pas si la fragilité membranaire est une cause ou une conséquence dans la pathologie.

Une hypothèse alternative pouvant expliquer l'atteinte primaire consécutive à la déstabilisation du complexe de protéines associées à la dystrophine est celle d'une signalisation anormale dans le muscle dystrophique. L'hypothèse étant que la phase d'initiation de la maladie est due à une voie de signalisation inflammatoire aberrante. Thomas Rando propose ainsi que le complexe transmembranaire protéique associé à la dystrophine (DGC) organise des protéines de signalisation régulant la viabilité cellulaire [324]. Trois protéines de signalisation sont actuellement connues pour interagir avec le DGC : la calmoduline (CaM), Grb2 (Growth factor receptor-bound protein 2) et nNOS (voir **fig. 66** ci-après).

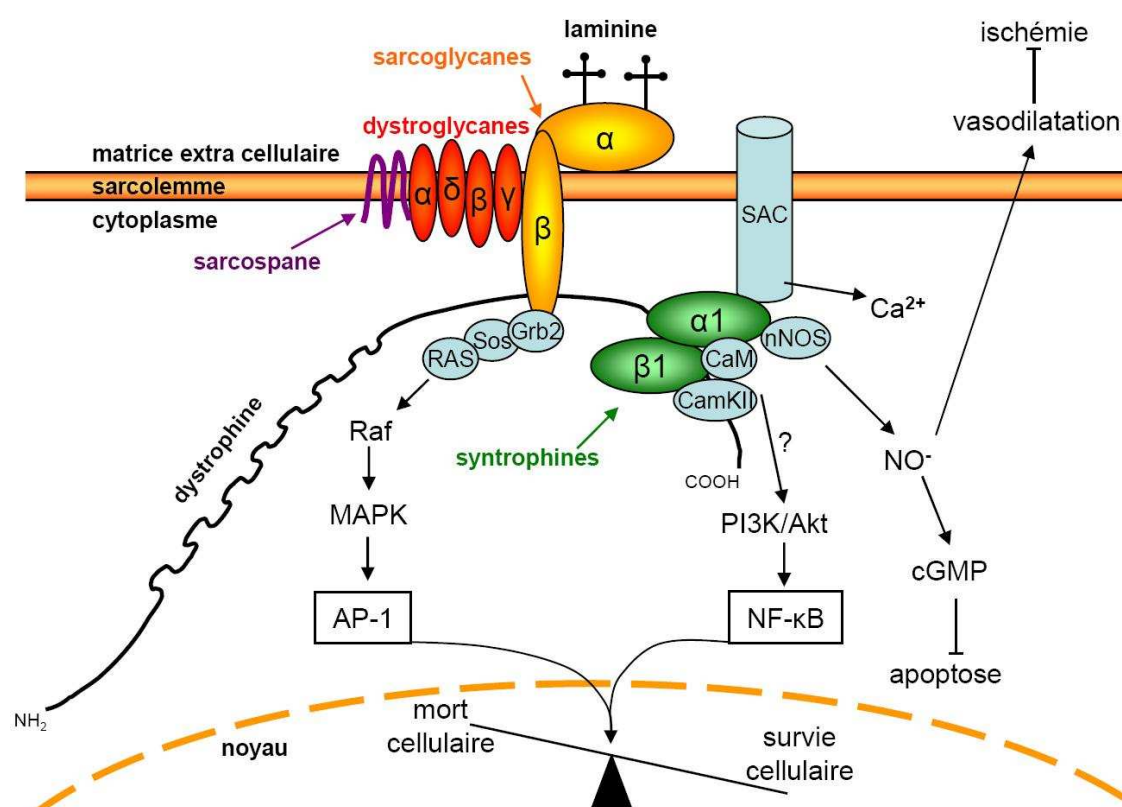


Figure 66 – Protéines de signalisation cellulaire associées au DGC.

La **calmoduline** (CaM) est liée à la dystrophine et aux syntrophines [325], et elle régulerait cette interaction protéique via une isoforme de la calmoduline kinase II (CaMKII) qui phosphoryle la dystrophine et la syntrophine ce qui inhibe leur liaison [326]. La calmoduline régule également l'interaction de la dystrophine et de l'utrophine avec l'actine [327, 328]. Les activités calmoduline-dépendantes régulant le calcium intracellulaire sont



réduites dans le muscle dystrophique [329]. En plus de la régulation d'interactions protéiques dans le DGC, la calmoduline pourrait affecter la voie de signalisation phosphatidylinositide-3'-kinase/Akt kinase (PI3K/Akt) régulant la survie cellulaire [330]. De plus, des kinases calmoduline-dépendantes participent à la régulation de l'apoptose [331].

La molécule adaptatrice **Grb2** est associée au  $\beta$ -dystroglycan [332] et participe à la transduction de signal via la voie des récepteurs à tyrosine kinases et Ras [333, 334]. La voie Ras/MAPK (Ras/mitogen activated protein kinase) serait activée par Grb2 via FAK (focal adhesion kinase) et la protéine adaptatrice Sos (son of sevenless), de manière analogue au cas du complexe protéique membranaire des intégrines qui transduit aussi des signaux de survie cellulaire par cette voie [335-338].

Nous avons vu que l'enzyme **nNOS** est associée au DGC via l' $\alpha$ 1-syntrophine [339], et que son niveau et son activité dans le muscle dystrophique sont réduits [340, 341]. Dans le muscle, le NO active la guanylate cyclase [342], ce qui provoque l'augmentation de la production du second messenger GMPc. Le GMPc régule diverses réponses physiologiques comme la fonction contractile, le métabolisme du glucose et la mobilisation calcique [343]. Le NO régule aussi la vasodilatation adaptative dans le muscle durant l'effort, ainsi la déficience en NO chez DMD est responsable d'ischémie [152, 344]. Cependant, la déficience en nNOS seule n'est pas suffisante pour induire la maladie, car les souris déficientes en nNOS ne développent pas de dystrophie musculaire [345, 346]. Il a donc été proposé que la première atteinte ischémique consécutive de la déficience en nNOS ne conduit à la mort cellulaire que si un second événement induit la susceptibilité du muscle à cette atteinte. Cette prédisposition du muscle à la mort cellulaire serait une conséquence du stress oxydatif et des dérégulations de la signalisation de survie cellulaire que nous avons abordés [347].

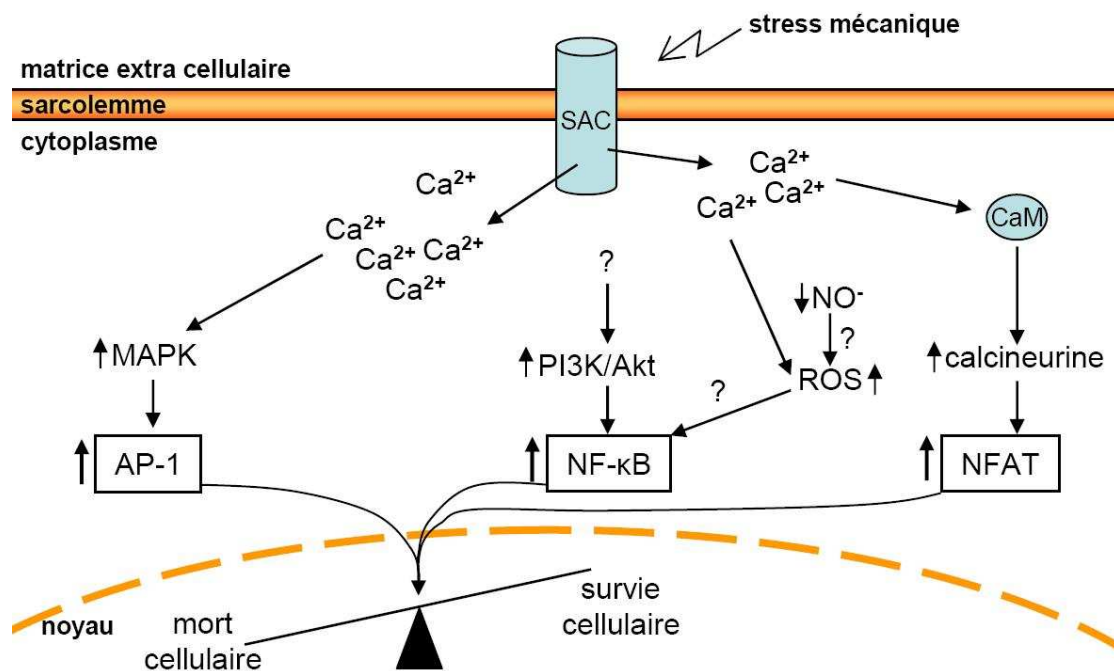
Enfin il a été montré récemment que le DGC peut réguler les flux ioniques car l' $\alpha$ 1-syntrophine du DGC interagit aussi avec TRCP1 pour former un canal SAC (stretch-activated channel). Le DGC stabilise ce canal en plus de sa fonction de stabilisation du sarcolemme. En absence de dystrophine ce canal mécano-sensible est dérégulé, et ce d'autant plus en réponse à un stress mécanique. Cette information est intéressante car l'activité SAC est trouvée avant le pic de nécrose initiant la maladie, et le calcium est un cofacteur régulant de nombreuses voies de signalisation intracellulaire [348].

### **3.3. Rationnel des stratégies anti-inflammatoires pour DMD**

#### **a) Dérégulation de la signalisation de l'inflammation dans le muscle dystrophique**

Les protéines de signalisation associées au DGC (CaM, Grb2 et nNOS) régulent la viabilité cellulaire et l'inflammation à travers trois facteurs de transcription : NFAT, AP-1 et NF- $\kappa$ B. L'activation de NFAT n'a été évaluée qu'en phase symptomatique, on ne peut donc pas conclure sur son implication dans l'initiation de la maladie. Mais l'activité de AP-1 et NF- $\kappa$ B

est augmentée en phase pré-symptomatique chez *mdx*, de plus l'étirement imposé du muscle augmente leur activation [348, 349]. NFAT, AP-1 et NF- $\kappa$ B sont connus pour activer des gènes de l'inflammation qui sont exprimés en phase pré-symptomatique chez l'homme [242, 350]. Par exemple on trouve une augmentation de l'expression des gènes de composants du complément, du HLA (classe I et II) et de chimiokines avant l'âge de 2 ans, mais également en phase symptomatique entre 5 et 12 ans. Chez la souris *mdx* la surexpression de nombreux gènes inflammatoires homologues est aussi retrouvée avant et après la vague initiale de nécrose [351, 352]. Des expériences utilisant des puces à ADN sur des muscles de la souris *mdx* montrent que 30 % des gènes différentiellement exprimés par rapport aux souris saines concernent l'inflammation [351, 353].



**Figure 67 – Hypothèse de la dérégulation des voies de survie cellulaire en l'absence de dystrophine.**

NFAT peut être activé (translocation nucléaire) par une phosphatase  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  dépendante (la calcineurine (Cn)) quand le niveau de calcium intracellulaire augmente [354, 355], ce qui peut être une conséquence de l'activité augmentée du SAC (stretch-activated channel). NFAT a un rôle bivalent puisque son activation provoque l'expression d'utrophine ainsi que l'hypertrophie et la conversion des fibres musculaires vers le type lent [356, 357], ce qui est bénéfique pour le muscle dystrophique. Mais il induit aussi l'expression de cytokines et gènes de l'inflammation. Il est actuellement postulé que l'activité de NFAT avant le pic de nécrose est proche de la normale et favorise la dégénérescence et l'inflammation. Par la suite son activation prononcée en phase symptomatique avec l'augmentation de l'influx calcique aurait un effet bénéfique [338].

**AP-1** (protéine activatrice 1) est régulé par la voie des MAPKs qui est associée au DGC via Grb2. Dans le muscle dystrophique l'influx calcique provoqué par le stress mécanique de SAC active anormalement les MAPKs en aval de la voie (MEK1/2 et ERK1/2) ce qui active AP-1 [348]. Beaucoup de gènes de l'inflammation contiennent des sites consensus de liaison à AP-1 dans leur promoteur. Ceci est notamment le cas pour les cytokines pro-inflammatoires TNF et IL-1 [358, 359] qui sont surexprimées chez *mdx* [349].

Le facteur de transcription **NF-κB** (nuclear factor kappa B) est impliqué dans la réponse inflammatoire [360] et contribue à l'atrophie du muscle dystrophique [361-363]. Des travaux indiquent que le DGC régulerait le NF-κB via la voie PI3K/Akt ou la régulation de la formation de radicaux libres [324, 364]. L'activation du NF-κB active la transcription de gènes possédant le site consensus κB dans leur promoteur tels que des cytokines, des chimiokines, des molécules d'adhésion et des enzymes produisant des médiateurs secondaires de l'inflammation [365]. Une augmentation de l'activation de NF-κB et de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF et IL-1β) est démontrée avant le pic de nécrose chez *mdx* [349]. Et on trouve chez les patients DMD par marquage immunohistologique que 20 à 30 % des fibres nécrotiques ainsi que toutes les fibres en régénération sont positives pour le NF-κB [366]. Le stress mécanique augmente l'activité de IκK dans le muscle dystrophique ce qui augmente l'activation du NF-κB en le libérant de son inhibiteur IκB. L'utilisation d'inhibiteurs de canaux calciques indique que cette activation mécanique de NF-κB est Ca<sup>2+</sup> indépendante dans le muscle sain [349]. Cependant une activation par le calcium serait possible dans le muscle dystrophique [349, 355, 367]. Ainsi, dans le muscle dystrophique l'influx calcique via SAC augmenterait le stress oxydatif et la formation de radicaux libres (ROS) qui semblent être la première source d'activation mécanique de NF-κB [349, 368, 369].

La liaison entre la voie PI3K/Akt et le DGC n'est pas démontrée mais pourrait avoir lieu indirectement à travers CaMKII. Un grand nombre de pistes indiquent que cette voie est dérégulée et anormalement activée dans *mdx* ; par exemple Akt (phosphorylé ou pan-Akt) est élevé dès 2 semaines et significativement augmenté à 4 semaines ainsi que chez la souris *mdx* adulte [364]. De plus, l'activité Akt est encore amplifiée par le stress mécanique [370]. La voie NF-κB a également un effet bivalent puisqu'elle participe aussi à la survie cellulaire via la voie PI3K/Akt qui active l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et cIAP-1 dans le diaphragme des souris *mdx* par exemple [370]. Cependant, l'effet majeur de l'activation de NF-κB dans le muscle dystrophique est de promouvoir l'inflammation et la dégénérescence des fibres musculaires.

L'absence d'un DGC fonctionnel au sarcolemme chez DMD provoquerait donc la dérégulation des voies de survie cellulaire et l'activation aberrante des facteurs de transcription NFAT, AP-1 et NF-κB en phase pré-symptomatique (mais aussi après), de manière potentialisée par le stress mécanique dans le cas de AP-1 et NF-κB (voir **fig. 67**). La conséquence serait une susceptibilité accrue des fibres musculaires à la mort cellulaire,

parallèlement à l'expression de gènes de l'inflammation (cytokines, chimiokines, CMH et gène de remodelage de la matrice extracellulaire). Ces derniers provoquent l'infiltration et l'activation de cellules immunes qui participent à l'atteinte cellulaire [371-373] ce qui initie la pathologie.

### **b) Traitements anti-inflammatoires actuellement utilisés ou en recherche pré-clinique pour DMD**

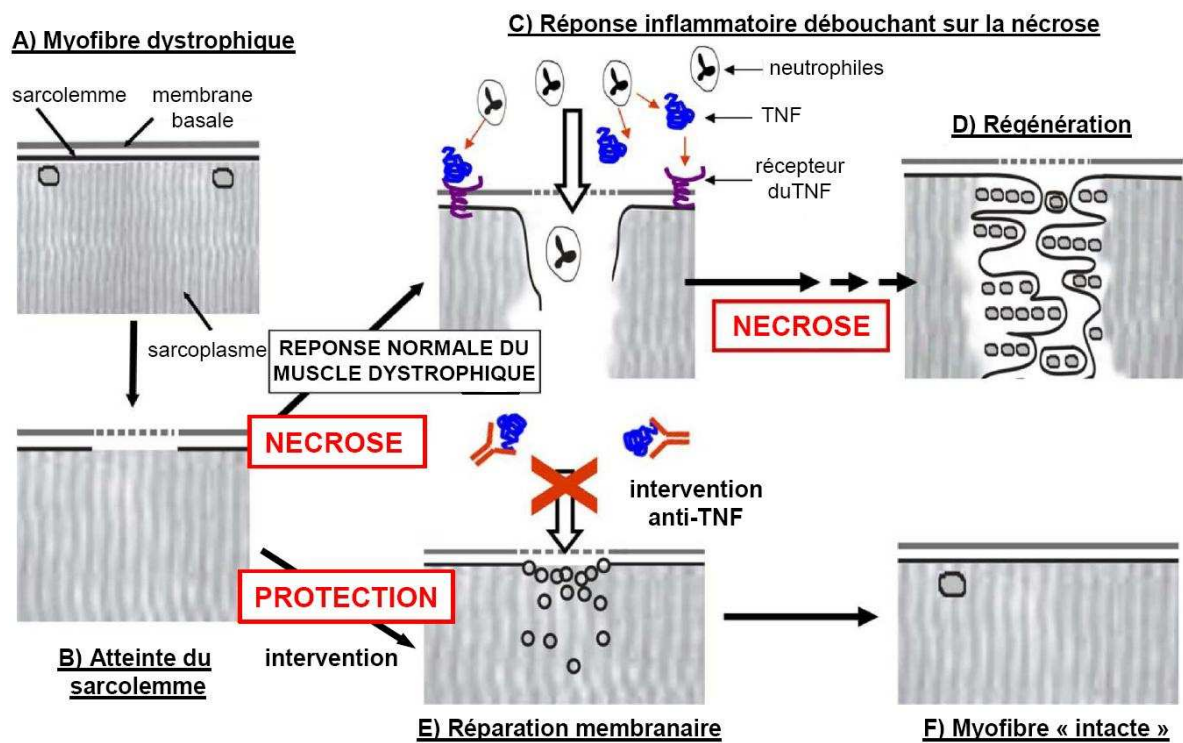
Nous avons vu en détail que l'inflammation et la réponse immune sont deux facteurs clés de la pathogénèse de DMD contribuant au processus dégénératif. Il n'est donc pas étonnant que de nombreux anti-inflammatoires soient évalués pour traiter cette maladie.

Les anti-inflammatoires glucocorticoïdes comme la prednisone/prednisolone et le deflazacort sont le principal traitement pharmacologique ayant un effet bénéfique chez les garçons atteints de DMD. Des essais cliniques indiquent que ce traitement est d'autant plus efficace qu'il débute tôt. Ces molécules améliorent la force musculaire, freinent la progression de la maladie et repoussent l'âge de la perte de la marche de plusieurs années [374-376]. Le mécanisme par lequel les stéroïdes agissent n'est pas clairement défini, ces molécules ayant une action pleiotropique. Les corticostéroïdes lient leur récepteur (GCR=glucocorticoid receptor) dans le noyau et régulent l'expression génique par trans-activation via des « glucocorticoid response element » (GRE) ou par trans-répression en interférant avec d'autres facteurs de transcription. Par exemple, la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et l'antagoniste du récepteur de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 (IL-1Ra) possèdent un GRE dans leur promoteur [377, 378]. Le GCR active également l'expression de l'inhibiteur du NF- $\kappa$ B : I $\kappa$ B- $\alpha$  [379]. On peut aussi citer l'exemple de trans-répression de AP-1 par le GCR activé [380]. Et il a été montré que le deflazacort augmente l'expression génique NFAT-dépendante dans le muscle dystrophique [381]. Cependant l'utilisation à long terme de ces glucocorticoïdes chez les patients atteints de DMD provoque des effets secondaires importants (particulièrement la prednisone) tels que la prise de poids, la réduction de la densité osseuse et une baisse de la tolérance au glucose [382].

D'autres approches inhibant spécifiquement la voie NF- $\kappa$ B ont montré un gain de fonction et de diamètre sur des fibres musculaires isolées de souris *mdx* avec l'inhibiteur pyrrolidine dithiocarbamate [383]. Viser directement les cellules immunes infiltrées peut également être bénéfique. En effet, une déplétion des cellules T induite par des anticorps dans des souris *mdx* montre une réduction de l'affection musculaire [373]. Ce même effet fut également rapporté dans une expérience dont ce n'était pas le but premier ; en effet durant l'utilisation d'un traitement anticorps anti-CD4 dans la souris *mdx* – afin d'interférer avec la réaction immune induite par l'expression du gène rapporteur LacZ – il a été noté que les signes histologiques de la pathologie musculaire étaient plus modérés comparés aux souris non traitées de même âge [384]. Au niveau fonctionnel, des stabilisateurs de la membrane des mastocytes comme le cromoglycate, démontrent dans plusieurs études depuis 1996 des gains significatifs de la force

chez la souris *mdx* [385], mais n'ont pas encore fait l'objet d'essais cliniques chez les patients DMD.

Actuellement, des thérapies ciblées contre des cytokines inflammatoires sont à l'étude chez *mdx*. Ces traitements sont généralement utilisés dans le cadre d'autres pathologies chroniques inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde. Ainsi Enbrel et Remicade qui sont des inhibiteurs du TNF ont montré une certaine efficacité chez *mdx* [386, 387]. Miranda Grounds et coll. ont par exemple montré que l'anticorps anti-TNF cV1q permettait la réduction des dommages musculaires et du niveau de CK associés à l'exercice physique chez la souris *mdx*. De plus, l'exercice étant volontaire dans ce protocole, il a été montré une amélioration de la fonction musculaire et un effet sur le « bien être » des souris traitées puisqu'elles couraient davantage [388]. Cette équipe propose ainsi un modèle selon lequel l'inhibition du TNF permettrait aux atteintes mineures des membranes des fibres dystrophiques abîmées d'être réparées par « patching » plutôt que de se nécroser du fait du cumul des dommages membranaires (voir *fig. 68* ci-après).



**Figure 68 – Modèle d'inhibition de la nécrose des fibres musculaires par un anti-TNF lors de l'initiation de la pathologie chez la souris *mdx*.**

**A) et B)** La fibre dystrophique est plus sensible aux atteintes membranaires. **C) et D)** L'hypothèse est que l'infiltration inflammatoire (neutrophiles, sécrétion de TNF) contribue à la nécrose des fibres musculaires ayant subi des dégâts initiaux. **E) et F)** L'inhibition du TNF permettrait aux atteintes primaires du sarcolemme d'être réparées par un mécanisme impliquant des vésicules « colmatant la brèche », la fibre retrouverait ainsi un état relativement normal. Adapté de Hodgetts et coll. [387].

Le rôle du TNF dans la dystrophie de Duchenne a également été exploré en utilisant des souris transgéniques *mdx* TNF (-/-). De manière surprenante les analyses histologiques ont montré que l'absence de TNF n'améliorait pas le phénotype [389]. Cependant, comme

l'indique Grounds et coll. [386], il est possible que l'absence de TNF *in vivo* depuis l'embryogenèse soit compensée par d'autres cytokines pro-inflammatoires.

### 3.4. Récepteur du TNF et dérivés

#### a) Les récepteurs du TNF

Il existe deux récepteurs de forte affinité du TNF de 55 kDa et 75 kDa, nommés respectivement TNFR-I (ou p55) et TNFR-II (ou p75) [390-392]. Les gènes codant ces récepteurs sont homologues mais sont présents sur deux chromosomes différents. Chez l'homme, le gène du TNFR-I est localisé sur le chromosome 12 (en 12p13.2), et le gène du TNFR-II est sur le chromosome 1 (en 1p36.3-p36.2). Le TNFR-I comporte 426 acides aminés, et le TNFR-II 439 acides aminés. Ce sont des protéines glycosylées transmembranaires de type II, dont les domaines extracellulaires contiennent quatre domaines riches en cystéine (CRD) bien conservés. Par contre, leurs domaines intracellulaires sont très différents, indiquant des voies de transduction distinctes. Dans ces domaines intracellulaires, on note la présence d'un domaine de mort pour le TNFR-I, nommé ainsi de part son implication dans l'apoptose induite par le TNF [393] ; le TNFR-II ne possède pas ce domaine de mort, mais une région riche en sérine qui subit des phosphorylations.

Le TNFR-I est ubiquitaire alors que le TNFR-II est essentiellement exprimé à la surface des cellules endothéliales et des cellules du système immunitaire [394]. Les deux récepteurs ont une forte affinité pour le TNF, avec une constante de dissociation à 37°C d'environ  $1,9 \cdot 10^{-11}$  et  $4,2 \cdot 10^{-10}$  M pour les TNFR-I et TNFR-II, respectivement [395]. Le TNFR-I est donc plus affiné pour le TNF que le TNFR-II. Les domaines CRD2 et 3 des récepteurs sont responsables de l'interaction en se liant dans les sillons externes entre les sous unités du TNF trimérique [286]. La liaison d'une molécule de TNF à un seul monomère de récepteur sur la cellule cible n'est pas suffisante pour induire une transduction du signal ; la dimérisation ou la trimérisation des domaines intracellulaires des récepteurs est nécessaire [291]. Avant la fixation du ligand, les récepteurs peuvent s'assembler en complexes via leur domaine PLAD (pre-ligand-binding assembly domain) [293]. Les PLAD sont des domaines extracellulaires N-terminaux distincts de la zone d'interaction du TNF ; ils sont cependant nécessaires à la liaison au TNF et à son efficacité. Les TNFR-I et -II s'associent préférentiellement entre eux en homotrimères, mais le TNFR-I peut être trouvé sous forme de dimère.

La fixation du TNF sur son récepteur active des voies d'apoptose ou bien des voies impliquées dans l'immunité et l'inflammation [396-398] (voir *fig. 69* ci-après).

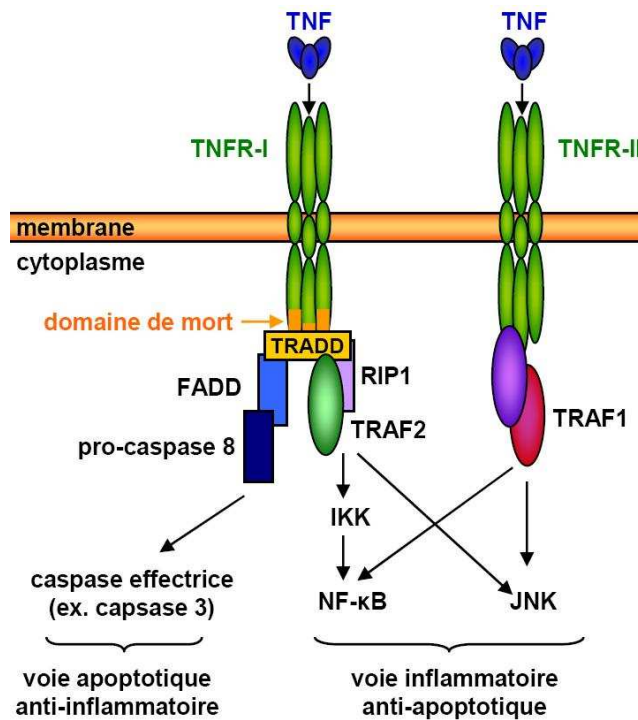


Figure 69 – Voies de signalisation du TNF par les récepteurs TNFR-I et TNFR-II.

La stimulation du **TNFR-I** peut activer la voie inflammatoire et anti-apoptotique (MAPK et NF-κB), mais aussi la voie apoptotique. L'activation du TNFR-I induit le recrutement de la protéine adaptatrice TRADD (TNFR associated death domain) [399] et de FADD (Fas-associated death domain) [400] qui activent la voie apoptotique des caspases 8 et 10. Le virus de la vaccine est capable de protéger la cellule qu'il infecte de l'apoptose en inhibant ces caspases. Or il a été rapporté que le TNF stimulant ces cellules infectées est tout de même capable de les détruire par un processus de nécrose [401]. Le facteur TRADD recruté peut également interagir avec des facteurs TRAFs (TNF receptor associating factors) initiant la voie anti-apoptotique NF-κB [400, 402, 403]. Il semble que l'association du TNF au TNFR-I active l'une ou l'autre des voies de signalisation en fonction de la localisation membranaire du complexe dans des radeaux lipidiques. La liaison du TNF au récepteur TNFR-I induit la séquestration du récepteur dans des radeaux lipidiques où il active la voie NFκB, et où il est clivé par ADAM-17/TACE. L'exclusion de ces radeaux lipidiques provoque l'endocytose du récepteur et induit la voie apoptotique [404, 405]. On peut voir dans la **figure 69** que l'intermédiaire clé de la signalisation permettant d'activer la voie des MAPK (JNK) et de NF-κB est TRAF2 (TNFR associated factor-2).

Le **TNFR-II** a principalement une activité anti-apoptotique via la voie NF-κB [406] en recrutant TRAF2. Il a été rapporté dans certaines cellules une activité apoptotique médiée par le TNFR-II, mais elle implique alors un dialogue (cross-talk) entre le TNFR-I et le TNFR-II [407, 408].

Ces deux récepteurs transmembranaires peuvent être libérés sous forme soluble en réponse à certains stimuli, ils sont alors nommés TNFR-I<sub>s</sub> (30kD) et TNFR-II<sub>s</sub> (40kD). Ces récepteurs

solubles ont été détectés *in vivo* dans de nombreux liquides biologiques (sérum, liquide synovial, fluides cérébro-spinaux et urine) [409]. Ils sont formés par clivage du domaine extracellulaire à partir des récepteurs transmembranaires, par des enzymes protéolytiques comme la TACE notamment. Ils conservent la même affinité pour le TNF que leur précurseur transmembranaire. Le rôle physiologique des récepteurs solubles n'est pas entièrement élucidé, mais semble dépendre du ratio TNF/TNFRs. Il a été spéculé que la forte libération de TNFRs en réponse à la stimulation par le TNF serait un mécanisme inhibant le TNF en entrant en compétition avec le récepteur cellulaire. Ceci servirait à localiser la réponse au seul tissu inflammé, en limitant la réponse systémique. Il est également possible, en condition physiologique, quand la concentration de récepteur soluble est plus faible, qu'il joue le rôle de réservoir du TNF. Le TNF serait alors stabilisé et ses propriétés pharmacocinétiques améliorées du fait d'une dégradation protéolytique et/ou d'une excrétion urinaire réduite [410].

### b) Inhibiteurs biologiques du TNF dérivés des TNFR

En plus des divers anticorps développés par l'industrie pharmaceutique, l'utilisation des récepteurs solubles en tant qu'inhibiteurs pharmacologiques du TNF s'est naturellement imposée. Pour être efficace en thérapie ces molécules recombinantes doivent avoir une demi-vie conséquente, et elles doivent pouvoir bloquer plusieurs sous unités du TNF soluble trimérique afin de créer un environnement stérique suffisant pour empêcher la liaison du TNF à ses récepteurs membranaires. La forme native monomérique des récepteurs soluble est donc inadaptée car elle est peu stable *in vivo* (moins de deux heures pour le TNFR-Is [411]). De plus, les formes monomériques bloquent uniquement une sous unité du TNF trimérique ce qui neutralise moyennement l'activité biologique du TNF.

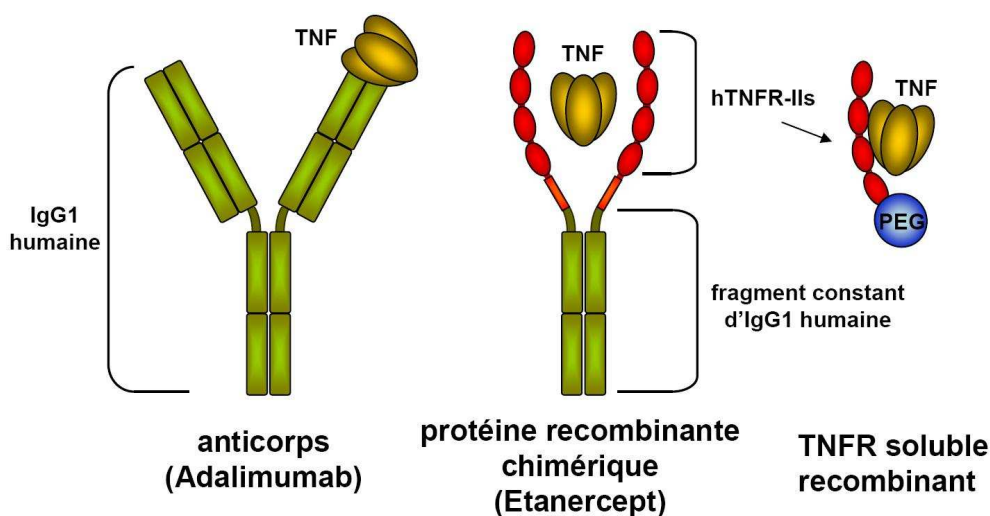


Figure 70 – Différentes classes de molécules liant et neutralisant le TNF.



Les principales molécules étudiées ou commercialisées dérivées des TNFR sont (d'après la revue [412]) :

- **Etanercept** (Enbrel) : protéine recombinante chimérique produite en cellules CHO, associant deux portions extracellulaires du récepteur de type II du TNF humain couplées au fragment constant d'une IgG1 humaine (premières AMM approuvées pour la PR par la FDA en 1998, et en 2000 par l'EMEA)
- **Lenercept** : identique à l'etanercept avec utilisation du TNFR-Is (développement arrêté).
- **Onercept** : protéine recombinante hTNFR-Is (Serono, développement arrêté ; sérieux effets secondaires durant les essais cliniques pour le psoriasis ; dosage baissé dans les essais cliniques pour la maladie de Crohn : inefficace [413]).
- **Dimère PEG** : deux fragments de TNFR-Is humain couplés au PEG (Amgen).
- **Monomère PEG** : un fragment de hTNFR-Is (complet ou non) couplé au PEG.

A la différence des anticorps anti-TNF, les récepteurs solubles sont capables de se lier aux TNF membranaire et soluble, mais aussi à la lymphotoxine (TNF- $\beta$ ). Ces molécules présentent des avantages et des inconvénients. Les protéines fusionnées présentent une stabilité semblable à une immunoglobuline (de l'ordre de 5 jours), mais surtout une affinité de liaison et une capacité à neutraliser le TNF nettement plus élevée que les TNFRs monomériques [414]. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle il faut bloquer plusieurs sous-unités du TNF trimérique pour empêcher son activité biologique, la transduction du signal nécessitant la fixation simultanée de plusieurs ligands.

La comparaison entre la protéine fusionnée TNFR-Is/IgG et un anticorps anti-TNF a été réalisée *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle d'infection, mettant en évidence une activité biologique au moins dix fois supérieure de la protéine TNFR-Is/IgG [415]. Les récepteurs solubles pegylés se sont avérés moins efficaces que ceux fusionnés aux IgG car leur demi vie est 5 fois moindre (environ 1 jour), leur affinité pour le TNF est également plus faible, et certains sont immunogènes (formation d'anticorps neutralisants). Globalement, l'étude de ces différentes molécules montre que les protéines de fusion ont une meilleure demi-vie mais sont plus immunogènes que les fragments recombinants non chimériques. Ainsi, le développement de l'Onercept, avant son abandon, a montré son instabilité (demi-vie terminale estimée à 15 heures), et une non immunogénicité après 6 injections [416, 417]. Les effets secondaires de l'Etanercept sont comparables à ceux décrits plus tôt avec les anticorps anti-TNF.

## Objectifs

Un des seuls traitements chez l'homme qui ralentit significativement la progression d'une dystrophie de Duchenne (DMD) est l'administration d'un anti-inflammatoire stéroïdien (prednisone ou deflazacort). Une des explications possibles de l'effet bénéfique de ces composés est le rôle de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  dans la pathophysiologie de DMD. En accord avec cette hypothèse, une étude menée sur la souris dystrophique *mdx* indique qu'un agent biologique anti-TNF- $\alpha$  – l'anticorps Remicade au mode d'action spécifique (contrairement aux corticostéroïdes) – ralentit la destruction du muscle.

Au vu de ces résultats encourageants, nous nous sommes proposés d'utiliser une approche de transfert de gènes pour faire produire par le muscle dystrophique un récepteur soluble du TNF- $\alpha$ . Ceci présenterait le double avantage par rapport à une protéothérapie d'éviter des injections régulières et d'avoir en circulation, de manière constante, une concentration de protéine transgénique thérapeutique. Nous avons donc évalué la capacité du muscle dystrophique à sécréter dans le sang une protéine transgénique chimérique fusionnant le récepteur I du TNF et la partie constante d'une IgG1 (TNFR-Is/mIgG1) ; puis nous avons évalué le potentiel thérapeutique de cette approche chez la souris *mdx*.

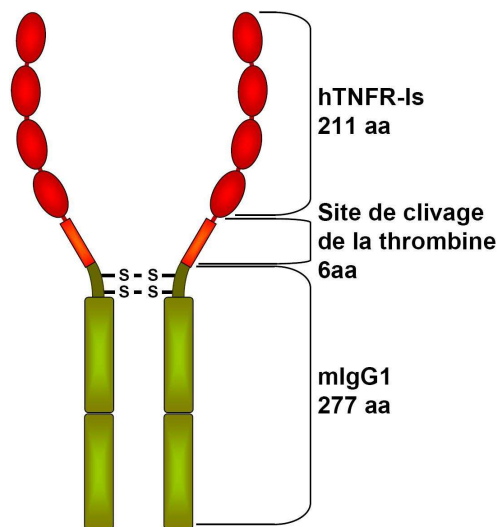
# Résultats

## 1. Transfection du muscle dystrophique pour la sécrétion de chimères du récepteur I du TNF

### 1.1. Électrotransfert de plasmides codant la chimère hTNFR-Is/mIgG1

#### a) Étude cinétique chez la souris *mdx*

Le transgène que nous avons utilisé est le résultat de la fusion des ADNc du récepteur soluble I du TNF humain (hTNFR-Is) et du fragment constant d'une immunoglobuline murine (mIgG1) par l'intermédiaire d'un peptide sensible à la thrombine. La protéine transgénique chimérique a donc été nommée hTNFR-Is/mIgG1. La fusion au fragment constant d'IgG permet d'augmenter la stabilité et la demi-vie de la molécule *in vivo*. La protéine transgénique est dimérique du fait de modifications post-traductionnelles regroupant les mIgG1 des monomères via des ponts disulfures (*fig. 71*). Ainsi la protéine chimérique possède deux récepteurs I, ce qui augmente son activité anti-TNF par rapport au récepteur soluble en améliorant son affinité pour le TNF [418].

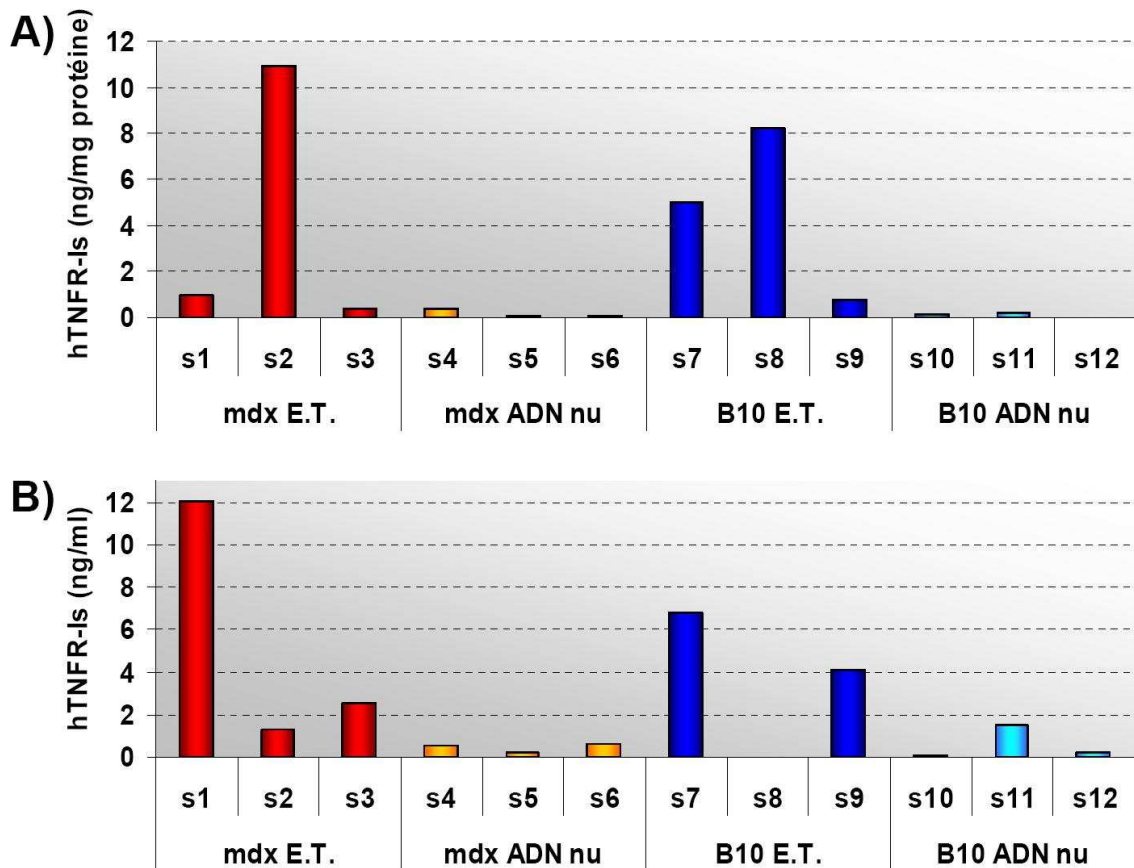


**Figure 71 – Schémas du hTNFR-Is/mIgG1.**

Le mIgG1 comprend le fragment constant de l'immunoglobuline et la région charnière dimérisant la molécule via 2 ponts disulfure.

Le lot de plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 que nous avons produit (exempt d'endotoxines) a d'abord été testé *in vitro*. Des cellules MRC5-V2 ont été transfectées transitoirement par le plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 ou un plasmide contrôle codant la luciférase (pLuc) et les milieux conditionnés ont été récoltés. Le dosage du hTNFR-I par ELISA montre bien la présence de la protéine hTNFR-Is/mIgG1 sécrétée dans le milieu des cellules transfectées par pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 et son absence dans le milieu des cellules transfectées par pLuc.

Après cette vérification nous avons injecté 40 µg de plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 nu dans le muscle tibial antérieur gauche (TAG) de souris dystrophiques *mdx* ou de souris contrôle saines C57BL/10ScSn de même fond génétique (B10). La même expérience a également été réalisée en injectant 25 µg de pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 et en procédant à l'électrotransfert du muscle. Les souris ont été prélevées en sang à J0 avant l'injection puis à J7, J14 et J21, puis elles ont été sacrifiées à J21 et les muscles tibials antérieurs injectés (TAG) et controlatéraux (TAD) ont été prélevés.



**Figure 72 – Expression de hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris *mdx* transfectées avec le plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1.**

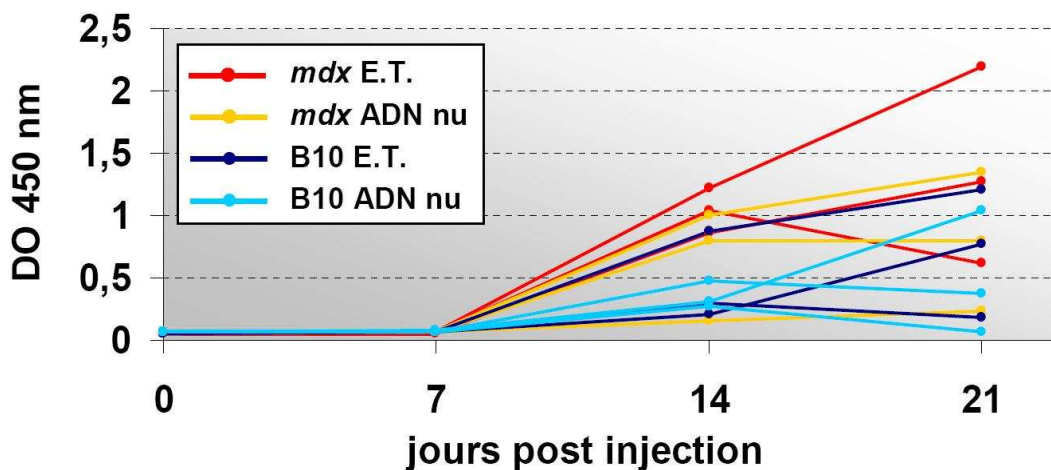
Des souris *mdx* et C57BL10 ♀ âgées de 6 à 8 semaines sont électrotransférées avec 25 µg de plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1, ou injectées avec 40 µg de plasmide seul dans le muscle tibial antérieur gauche (TAG). **A)** Dosage du hTNFR-Is/mIgG1 par ELISA dans les broyats de TAG prélevés au sacrifice à J21. **B)** Dosage du hTNFR-Is plasmatique à J7 post injection. Chaque colonne correspond à une souris. Abréviations : souris C57BL/10ScSn : B10 ; électrotransfert : E.T. ; souris 1 : s1.

La **figure 72** présente le dosage du hTNFR-I par ELISA dans ces prélèvements. L'anticorps utilisé dans cet ELISA est spécifique du récepteur humain, la protéine dosée correspond donc uniquement au hTNFR-Is/mIgG1 sans interférence du récepteur murin endogène membranaire (mTNFR-I) ou soluble (mTNFR-Is). Aucune expression n'a été trouvée dans les TA et le plasma de 2 souris contrôle injectées avec du PBS. Chez les souris ayant reçu une injection de plasmide on ne trouve aucune expression du transgène par ELISA dans les

muscles non injectés TAD (non montré). Par contre on retrouve du hTNFR-Is/mIgG1 dans le muscle injecté (TAG) de toutes les souris hormis chez la souris 12 (*fig. 72A*). Comme attendu, on constate que l'électrotransfert améliore la transfection du muscle. En revanche la présence de hTNFR-Is/mIgG1 n'est pas détectée dans les prélèvements sanguins hormis transitoirement à J7 (*fig. 72B*). On constate également que les souris 2 et 8 – qui présentent les meilleures expressions musculaires à J21 – ont les niveaux de protéine transgénique sécrétée les plus bas de leur groupe à J7, la concentration étant d'ailleurs nulle dans le sang de la souris 8.

### b) Évaluation des anticorps anti-hTNFR-Is

La sécrétion transitoire de la protéine hTNFR-Is/mIgG1 dans le sang alors qu'elle est toujours exprimée dans le muscle à J21 suggère qu'une réponse immune dirigée contre le transgène a été générée. Nous avons donc analysé la présence d'IgG anti-hTNFR-Is dans le sang des souris de l'expérience de la *figure 72*.



**Figure 73 – Analyse des anticorps anti hTNFR-Is/mIgG1 du protocole de transfection du plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1.**

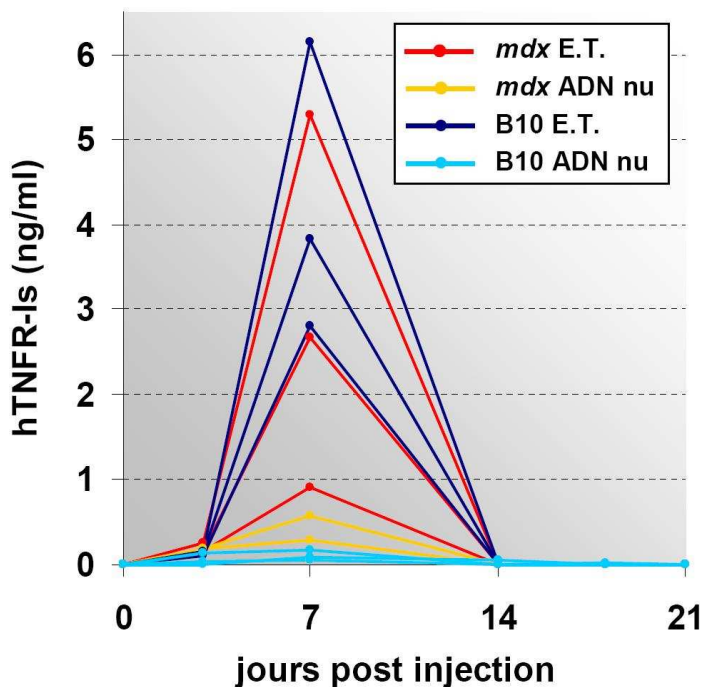
Analyse semi-quantitative par ELISA des anticorps anti hTNFR-Is présents dans les plasmas prélevés chez les souris du protocole présenté dans la *figure 72* (dilution du plasma : 1/270).

La *figure 73* montre l'apparition d'IgG anti-hTNFR-Is au cours du temps chez toutes les souris. On observe également que cette réponse humorale a tendance à être plus intense chez les souris *mdx* comparé aux souris contrôle B10 (courbes rouges ou orange vs bleues foncé ou bleues clair).

Cette expérience indique donc que la protéine hTNFR-Is/mIgG1 est immunogène chez les souris de fond génétique C57BL/10ScSn (CMH d'haplotype H-2b).

c) Immunogénicité du squelette plasmidique

Afin de déterminer dans quelle mesure la cassette d'expression participe à l'initiation de la réponse immune contre le transgène nous avons reproduit l'expérience précédente avec le plasmide pCOR-hTNFR-Is/mIgG1. Ce plasmide contient notre cassette d'expression dans le squelette plasmidique pCOR. Les plasmides pCOR\* sont des miniplasmides de taille réduite par rapport aux plasmides classiquement utilisés ; leur squelette plasmidique ne contient aucune séquence immunostimulatrice CpG hypométhylée [419]. Le plasmide pCOR-hTNFR-Is/mIgG1 a une taille inférieure au pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1. Nous avons donc respecté la molarité de l'expérience précédente en injectant une masse inférieure de pCOR-hTNFR-Is/mIgG1 pour être parfaitement comparable.



**Figure 74 – Cinétique de sécrétion du hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris transfectées avec le plasmide pCOR-hTNFR-Is/mIgG1.**

Des souris *mdx* et C57BL10 ♀ âgées de 6 à 8 semaines sont électrotransférées avec 20 µg de plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1, ou injectées avec 32 µg de plasmide seul dans le muscle tibial antérieur gauche (TAG). Des prélèvements sanguins sont effectués à J0, J3, J7, J14, J18 et J21 post injection. Le hTNFR-Is/mIgG1 plasmatique est dosé par ELISA. Abréviations : électrotransfert : E.T. ; C57BL10 : B10.

La *figure 74* présente les résultats du dosage plasmatique de hTNFR-Is chez les souris injectées avec le plasmide pCOR-hTNFR-Is/mIgG1. Comme dans le cas du plasmide pVAX2 on observe une expression transitoire du hTNFR-Is/mIgG1. La réponse immune contre la protéine transgénique semble donc indépendante du caractère inflammatoire du squelette plasmidique utilisé.

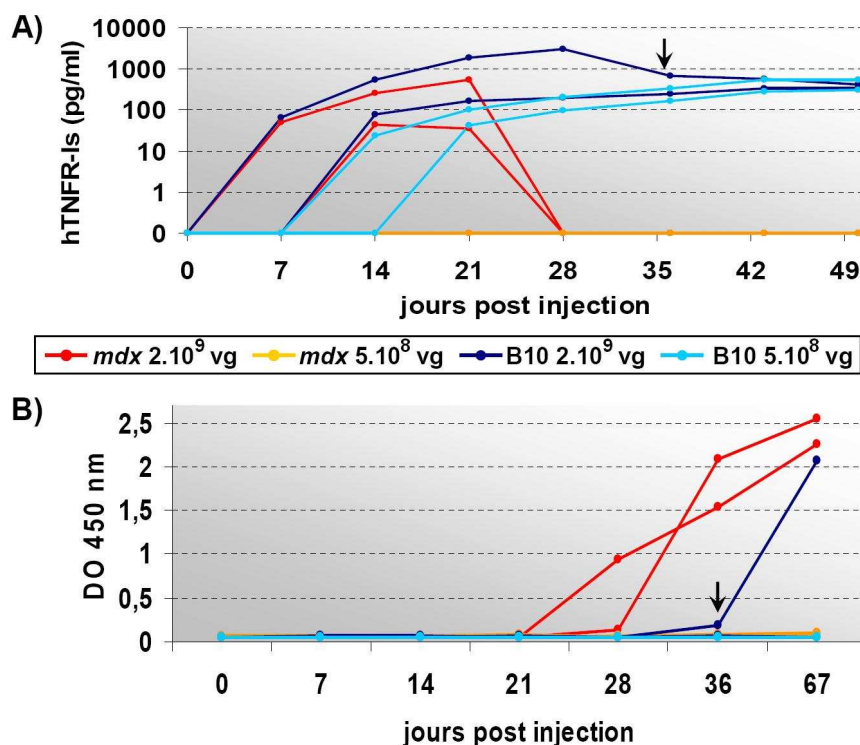
Les travaux de Carole Bloquel indiquent cependant que l'électrotransfert du plasmide pCOR-hTNFR-Is/mIgG1 conduit à une sécrétion d'au moins 6 mois chez la souris DBA/1 [420]. Ce qui indique que l'immunogénicité du hTNFR-Is/mIgG1 varie selon le CMH des souris (DBA/1 d'haplotype H2-q vs C57BL/10ScSn d'haplotype H2-b).

\* Conditional Origin of Replication.

## 1.2. Vectorisation du hTNFR-Is dans un AAV

### a) Administration intramusculaire

Nous avons défini que la sécrétion transitoire est principalement dûe à une réponse immune contre le transgène indépendamment du squelette plasmidique. Dès lors, plusieurs choix s'offrent à nous : utiliser un traitement immunosuppresseur, modifier le transgène, ou encore exploiter une voie d'administration ou une vectorisation plus tolérogène. L'utilisation d'immunosuppresseur est exclue dans notre cas car il interférerait avec l'évaluation de la stratégie anti-inflammatoire chez la souris dystrophique. De plus, une immunosuppression transitoire n'est pas envisageable dans le cas d'un immunogène sécrété en permanence. Notre cassette d'expression faisant ~2,3 Kb, nous avons donc choisi dans un premier temps de la vectoriser dans un AAV. En effet, ce vecteur a été rapporté comme tolérogène dans le muscle [255]. Nous avons donc sous-cloné la cassette d'expression entre 2 ITR2 dans le vecteur plasmidique pGG2 afin d'obtenir le pGG2-hTNFR-Is/mIgG1 contenant le génome viral recombinant de ~3,4 Kb. Ce plasmide est alors utilisé pour produire le vecteur pseudotypé AAV6-hTNFRIs/mIgG1 par la méthode de tritransfection décrite page 189.



**Figure 75 – Sécrétion du hTNFR-Is/mIgG1 et anticorps anti-hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris transduites avec le vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 en intramusculaire.**

Des souris *mdx* et C57BL10 ♀ âgées de 3 à 4 mois sont injectées avec  $5.10^8$  ou  $2.10^9$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 (25  $\mu$ l dans le TAG). **A)** Dosage par ELISA du hTNFR-Is/mIgG1 plasmatique sur les prélèvements sanguins effectués chaque semaine. **B)** Analyse semi-quantitative par ELISA des IgG anti hTNFR-Is/mIgG1 plasmatiques (dilution 1/90).

L'administration en IM du vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris B10 et *mdx* montre un profil de sécrétion amélioré. Contrairement à ce que nous obtenons en transfection avec les plasmides pVAX2 et pCOR, il est possible de sécréter de manière stable le hTNFR-Is/mIgG1 chez la souris saine B10 aux deux doses de vecteur AAV testées (voir courbes bleues de la **fig. 75A**). La cinétique de sécrétion est plus lente que dans le cas de la vectorisation non virale, et elle atteint un plateau après J28. Il n'y a pas de réponse anticorps chez les souris B10, hormis chez la souris présentant la plus forte sécrétion, et cela est corrélé à une inflexion dans la courbe de sécrétion à J36 indiquée par une flèche dans la **figure 75**. En revanche, aucune sécrétion n'est dosée chez la souris *mdx* injectée avec la dose de  $5.10^8$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1. Cela peut être dû à une transduction inférieure du muscle dystrophique comparé au muscle sain. A la dose de  $2.10^9$  vg chez la souris *mdx*, on obtient une sécrétion transitoire disparaissant entre J21 et J28 parallèlement à l'apparition d'une réponse anticorps (courbes rouges **fig. 75A** et **B**).

Notons enfin que la réponse anticorps débute après un délai de 2 à 3 semaines après l'apparition de hTNFR-Is/mIgG1 dans le sang. Et cette réponse humorale augmente toujours 2 mois après l'apparition de l'antigène dans le sang (J67). Cette cinétique plus longue d'apparition de la protéine transgénique et de la réponse anticorps est liée au temps de conversion du génome viral en double brin.

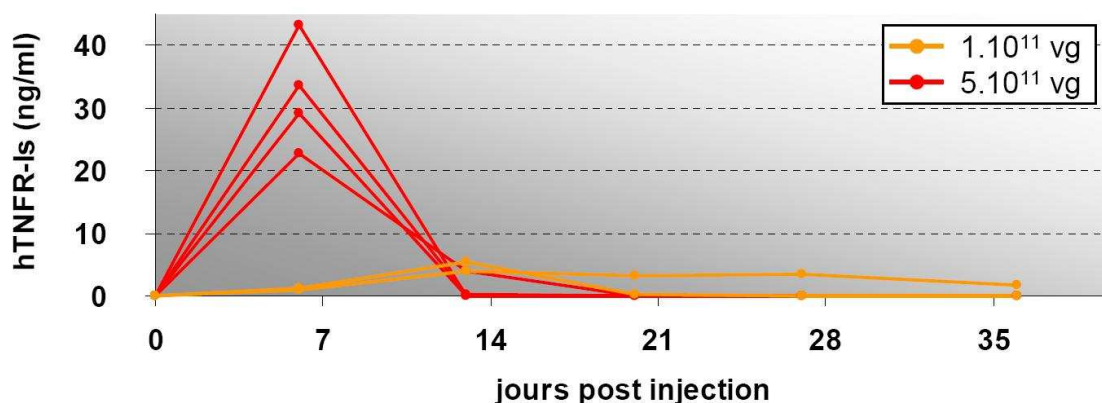
En résumé, il est possible de faire sécréter de manière stable le hTNFR-Is/mIgG1 chez la souris B10 sans réponse humorale si l'expression ne dépasse pas un seuil donné. Cependant la sécrétion reste transitoire chez la souris *mdx*.

### **b) Administration intraveineuse**

L'expression d'un transgène dans le foie est tolérogène [421]. Or une grande partie de l'AAV injecté en IV est capté par le foie. Nous avons donc testé cette voie d'administration avec notre AAV6 dans le but d'induire une tolérance vis-à-vis du hTNFR-Is/mIgG1 immunogène et ainsi permettre une expression stable chez la souris *mdx*.

La cassette d'expression du vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 est sous le contrôle du promoteur CMV. Ce dernier n'est pas le promoteur idéal pour obtenir une expression dans le foie dans la mesure où il subit une inactivation progressive.





**Figure 76 – Cinétique de sécrétion du hTNFR-Is/mIgG1 chez la souris *mdx* transduite avec le vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 en intraveineuse.**

Des souris *mdx* ♀ âgées de 10 à 13 semaines sont injectées avec  $1.10^{11}$  vg (n=2) ou  $5.10^{11}$  vg (n=4) d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 en IV (450  $\mu$ l à la veine caudale). Le hTNFR-Is/mIgG1 est dosé par ELISA sur les prélèvements sanguins effectués chaque semaine.

La **figure 76** montre que la dose élevée de  $5.10^{11}$  vg injectée en IV conduit à une forte expression transitoire dont la chute est trop rapide pour rendre compte de la seule répression du promoteur CMV. Il s'agit donc d'une réponse immune contre le transgène. En revanche, l'expression est maintenue jusqu'à J36 dans une des 2 souris injectées avec  $1.10^{11}$  vg. Contrairement à l'administration IM conduisant à une expression transitoire chez la souris *mdx*, l'administration de  $1.10^{11}$  vg de vecteur AAV en IV peut donc permettre la sécrétion stable de la protéine. Il serait donc intéressant de reproduire cette expérience chez la souris *mdx* avec l'injection IV d'un AAV de sérotype plus efficace dans le foie (AAV8), et codant le hTNFR-Is/mIgG1 sous le contrôle d'un promoteur spécifique du foie. Cependant, nous avons préféré par la suite baisser l'immunogénicité de la protéine chimérique TNFR-Is/mIgG1 plutôt que d'exploiter la tolérance induite par cette voie d'administration vis-à-vis du hTNFR-Is/mIgG1 immunogène.

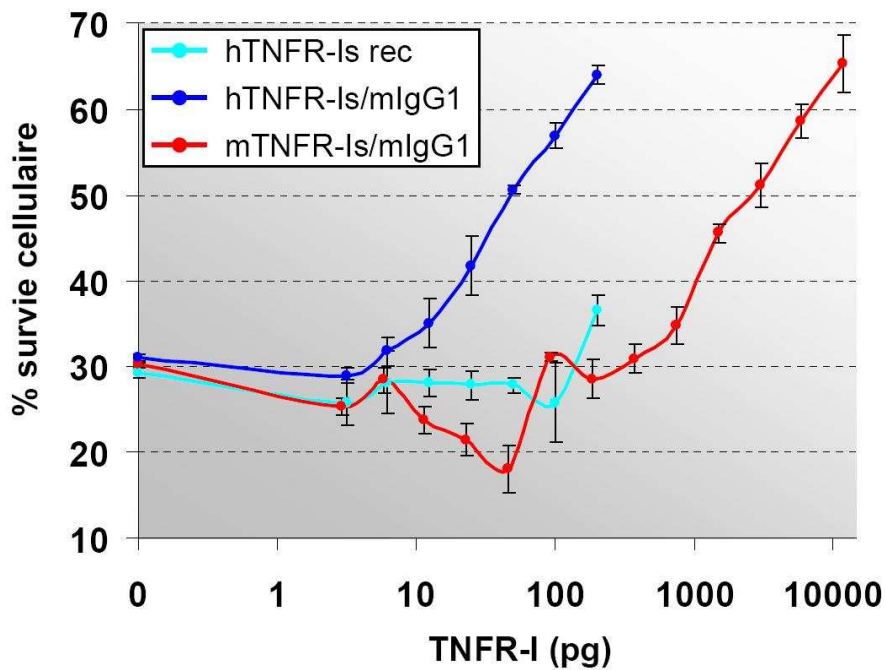
### 1.3. Construction et caractérisation d'une chimère murine

#### a) Test de l'activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1

Afin de baisser l'immunogénicité de la protéine transgénique nous avons produit une version entièrement murine du récepteur soluble chimérique. Pour cela, nous avons remplacé la séquence du récepteur humain par l'ADNc du récepteur soluble murin homologue dans la cassette d'expression du pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 (voir p187). Le plasmide obtenu nommé pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 a également été utilisé pour cloner la cassette d'expression du mTNFR/mIgG1 entre les 2 séquences ITR2 du pGG2. Le plasmide pGG2-mTNFR-Is/mIgG1 sera utilisé pour vectoriser ce nouveau transgène dans un AAV.

Avant de tester l'immunogénicité du transgène mTNFR-Is/mIgG1 *in vivo*, l'intégrité de la séquence du transgène a été vérifiée par séquençage dans les 2 plasmides produits (pVAX2-

et pGG2-mTNFR-Is/mIgG1). Puis, une expérience de transfection transitoire du pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 ou du plasmide contrôle pLuc a été réalisée sur des cellules MRC5-V2 d'origine humaine afin d'obtenir un milieu conditionné contenant la protéine transgénique. La concentration de mTNFR-Is présent dans les milieux dosés par ELISA confirme l'absence de la protéine d'intérêt dans le milieu contrôle et sa présence dans le milieu conditionné de la transfection par pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1. Le milieu conditionné a été utilisé pour évaluer l'activité biologique de la protéine transgénique *in vitro*.



**Figure 77 – Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit *in vitro*.**

L'activité biologique des variants du récepteur soluble du TNF est évaluée par leur capacité à inhiber la toxicité induite par le TNF murin sur la lignée cellulaire L929 (méthode p208). Cette expérience compare l'activité biologique du hTNFR-Is/mIgG1 et du mTNFR-Is/mIgG1 provenant de milieux conditionnés de transfections de cellules MRC5-V2 par les plasmides pVAX2 correspondants. Un récepteur soluble hTNFR-Is est utilisé comme contrôle positif. Chaque échantillon est testé en triplicat.

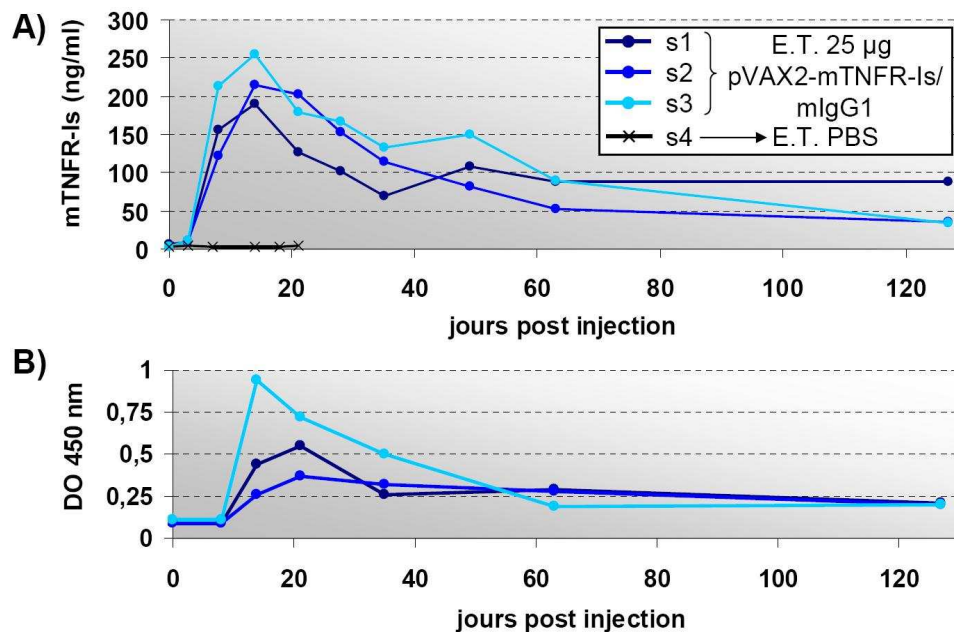
Le test biologique consiste à mesurer la survie cellulaire de cellules L929 sensibles au TNF lors d'une incubation avec le récepteur chimérique murin mTNFR-Is/mIgG1 et une quantité de TNF murin toxique. La **figure 77** présente le résultat de cette expérience. On constate que seules 30 % des cellules sont viables en l'absence de récepteur soluble inhibant le TNF. La courbe rouge indique que le mTNFR-Is/mIgG1 produit *in vitro* possède une activité inhibitrice du TNF dose dépendante, comme l'indique l'amélioration de la survie des cellules L929.

Le récepteur TNFR-I membranaire murin a la même affinité pour le TNF murin ou humain [422]. Étant donné que le récepteur soluble libéré par clivage de la forme membranaire conserve la même affinité pour le TNF, il apparaît ici que le mTNFR-Is/mIgG1 produit *in*

*in vitro* inhibe pour une raison inconnue le TNF murin moins efficacement que le hTNFR-Is/mIgG1 produit *in vitro*. Notons que le hTNFR-Is recombinant est utilisé en tant que contrôle positif de l'expérience, mais son efficacité inhibitrice ne peut être directement comparée aux protéines chimériques. En effet, la concentration massique des récepteurs chimériques TNFR-Is/mIgG1 dosée par ELISA est exprimée en équivalent de monomère TNFR-Is recombinant. Or, les récepteurs chimériques possèdent 2 récepteurs, l'ELISA surestime donc de 2 fois le signal de la protéine transgénique par rapport au récepteur soluble naturel. De plus, il faut prendre en compte la masse provenant du fragment constant d'IgG1 fusionné à ces 2 récepteurs solubles. Pour résonner en molarité de récepteur on a donc le facteur de correction suivant :  $[(\text{masse du TNFR-Is/mIgG1}) / (\text{masse du TNFR-Is})] \times 2 = (100 \text{ kDa} / 25 \text{ kDa}) \times 2 = 8$ . La quantité de récepteur dosé par ELISA dans la protéine transgénique est donc surestimée d'environ 8 fois par rapport au monomère de récepteur soluble. Une fois ce facteur de correction appliqué on se rend compte comme attendu que l'activité du hTNFR-Is/mIgG1 est comparable à celle du récepteur monomérique recombinant (non montré).

### b) Électrotransfert du plasmide codant le mTNFR-Is/mIgG1

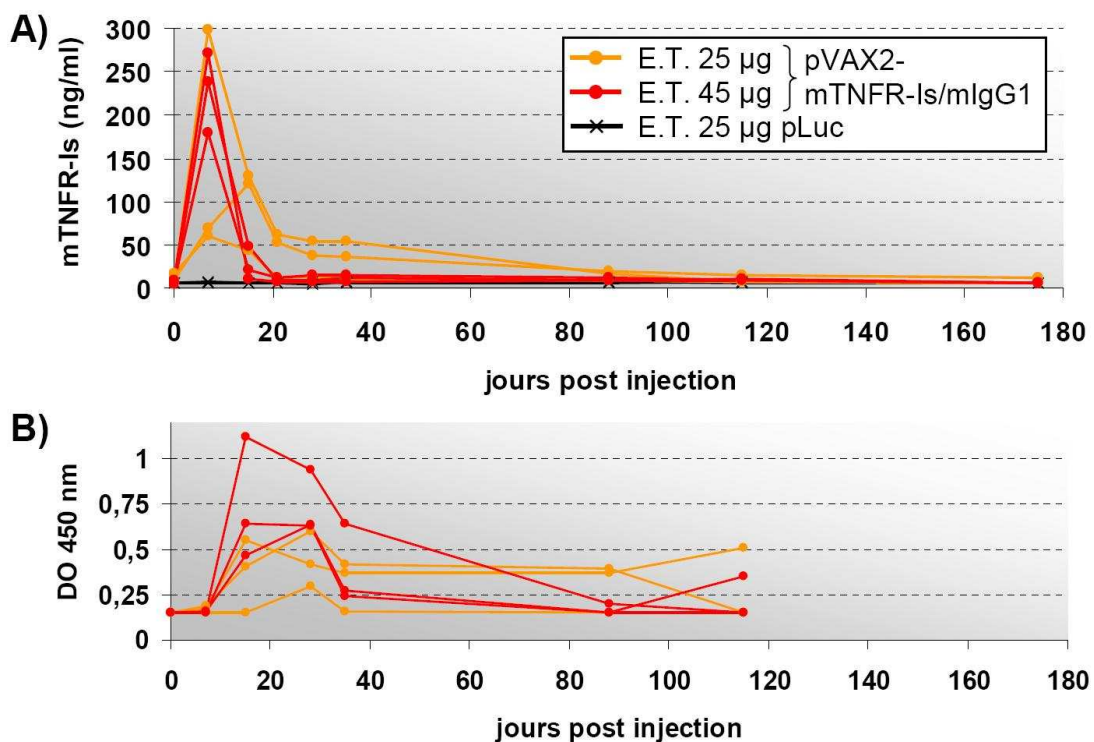
La protéine transgénique mTNFR-Is/mIgG1 produite *in vitro* étant fonctionnelle, nous sommes passés à l'évaluation de la transfection du pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 *in vivo* chez la souris B10 (**fig. 78** ci-après).



**Figure 78 – Sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1 et anticorps anti mTNFR-Is chez les souris C57BL10 électrotransférées avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.**

3 souris C57BL10 ♀ âgées de 12 semaines sont injectées avec 25 µg de plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 (25 µl dans le TAG), ou avec du PBS. **A)** Dosage par ELISA du mTNFR-Is plasmatique sur les prélèvements sanguins effectués chaque semaine. **B)** Analyse semi-quantitative par ELISA des IgG plasmatiques anti mTNFR-Is (dilution 1/90<sup>ème</sup>).

Étant donné que nous suivons la sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1 avec un anticorps anti-mTNFR-Is, il ne nous est pas possible de distinguer la protéine transgénique du récepteur soluble endogène. Le récepteur endogène a donc été dosé chez une souris contrôle électrotransférée avec du PBS (souris 4) (**fig. 78A**). Le niveau endogène de récepteur est en moyenne 3,6 ng/ml chez la souris 4, et il reste stable dans les jours suivant l'électrotransfert, ce qui indique que l'inflammation induite par la procédure ne fait pas varier le mTNFR-Is endogène et n'est pas responsable du pic de sécrétion observé chez les souris 1 à 3. On observe donc dans la **figure 78A** que les muscles électrotransférés avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 sécrètent un niveau important de protéines transgéniques durant les premières semaines suivant l'injection, puis la sécrétion baisse et reste stable au moins 4 mois. On constate également dans la **figure 78B** que cette sécrétion s'accompagne d'une réponse anticorps contre la protéine transgénique (IgG), sans pour autant que l'on observe une disparition de la protéine dans le sang comme dans le cas du **h**TNFR-Is/mIgG1. Ceci suggère l'absence d'une réponse immune cellulaire contre les fibres musculaires transfectées.



**Figure 79 – Sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1 et anticorps anti mTNFR-Is chez les souris *mdx* électrotransférées avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.**

Des souris *mdx* ♀ âgées de 13 semaines sont injectées dans le TAG (35 µl) avec 25 ou 45 µg de plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 (n=3) ou 25 µg de plasmide non relevant pLuc (n=2). **A)** Dosage par ELISA du mTNFR-Is plasmatique sur les prélèvements sanguins effectués chaque semaine. **B)** Analyse semi-quantitative par ELISA des IgG plasmatiques anti mTNFR-Is (dilution 1/810<sup>ème</sup>).

L'électrotransfert du plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 a ensuite été effectué chez la souris *mdx*. La sécrétion de mTNFR-Is a été suivie jusqu'à 6 mois après l'électrotransfert (**fig. 79A**).

La dose de 25 µg montre un profil de sécrétion similaire aux B10 durant le premier mois : on observe un pic de sécrétion suivi d'une stabilisation chez 2 souris sur 3 injectées (courbes orange **fig. 79A**). Au-delà de J35 la concentration plasmatique de mTNFR-Is décroît jusqu'à rejoindre un niveau proche de la concentration endogène de récepteur soluble 4 mois après l'électrotransfert. La chute progressive de la sécrétion observée chez la souris *mdx* peut être expliquée par la disparition des fibres musculaires transfectées due aux cycles de nécrose et de régénération successifs du muscle dystrophique. Notons qu'en plus de ce phénomène il est – de manière générale – normal d'observer une baisse de la sécrétion à long terme du fait de la dégradation ou de l'inactivation du plasmide épisomal, ou encore du fait de la prise de masse des souris dont le volume sanguin augmente.

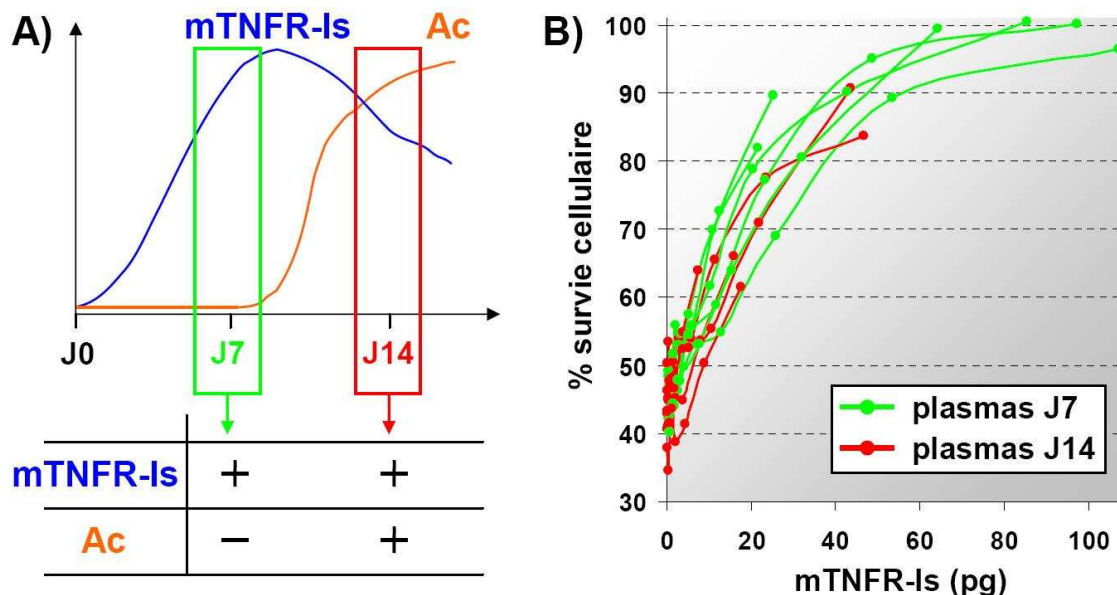
Une deuxième dose de 45 µg de plasmide a été électrotransférée chez des souris *mdx*. Dans ce cas on observe aussi un pic de sécrétion mais l'expression est perdue dès J21 (courbes rouges **fig. 79A**) ; ce phénomène beaucoup plus rapide correspondrait plutôt à une réponse immune cellulaire cytotoxique.

Comme nous avons observé une réponse anticorps chez les souris saines nous avons également évalué les anticorps contre le mTNFR-Is chez la souris *mdx* lors de cette expérience (**fig. 79B**). On trouve aussi une réponse anticorps chez la souris *mdx* dont l'intensité suit exactement l'expression de la protéine transgénique avec 1 semaine de décalage. La réponse humorale semble tout de même plus forte durant le premier mois chez les souris électrotransférées avec 45 µg de plasmide.

L'électrotransfert de 25 µg de pVAX2-**m**TNFR-Is/mIgG1 dans le TAG permet donc une sécrétion stable au moins jusqu'à J35, contrairement à l'expression transitoire ne dépassant pas J7 dans le cas de l'électrotransfert de la même quantité de pVAX2-**h**TNFR-Is/mIgG1. Les deux protéines transgéniques possèdent des épitopes antigéniques au moins au niveau du site de fusion du récepteur I soluble du TNF et du fragment constant d'IgG. Les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde traités de manière chronique avec une protéine recombinante chimérique analogue à notre protéine transgénique mais basée sur le récepteur II du TNF (Etanercept) produisent dans 6 % des cas une réponse anticorps non neutralisante contre le traitement. La réponse humorale que nous observons chez la souris sécrétant le TNFR-Is/mIgG1 n'est donc pas inattendue. En revanche, il semble que le récepteur I du TNF d'origine humaine est très immunogène chez la souris malgré une identité de la séquence en acides aminés de 70 % avec le récepteur soluble murin, et cela semble provoquer une réponse immune à médiation cellulaire en plus de la réponse humorale. De même, il semble qu'une réponse cellulaire puisse se développer contre les cellules transfectées exprimant le mTNFR-Is/mIgG1 quand des quantités supérieures de plasmide sont utilisées. Il s'agit alors bien d'une amplification de la réponse immunitaire qui est dûe au vecteur sans relation avec la quantité d'antigène. En effet, une des 3 souris injectées avec 25 µg présente une expression stable après un fort pic de sécrétion dépassant ceux observés chez les souris injectées avec 45 µg de plasmide.

c) **Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit *in vivo* et analyse histologique du muscle transfecté**

L'activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 sécrété par le muscle dystrophique transfecté a ensuite été évaluée sur les cellules L929 en utilisant les plasmas collectés dans l'expérience d'électrotransfert des souris *mdx*.



**Figure 80 – Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 plasmatique.**

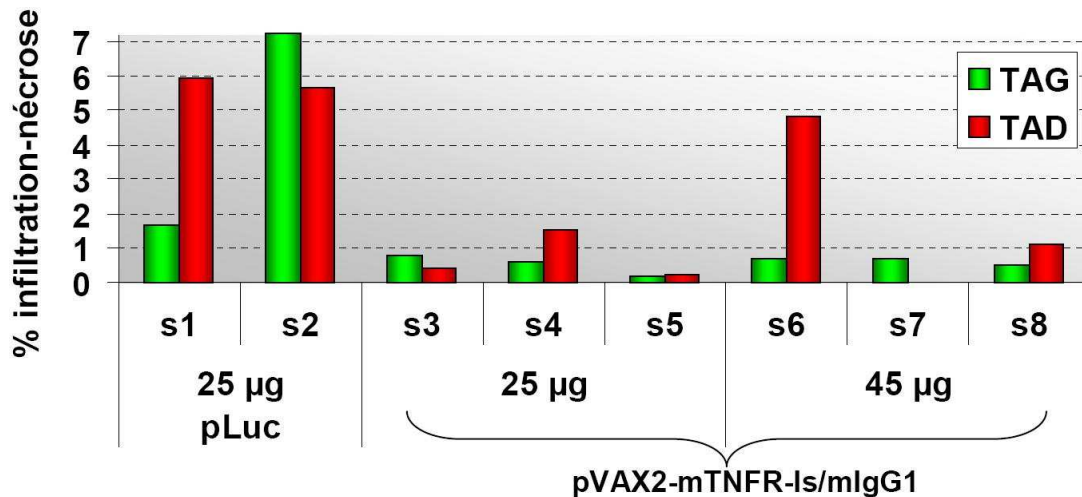
L'activité inhibitrice de la protéine transgénique mTNFR-Is/mIgG1 sécrétée dans le sang des souris électrotransférées a été testée *in vitro* sur la lignée L929 (expérience de la **figure 79**). **A)** Schéma reprenant les caractéristiques des prélèvements sanguins à J7 et J14 du dosage ELISA de la **figure 79**. **B)** Évaluation de l'activité biologique de la protéine mTNFR-Is/mIgG1 présente dans les plasmas prélevés à J7 et J14. Une dilution sériée des plasmas est incubée en présence d'une quantité fixe toxique de TNF sur les cellules L929. Les courbes présentées correspondent à la mesure de la survie cellulaire rapportée à la quantité de mTNFR-Is dosée dans chacun des plasmas. Chaque courbe correspond au plasma d'une souris prélevée à un temps donné. Les courbes vertes correspondent aux plasmas des 6 souris électrotransférées prélevées à J7, et les courbes rouges correspondent aux plasmas des ces mêmes souris prélevées à J14.

Nous disposons de plasmas contenant la protéine transgénique avec ou sans anticorps anti-mTNFR-Is (IgG) comme cela est résumé dans le schéma de la **figure 80A**. Nous avons donc pu évaluer le potentiel neutralisant des IgG produites contre la protéine transgénique. La **figure 80B** montre que le récepteur soluble mTNFR-Is présent dans les échantillons sans anticorps à J7 est capable d'inhiber 16 à 100 % de la toxicité induite par le TNF dans le test biologique (courbes vertes). Cette expérience a été reproduite avec les plasmas prélevés à J7 et J14 des deux souris contrôle transfectées avec un plasmide non relevant, et il a été constaté que le récepteur endogène inhibe 8 % de la toxicité dans les mêmes conditions (résultat non montré). Ainsi la protéine transgénique est bien responsable de la majorité de l'effet anti-TNF constaté dans la **figure 80B**. Enfin, les courbes d'inhibition du TNF des plasmas prélevés à J7 sont superposées aux courbes J14, ce qui indique que les anticorps présents dans

les échantillons à J14 ne neutralisent pas l'activité biologique de la protéine chimérique mTNFR-Is/mIgG1. Cette expérience montre que le muscle dystrophique produit une protéine transgénique parfaitement fonctionnelle capable d'inhiber tout ou partie de la toxicité induite dans le test biologique avec une quantité de mTNFR-Is/mIgG1 de l'ordre de quelques dizaines de pg. Ce qui est du même ordre de grandeur que l'activité du hTNFR-Is/mIgG1 dans la *figure 77* ; l'efficacité moindre que nous avons obtenue avec le mTNFR-Is/mIgG1 dans la *figure 77* pourrait donc être conséquente à un stress cellulaire au moment de la production de la protéine *in vitro* dans les cellules MRC5-V2 transfectées.

Les muscles injectés (TAG) et controlatéraux (TAD) ont été prélevés 6 mois après l'électrotransfert du pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 afin de mettre au point l'immunomarquage de la protéine transgénique, mais également pour évaluer l'état histologique des muscles.

La *figure 81* présente une analyse morphométrique de l'aire de nécrose et d'infiltration dans ces muscles.



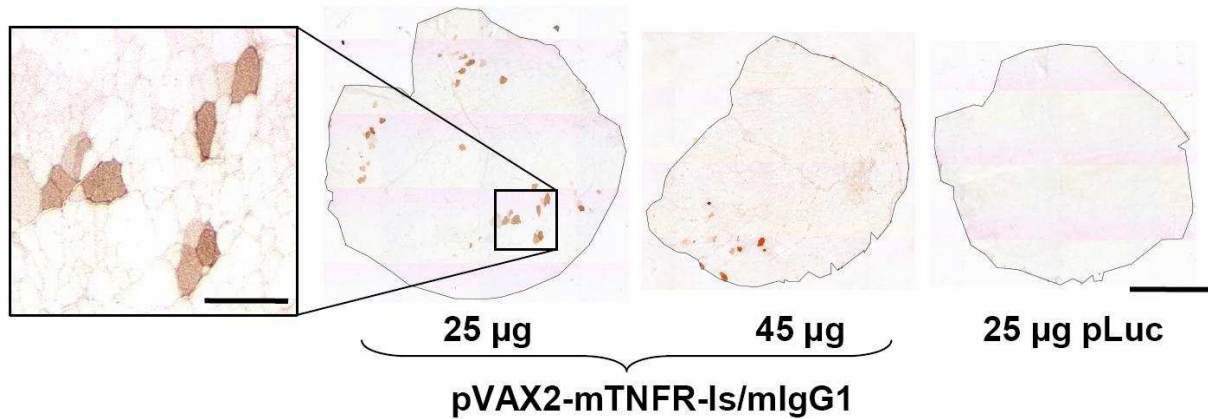
**Figure 81 – Infiltration inflammatoire et nécrose dans le muscle tibial antérieur des souris *mdx* électrotransférées avec pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.**

L'aire de nécrose et d'infiltration inflammatoire a été mesurée relativement à la surface totale pour chaque TA sur une coupe transversale de TA colorées par HPS en utilisant le logiciel ImageJ. Les 8 souris du protocole sont analysées : 2 souris contrôle électrotransférées avec pLuc, et 2 groupes de 3 souris électrotransférées avec 25 ou 45 µg de pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.

On constate que l'aire de nécrose et d'infiltration inflammatoire est de l'ordre de 5 % chez les deux souris *mdx* contrôle (agées de plus de 9 mois au prélèvement). De plus cet indice est assez variable dans le TA entre le muscle TAG et le controlatéral TAD. Comparés aux contrôles, les TAG des souris traitées avec 25 µg ou 45 µg de plasmide semblent relativement épargnés. Au niveau des TAD (effet distant du mTNFR-Is/mIgG1 sécrété) on constate que le pourcentage d'infiltration et de nécrose est bas aux deux doses de plasmide. Notons que le TAD de la souris 7 ne présente pas de nécrose ni d'infiltration, et que cette souris possède le niveau plasmatique de protéine transgénique le plus haut parmi les 3 souris injectées avec 45 µg. Même si ces tendances sont encourageantes, il est impossible de conclure à un effet

thérapeutique du mTNFR-Is/mIgG1 sur les muscles des souris de ce protocole test dans la mesure où il y a seulement deux souris contrôle.

Afin de suivre et d'évaluer la transfection *in situ* de la protéine chimérique mTNFR-Is/mIgG1 nous avons procédé à un immunomarquage du mTNFR-Is.



**Figure 82 – Expression du mTNFR-Is dans le muscle dystrophique électrotransféré par pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.**

Immunomarquage du mTNFR-Is sur les coupes histologiques de TAG des souris *mdx* du protocole d'électrotransfert du pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1. Une souris contrôle électrotransférée avec le plasmide non relevant pLuc est présentée à gauche. Les meilleurs marquages obtenus chez les groupes électrotransférés avec 25 et 45 µg de pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 sont présentés. Le contour du muscle est tracé en noir pour délimiter la coupe transversale complète du TAG. Barre d'échelle : 1 mm pour les coupes transversales complètes et 200 µm pour la zone agrandie.

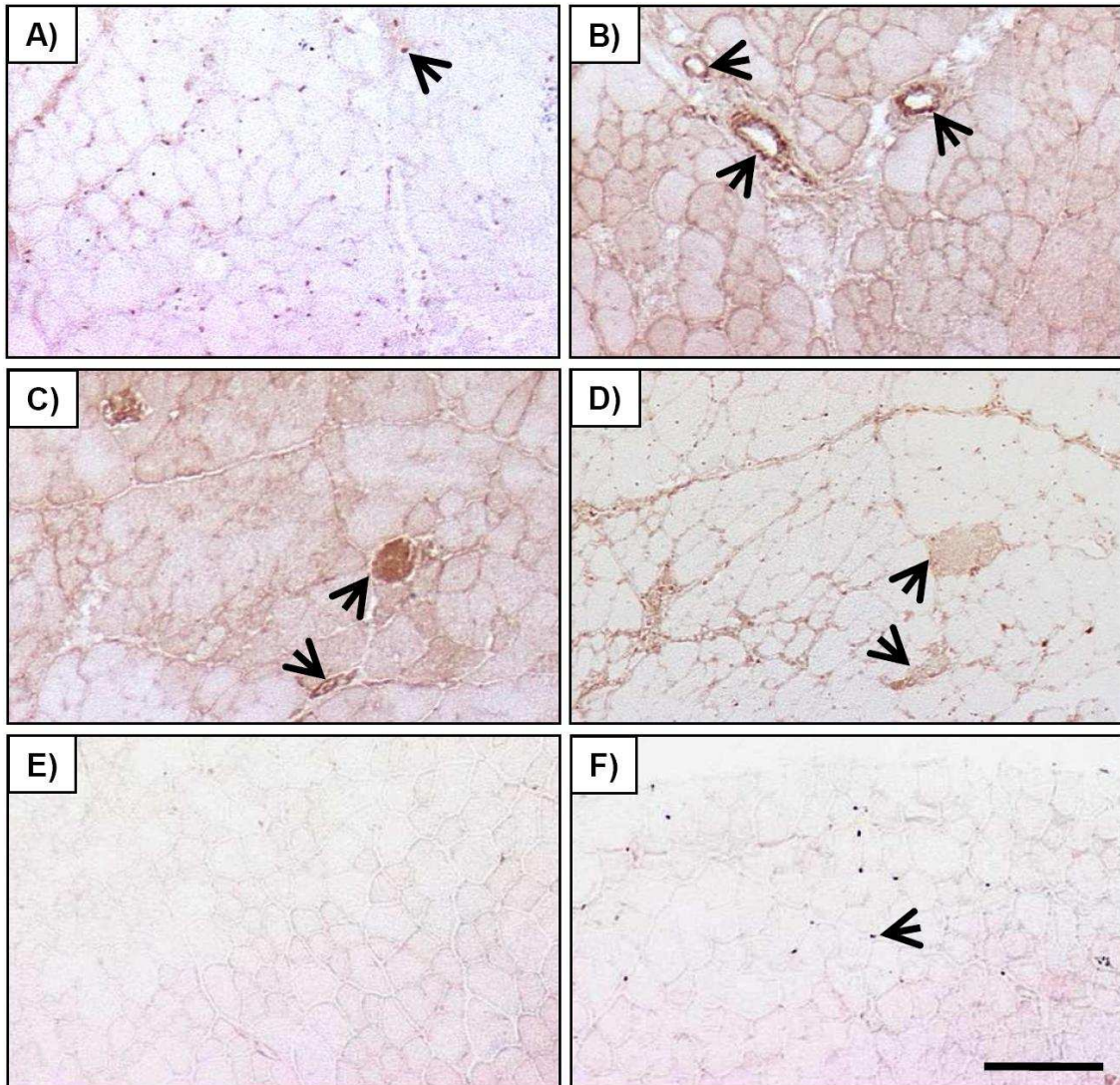
Les souris contrôle électrotransférées avec le plasmide pLuc ne présentent pas de marquage visible du récepteur I murin du TNF (mTNFR-Is) à cette échelle (*figure 82*). Dans le cas des souris électrotransférées avec pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 on observe un marquage cytoplasmique et membranaire des fibres musculaires transfectées (voir zone agrandie à gauche de la *fig. 82*). Les photographies de coupes transversales complètes présentées correspondent aux TAG présentant la meilleure expression du transgène dans chaque groupe. En effet, aucune fibre musculaire transfectée n'est visible dans certains TAG, comme cela est attendu puisque nous avons observé lors du dosage ELISA que la concentration plasmatique de mTNFR-Is tend vers le niveau endogène 6 mois après l'électrotransfert. Nous observons donc ici les fibres transfectées n'ayant pas encore été détruites lors des processus de nécrose et régénération du muscle dystrophique.



**d) Expression du TNF et du TNFR-Is chez la souris *mdx***

- Expression endogène du TNF et de son récepteur I dans le muscle :

Les immunomarquages du TNF et du récepteur endogène ont également été réalisés sur les coupes des muscles controlatéraux (TAD) non injectés des souris contrôle électrotransférées avec pLuc.



**Figure 83 – Expression endogène du TNF et du récepteur I dans le muscle dystrophique.**

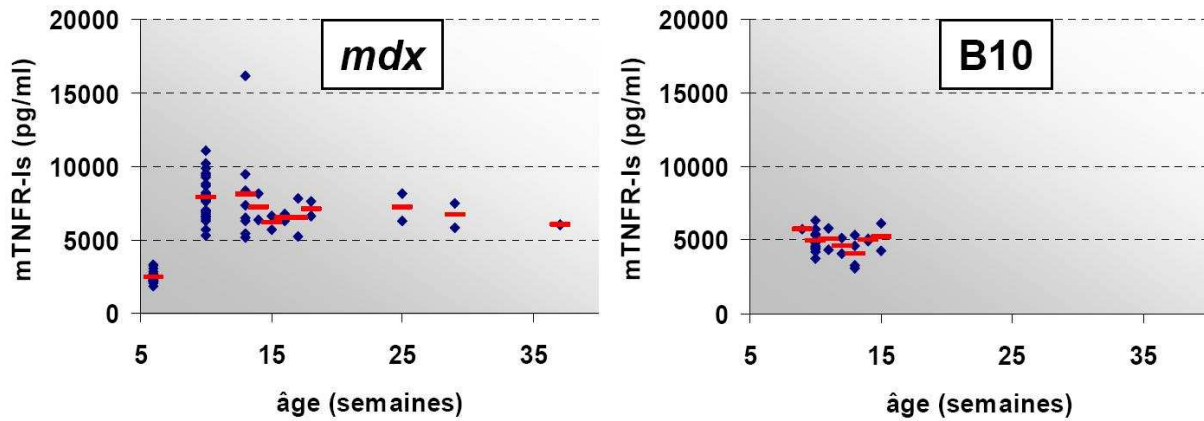
Immunomarquage du TNF murin (mTNF) et du récepteur I du TNF (mTNFR-Is) dans le muscle TAD non injecté des souris *mdx* contrôle âgées de 9 mois du protocole d'électrotransfert. **A)**, **B)** et **C)** Immunomarquage du TNF murin. **D)** Immunomarquage utilisant un anticorps primaire non relevant sur une coupe distante de 8  $\mu\text{m}$  de la coupe **C)**. **E)** et **F)** Immunomarquage du récepteur I du TNF dans le TAD d'une souris saine B10 et d'une souris *mdx*, respectivement. Les flèches pointent des cellules marquées. Barre d'échelle : 200  $\mu\text{m}$ .

La **figure 83** montre que le TNF est exprimé dans le muscle de la souris *mdx* par une population de petites cellules mononuclées infiltrantes (**fig. 83A**), au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux (**fig. 83B**), ou encore par des fibres musculaires nécrotiques. Afin de vérifier la spécificité des marquages réalisés, nous avons réalisé un immunomarquage d'une coupe distante de 8  $\mu\text{m}$  en utilisant un anticorps primaire non relevant (de même isotype et produit chez la même espèce). Il apparaît dans la **figure 83D** que les immunoglobulines de chèvre utilisées ont tendance à marquer de manière non spécifique les fibres nécrotiques. Nous avons également observé un marquage cytoplasmique du TNF dans des groupes de fibres de petit calibre en régénération chez la souris *mdx* (non montré). Ce profil d'expression du TNF chez *mdx* est en accord avec la littérature qui rapporte notamment une corrélation entre l'expression du TNF et la régénération [423, 424].

Le marquage du mTNFR-I dans le muscle de la souris *mdx* a uniquement été trouvé dans de petites cellules mononuclées infiltrantes (**fig. 83F**), aucun marquage n'étant visible dans un muscle sain de souris B10 (**fig. 83E**). Cette observation est en accord avec le cas de myopathies inflammatoires où le marquage du TNFR-I est trouvé au niveau des cellules mononuclées infiltrantes [233]. Kuru et coll. montrent également un marquage du récepteur I du TNF au niveau de cellules mononuclées, ainsi que dans de rares fibres musculaires chez les patients atteints de DMD. Il semble en effet que le récepteur produit par les fibres musculaires soit essentiellement clivé et soluble [423].

- Expression endogène du TNF et de son récepteur I dans le sang :

Nous avons également dosé les niveaux de TNF murin (mTNF) et du récepteur endogène (mTNFR-Is) chez des souris *mdx* et B10 adultes. La cytokine TNF n'a pas pu être quantifiée chez la souris B10 ou *mdx* car elle circule à un niveau inférieur au seuil de détection par ELISA. Cela est parfaitement normal dans une souris saine chez qui l'expression de cette cytokine est généralement absente. En dehors d'une maladie chronique la production de cette cytokine est transitoire, et elle est dosable par ELISA uniquement peu de temps après une inflammation marquée induite expérimentalement par l'injection d'une endotoxine par exemple [304]. De plus, il a été montré récemment que certaines cytokines comprenant le TNF sont complexées *in vivo* chez l'individu sain à des auto-anticorps produits de manière ubiquitaire chez l'homme, ce qui empêche leur quantification par ELISA [316]. Cette situation pourrait également exister chez la souris saine. Quoi qu'il en soit le niveau de TNF libre circulant chez la souris *mdx* est en dessous du seuil de détection par ELISA, au contraire de la situation chez l'homme où il a été montré une concentration supérieure de cette cytokine chez les malades DMD [425].



**Figure 84 – Niveau endogène du récepteur I du TNF chez les souris *mdx* et B10 adultes.**

Dosage ELISA du mTNFR-Is plasmatique chez les souris *mdx* et B10 en fonction de l'âge. Chaque losange bleu correspond à une souris ; un trait rouge correspond à la moyenne.

L'analyse rétrospective de tous les dosages du mTNFR-Is effectués sur les prélèvements sanguins des souris contrôle de nos protocoles est présentée dans la **figure 84** (prélèvements à J0 avant injection de vecteur). Au contraire du TNF le niveau de récepteur I du TNF est dosable par ELISA chez les souris non traitées. Le niveau de récepteur soluble est de  $2480 \pm 371$  pg/ml chez la souris *mdx* de 6 semaines, puis on observe une augmentation significative jusqu'à  $7850 \pm 1413$  pg/ml à l'âge de 10 semaines ( $p < 0,0001$ ). Par la suite, le niveau reste assez stable aux alentours de 7000 pg/ml jusqu'à l'âge de 6 mois. Nous n'avons pas effectué de protocole utilisant des souris B10 de 6 semaines, cependant nous constatons que le niveau de mTNFR-Is est également relativement stable chez les souris B10 âgées de 10 à 15 semaines. En revanche, le niveau endogène de récepteur est plus bas chez les souris B10. En effet, le niveau de mTNFR-Is est significativement plus élevé à 10 semaines chez la souris *mdx* avec  $7850 \pm 1413$  pg/ml ( $n=27$ ), contre  $4948 \pm 749$  pg/ml ( $n=13$ ) chez la souris B10 ( $p < 0,0001$ ).

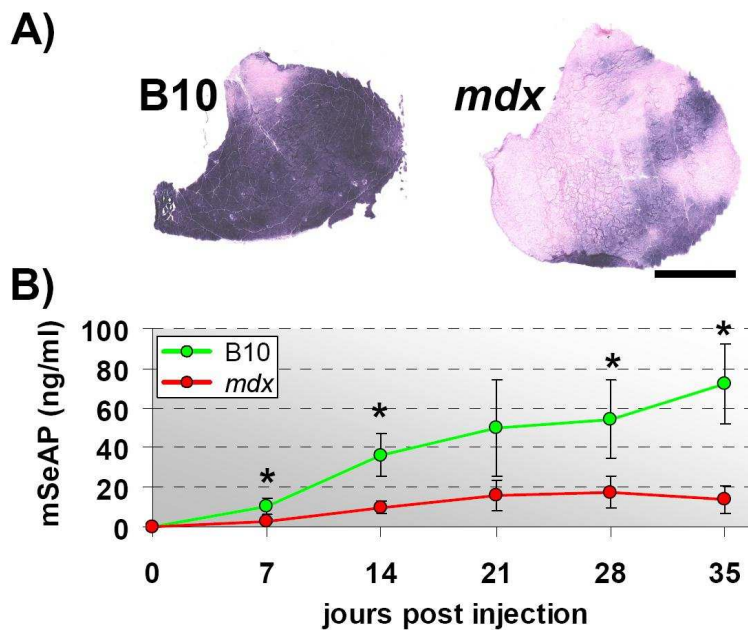
Il a été constaté une augmentation du niveau de TNFR-Is sanguin dans la polyarthrite rhumatoïde [409], ou encore dans des myopathies inflammatoires [426]. Dans ces maladies le niveau de récepteur soluble produit est insuffisant pour neutraliser toute l'activité délétère du TNF, et le niveau de TNFR-Is est corrélé à l'atteinte clinique. Nous postulons dans le cas de la souris *mdx* que le récepteur soluble I du TNF est également libéré du muscle dystrophique de manière compensatoire au fil de la progression de la maladie, ce qui explique le niveau plasmatique élevé comparé au niveau basal de la souris saine B10. Le constat de l'augmentation du mTNFR-Is plasmatique entre 5 et 10 semaines chez la souris *mdx* pourrait ainsi être lié à la progression puis à la stabilisation du niveau de nécrose musculaire durant cette période.

### 1.4. Cinétique de sécrétion et réponse immune contre les TNFR-Is/mIgG1 lors d'une injection d'AAV dans le muscle dystrophique

Nous avons vu que l'électrotransfert permet d'obtenir une sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 de l'ordre de 50 ng/ml après le pic d'expression, mais nous ne pouvons pas dépasser la dose de 25 µg de plasmide sans générer une réponse immune conduisant à la disparition de l'expression. Comme nous l'avons vu avec le cas du hTNFR-Is/mIgG1, le vecteur AAV est plus tolérogène dans le muscle. L'AAV permet également d'obtenir une expression plus importante dans le muscle comparé à une vectorisation non virale. Nous avons donc produit un vecteur AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 (en utilisant le pGG2-mTNFR-Is/mIgG1 construit plus tôt). L'expression et la réponse immune contre la protéine chimérique entièrement murine (mTNFR-Is/mIgG1) ont été évaluées lors d'une unique injection en IM de ce vecteur chez la souris *mdx*. Nous avons également comparé l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 au lot de vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 de même sérotype produit plus tôt. Enfin, nous avons analysé en détail la réponse immune contre la protéine immunogénique hTNFR-Is/mIgG1 sécrétée dans le contexte du muscle dystrophique suite à l'administration de l'AAV6.

#### a) Expression d'un transgène sécrété non immunogène

Avant de comparer la transduction et l'immunogénicité des AAV6-h- et -m-TNFR-Is/mIgG1 nous avons transduit le TAG de souris B10 ou *mdx* dans les mêmes conditions avec  $2.10^9$  vg d'AAV6-mSeAP.



**Figure 85 – Transduction du muscle dystrophique par l'AAV6-mSeAP.**

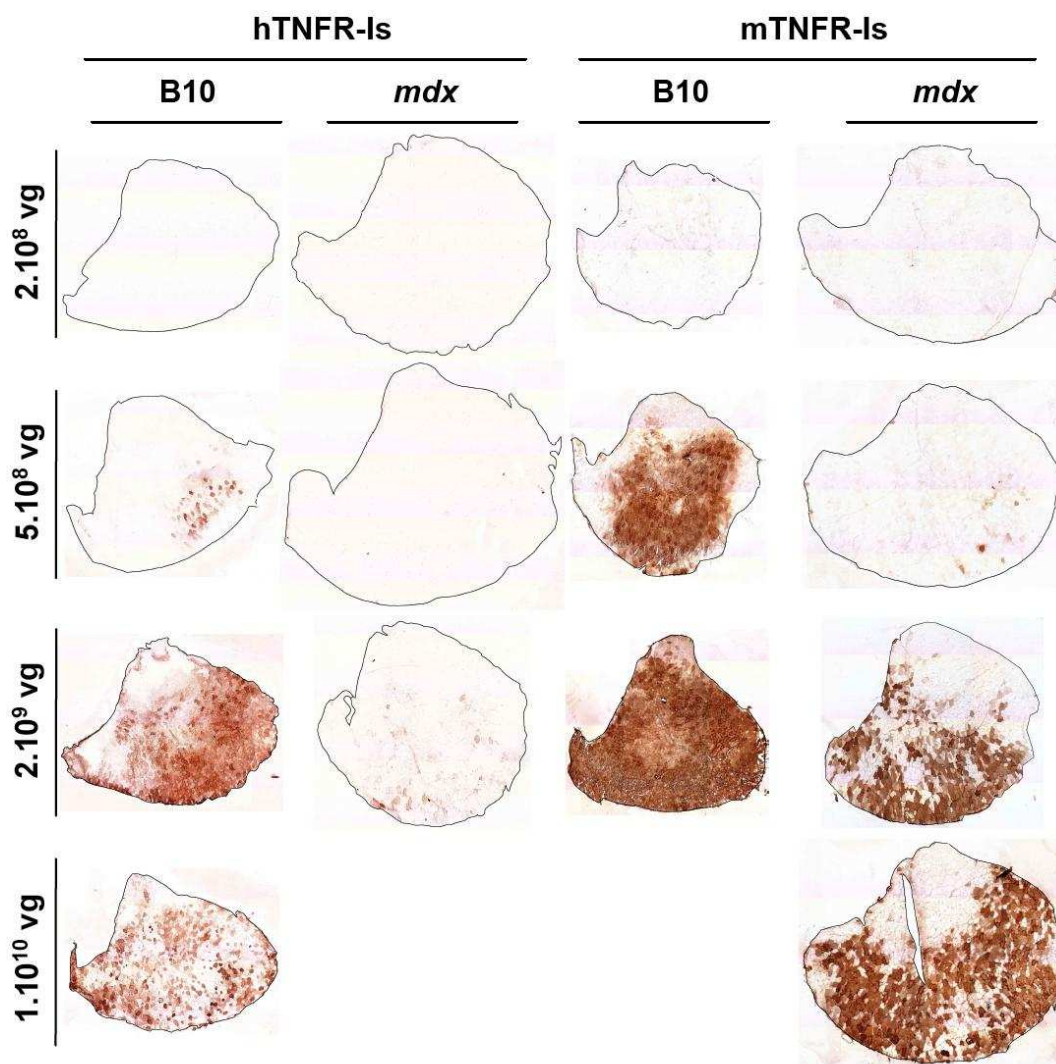
A) Marquage histochimique de la mSeAP dans le TAG de souris B10 et *mdx* âgées de 8 à 12 semaines et injectées avec  $2.10^9$  vg d'AAV6-mSeAP; les muscles sont prélevés 35 jours après l'injection. Une photographie représentative du groupe de souris *mdx* et B10 est présentée (n=4). Barre d'échelle : 1 mm. Les fibres positives sont violettes. B) Cinétique de sécrétion de la mSeAP mesurée chaque semaine après l'injection d'AAV6-mSeAP. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type, la courbe verte correspond aux B10 (n=4), et la courbe rouge aux *mdx* (n=4). Les astérisques (\*) indiquent une différence significative ( $p < 0,05$ ) de la concentration moyenne de mSeAP entre le groupe de B10 et le groupe de *mdx*.

La *figure 85A* montre que plus de 70 % du muscle B10 injecté exprime le transgène mSeAP. Dans le cas du muscle *mdx* la transduction est inférieure pour une même dose d'AAV6

injectée. Cette différence d'efficacité de transduction se retrouve au niveau sanguin : la sécrétion de mSeAP est significativement plus élevée dès J7 chez la souris saine B10 (*fig. 85B*). Notons que la sécrétion augmente toujours chez la souris B10 à J35, alors qu'elle se stabilise chez la souris *mdx*. Ce profil de sécrétion du transgène non immunogène mSeAP servira de base de comparaison pour nos prochaines expériences utilisant l'AAV6-TNFR-Is/mIgG1.

**b) Expression des transgènes TNFR-Is/mIgG1 dans le muscle**

Par la suite nous avons injecté des doses croissantes d'AAV6 codant la protéine chimérique TNFR-Is/mIgG1 humaine ou murine dans le TAG de souris B10 ou *mdx*.



**Figure 86 – Expression des TNFR-Is/mIgG1 dans le muscle sain et dystrophique.**

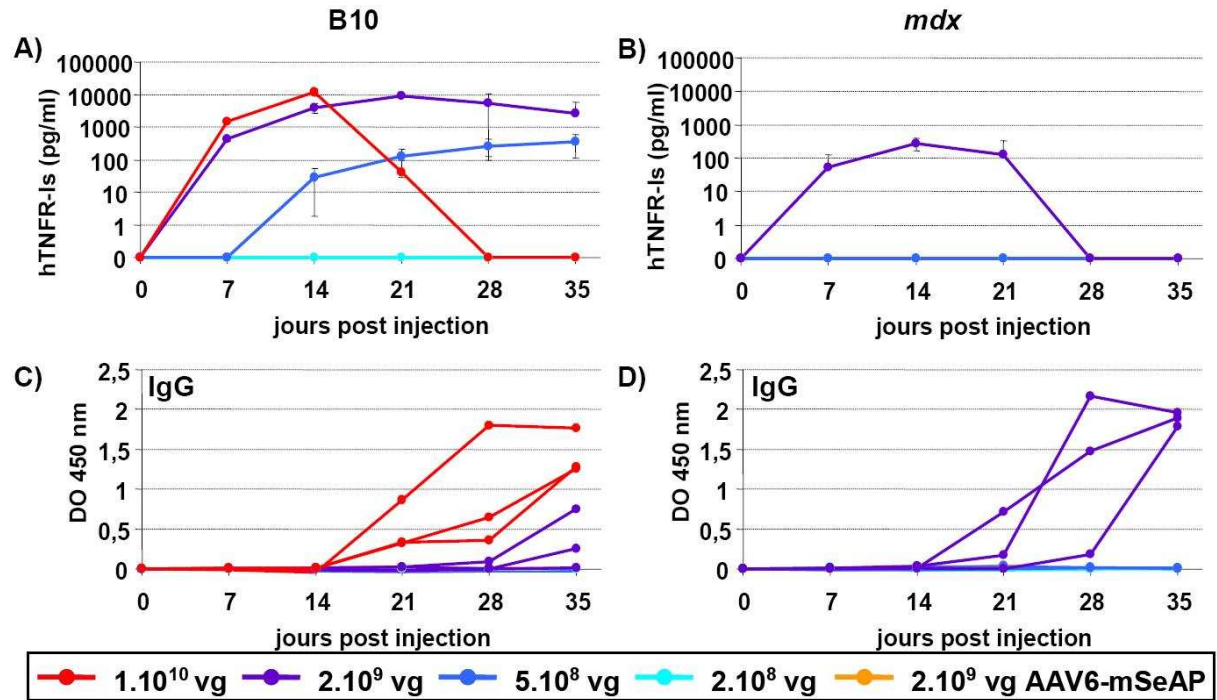
Trois doses de vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 ou d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 ont été injectées dans le TAG de souris B10 ou *mdx* âgées de 8 à 12 semaines (n=3) :  $2.10^8$  vg,  $5.10^8$  vg et  $2.10^9$  vg. Deux groupes supplémentaires ont été injectés avec  $1.10^{10}$  vg : AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 chez les B10 et l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 chez les *mdx* (n=3). L'expression est révélée sur les TAG prélevés à J35 par immunomarquage du hTNFR-I ou du mTNFR-I. Le contour des muscles est tracé en noir pour délimiter la coupe transversale complète du TAG. Barre d'échelle : 1 mm.

La **figure 86** présente les profils d'expression obtenus dans le TAG injecté. On constate au passage une caractéristique des muscles squelettiques de la souris *mdx* : ils sont hypertrophiés comparé à ceux de souris B10 de même âge. Les immunomarquages de la **figure 86** montrent que l'expression du hTNFR-Is dépend de la souche de souris et de la dose injectée. En effet, aucune expression n'est visible chez les souris B10 ou *mdx* dans le muscle injecté avec la dose de  $2.10^8$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1. A la dose de  $5.10^8$  vg quelques fibres musculaires positives apparaissent chez la souris B10, ce qui n'est pas le cas chez la souris *mdx*. Le meilleur profil d'expression est obtenu chez les souris B10 à la dose de  $2.10^9$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1. Étonnamment l'expression est plus faible chez les souris B10 injectées avec la dose supérieure de  $1.10^{10}$  vg, avec des fibres positives éparées sur la coupe transversale. Chez les souris *mdx* l'expression de hTNFR-Is est uniquement visible à la dose de  $2.10^9$  vg avec seulement quelques fibres musculaires faiblement marquées. La comparaison de l'expression obtenue à la dose de  $2.10^9$  vg entre le vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 et le vecteur AAV6-mSeAP indique bien une réponse immune contre la protéine transgénique chimerique humaine.

Comme pour le vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1, aucune expression du mTNFR-Is n'est visible dans les muscles B10 et *mdx* injectés avec la plus faible dose ( $2.10^8$  vg). A la dose de  $5.10^8$  vg on observe une expression homogène sur plus de la moitié de la surface du TAG des souris B10, alors que seules quelques fibres sont positives chez les souris *mdx*. Notons également que la différence d'expression est énorme entre les doses pourtant proches de  $2.10^8$  et  $5.10^8$  vg d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 dans le muscle B10, ce qui suggère l'existence d'une dose minimale de vecteur AAV6 nécessaire pour passer le périmysium et la lame basale jusqu'aux fibres musculaires. A la dose de  $2.10^9$  vg la quasi-totalité du muscle B10 est transduite, ce qui est comparable au profil d'expression de la mSeAP non immunogène, cependant la transduction du muscle *mdx* reste moins forte. Dans le cas du muscle *mdx* nous avons également injecté une dose supérieure de  $1.10^{10}$  vg d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 et nous observons – comme à la dose de  $2.10^9$  vg – un profil d'expression en « mosaïque » avec plus de fibres positives et un marquage plus intense. Notons enfin que la coloration topographique HPS de coupes histologiques sériées du muscle *mdx* injecté par  $2.10^9$  vg d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 montre que les fibres transduites peuvent être centronuclées ou non ; cependant on observe que l'aspect en mosaïque provient en grande partie d'une absence de transduction des paquets de fibres centronuclées de petit calibre signant une régénération récente (non montré). Si l'on prend en compte l'ensemble de ces données on peut conclure que la différence d'expression du transgène visible entre un muscle dystrophique et un muscle sain est dûe à la perte des fibres transduites avec les cycles de nécrose et de régénération. De plus, il semble que l'immunogénicité du transgène hTNFR-Is/mIgG1 induise une perte de fibres transduites supplémentaires probablement lors d'une réponse cellulaire cytotoxique.

c) Cinétique de sécrétion des transgènes TNFR-Is/mIgG1 par le muscle

Suite à l'analyse de l'expression *in situ*, nous avons quantifié par ELISA la sécrétion de transgène dans le sang des souris B10 et *mdx*, ainsi que l'éventuelle réponse anticorps contre la protéine transgénique. Les plasmas collectés chez les souris injectées avec l'AAV6-mSeAP ont été utilisés comme contrôle.



Le graphique A de la **figure 87** montre que la sécrétion de hTNFR-Is/mIgG1 est inexistante à la dose faible de  $2.10^8$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris B10, ainsi que chez les souris contrôle injectées avec l'AAV6-mSeAP. A la dose de  $5.10^8$  vg on observe une sécrétion croissante atteignant en moyenne 346 pg/ml à J35 sans réponse anticorps. On retrouve comme vu précédemment (**fig. 75** p137) que la dose de  $2.10^9$  vg permet une sécrétion plus importante dosable dès J7 qui atteint un maximum de 9344 pg/ml en moyenne à J21, puis la concentration décroît parallèlement à l'apparition d'une réponse anticorps tardive chez 2 des 3 souris injectées à cette dose. Enfin, la plus grosse dose injectée ( $1.10^{10}$

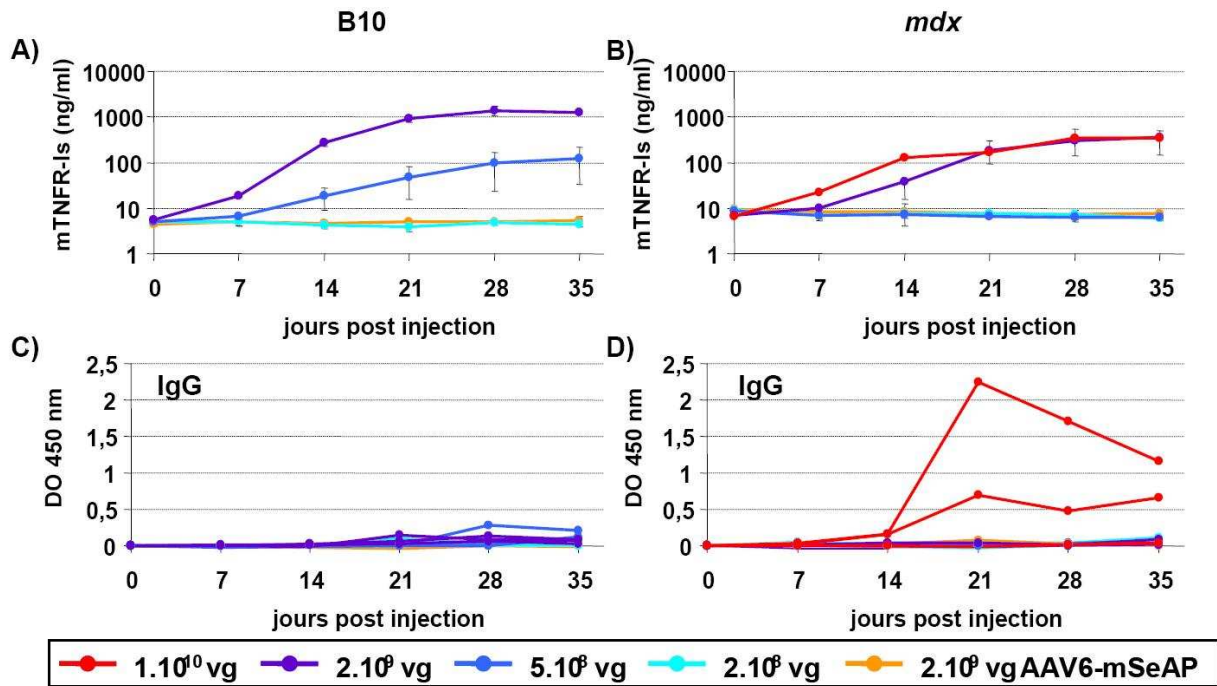
vg) conduit à une forte sécrétion transitoire disparaissant progressivement entre J14 et J28 de manière corrélée à l'apparition d'une réponse anticorps marquée contre la protéine transgénique.

Chez la souris *mdx* seule la dose de  $2.10^9$  vg permet d'obtenir la sécrétion du transgène hTNFR-Is/mIgG1. Mais cette sécrétion est transitoire et le maximum atteint reste 30 fois inférieur au maximum obtenu à la même dose chez les souris B10. De plus, la réponse anticorps est plus forte puisqu'elle a une intensité comparable à ce qui est obtenu avec une dose de vecteur 5 fois plus élevée ( $1.10^{10}$  vg) chez la souris saine.

En résumé, la sécrétion de la protéine immunogénique hTNFR-Is/mIgG1 dépend de la souche et de la dose. En effet, il est possible d'obtenir une sécrétion intéressante de l'ordre de 300 pg/ml sans aucune réponse humorale chez la souris saine injectée avec une dose faible ( $5.10^8$  vg). Cependant, augmenter la dose de vecteur conduit irrémédiablement à une réponse immune contre la protéine transgénique corrélée à une baisse de sécrétion, voire aux plus hautes doses à sa disparition dans le sang. Chez la souris *mdx* nous n'avons pas obtenu de sécrétion durable, et la réponse humorale contre le transgène est plus forte que chez la souris saine. Cette dernière observation peut être expliquée par le contexte inflammatoire du muscle dystrophique de la souris *mdx* adulte, chez qui l'on retrouve plus de macrophages résidants et de cellules dendritiques que dans un muscle sain [263].

Pour vérifier l'impact de l'injection et du vecteur sur la réponse contre le transgène hTNFR-Is/mIgG1 nous avons injecté un groupe supplémentaire de souris *mdx* à la dose de  $2.10^9$  vg en traitant les animaux avec un anti-inflammatoire avant l'injection et jusqu'à 48 heures après (voir détail du traitement méthylprednisolone p195). Les résultats d'expression au niveau du muscle injecté et dans le sang sont similaires à ce qui a été obtenu sans traitement anti-inflammatoire (non montré). Ce qui indique que la réponse immune contre le transgène est indépendante du trauma de l'injection, et qu'elle se produit dans les jours suivants quand l'expression de la protéine transgénique augmente.





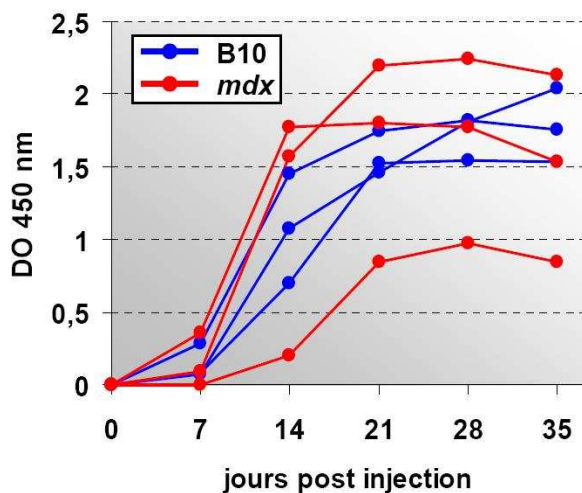
**Figure 88 – Analyse de la sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 et de la réponse humorale.**

**A)** et **B)** Cinétique de sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 dans le sang après l’injection de doses croissantes d’AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 dans le TAG de souris B10 (**A**) ou *mdx* (**B**) (cf détails dans **fig. 86**). Les souris B10 n’ont pas été injectées à la dose  $1.10^{10}$  vg. Les valeurs sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  écart type ( $n=3$  souris par dose). Les doses croissantes de vecteur sont représentées par les courbes bleues, violettes et rouges, et les souris contrôle injectées avec l’AAV6-mSeAP sont en orange (voir la légende dans le cadre du bas). **C)** et **D)** Analyse semi-quantitative par ELISA des IgG anti mTNFR-Is dans le plasma des souris B10 et *mdx* respectivement (dilution 1/90). Chaque courbe représente une souris (même légende qu’en **A** et **B**). Les courbes de la dose  $2.10^8$  vg et de l’AAV6-mSeAP contrôle sont tracées dans chaque graphique mais sont parfois cachées par d’autres courbes égales au niveau endogène ou de valeur nulle.

La sécrétion a également été analysée par ELISA chez les souris injectées avec le vecteur AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 (**fig. 88A** et **B**). L’injection de  $2.10^8$  vg d’AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 ou d’AAV6-mSeAP contrôle chez les souris B10 ou *mdx* ne produit pas de sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 dépassant le niveau endogène de récepteur soluble I du TNF, ce qui est en accord avec l’absence d’expression à J35 sur les immunomarquages des TAG (cf **fig. 86** p151). Aucune sécrétion n’est obtenue non plus à la dose de  $5.10^8$  vg chez les souris *mdx* (**fig. 88B**), alors que la même dose donne une sécrétion terminant en moyenne à 125 ng/ml chez les souris B10 (**fig. 88. A**). Une expression est observée dans les plasmas des souris *mdx* injectées avec  $2.10^9$  vg, avec une concentration moyenne finale à J35 de 360 ng/ml. A la même dose chez les souris B10 nous obtenons une sécrétion plafonnant à 1380 ng/ml, ce qui est 3,8 fois plus élevé que chez la souris *mdx*. Notons que dans les graphiques **B** et **D** de la **figure 88** une des 3 souris *mdx* injectées à la dose  $2.10^9$  a été retirée de l’analyse car une réponse auto-immune importante contre le mTNFR-Is a été détectée chez cet animal dès J0. Enfin, la dose de  $1.10^{10}$  vg injectée chez les souris *mdx* conduit à une sécrétion supérieure à ce qui est obtenu à la dose de  $2.10^9$  vg jusqu’à J14, puis leurs concentrations plasmatiques se rejoignent. Comme nous l’avons vu précédemment avec les transgènes hTNFR-Is/mIgG1 et

mSeAP, les concentrations plasmatiques sont inférieures chez la souris *mdx*. On note cependant dans le cas de la protéine mTNFR-Is/mIgG1 que les sécrétions obtenues sont supérieures à celles trouvées avec le récepteur chimérique humain : de plusieurs centaines de fois chez les B10 à 1200 fois plus élevé chez les *mdx*.

Contrairement à ce qui est trouvé avec la protéine hTNFR-Is/mIgG1, aucune immunoglobuline n'est produite contre la protéine de fusion entièrement murine aux doses allant de  $2.10^8$  à  $2.10^9$  vg chez la souris *mdx* (**fig. 88D**). Chez les souris B10 des réponses anticorps très faibles et essentiellement transitoires ont été détectées chez 3 des 6 souris injectées aux doses de  $5.10^8$  et  $2.10^9$  vg (**fig. 88C**). De manière intéressante, une réponse humorale est détectée chez 2 des 3 souris *mdx* injectées avec la plus forte dose de  $1.10^{10}$  vg ; mais cette réponse se stabilise ou décroît après J21 alors que la concentration plasmatique du transgène augmente toujours (**fig. 88B et D**). Notons enfin pour relativiser l'intensité de cette réponse immune, que le dosage ELISA des IgG a été réalisé en diluant les plasmas 2490 fois dans le cas du hTNFR-Is/IgG1 immunogène, alors que les plasmas des souris injectées avec l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 ont seulement été dilués 90 fois (autrement la réponse humorale serait confondue avec le bruit de fond de l'ELISA).



**Figure 89 – Réponse humorale contre la capsid AAV6.**

Analyse semi-quantitative par ELISA des IgG anti AAV6 dans les plasmas des souris *mdx* et B10 injectées par le vecteur AAV6-mTNFR-Is/mIgG1. Chaque courbe représente une souris.

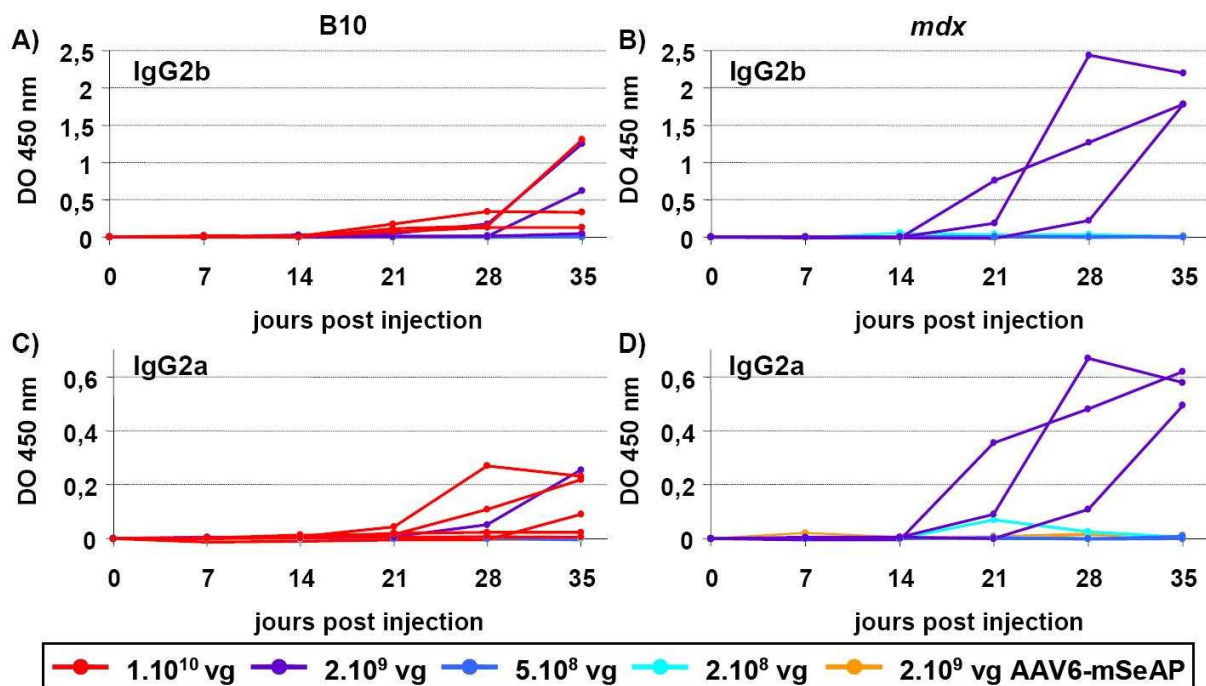
Comme nous trouvons une réponse immune plus marquée contre la protéine transgénique chez la souris *mdx*, nous avons vérifié dans quelle mesure cet effet se retrouve contre le vecteur. Nous trouvons que la réponse contre le vecteur AAV6 est dose dépendante (non montré). La **figure 89** indique qu'à une dose donnée la réponse humorale contre le vecteur est indépendante du contexte pathologique musculaire. Cette observation est retrouvée par Yuasa et coll. lors de l'injection d'un AAV de sérotype 2 dans le muscle de la souris B10 ou *mdx* [384].

En conclusion, le muscle dystrophique est moins bien transduit par l'AAV6. Il en résulte une sécrétion après thérapie génique également inférieure de la protéine transgénique. Le hTNFR-Is/mIgG1 est très immunogène et conduit systématiquement à une réponse transitoire chez la souris *mdx*, ou chez la souris B10 à forte dose. Le mTNFR-Is/mIgG1, en revanche, permet

une sécrétion stable, son immunogénicité est relativement faible, et elle est rencontrée uniquement lors de l'injection de hautes doses chez la souris *mdx*. Ces résultats sont en accord avec la littérature montrant que l'expression d'un néo-antigène humain sécrété tel que le facteur de coagulation IX conduit à une réponse immune chez la souris immunocompétente après une injection d'AAV en IM [265].

#### d) Caractérisation de la réponse immune contre le hTNFR-Is/mIgG

Dans le cas de l'injection du vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1, il a été observé une baisse de la transduction du muscle entre les doses de  $2.10^9$  et  $1.10^{10}$  vg dans le muscle sain. De plus, la transduction du muscle à la dose de  $2.10^9$  vg est inférieure à ce qui est obtenu avec l'AAV6-mSeAP. Ces deux points suggèrent une réponse immune de nature cytotoxique. Pour analyser cette réponse immune en détail, nous avons évalué le profil de la réponse T helper, et nous avons réalisé un immunomarquage du CD8 sur les coupes histologiques des muscles injectés par l'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1.

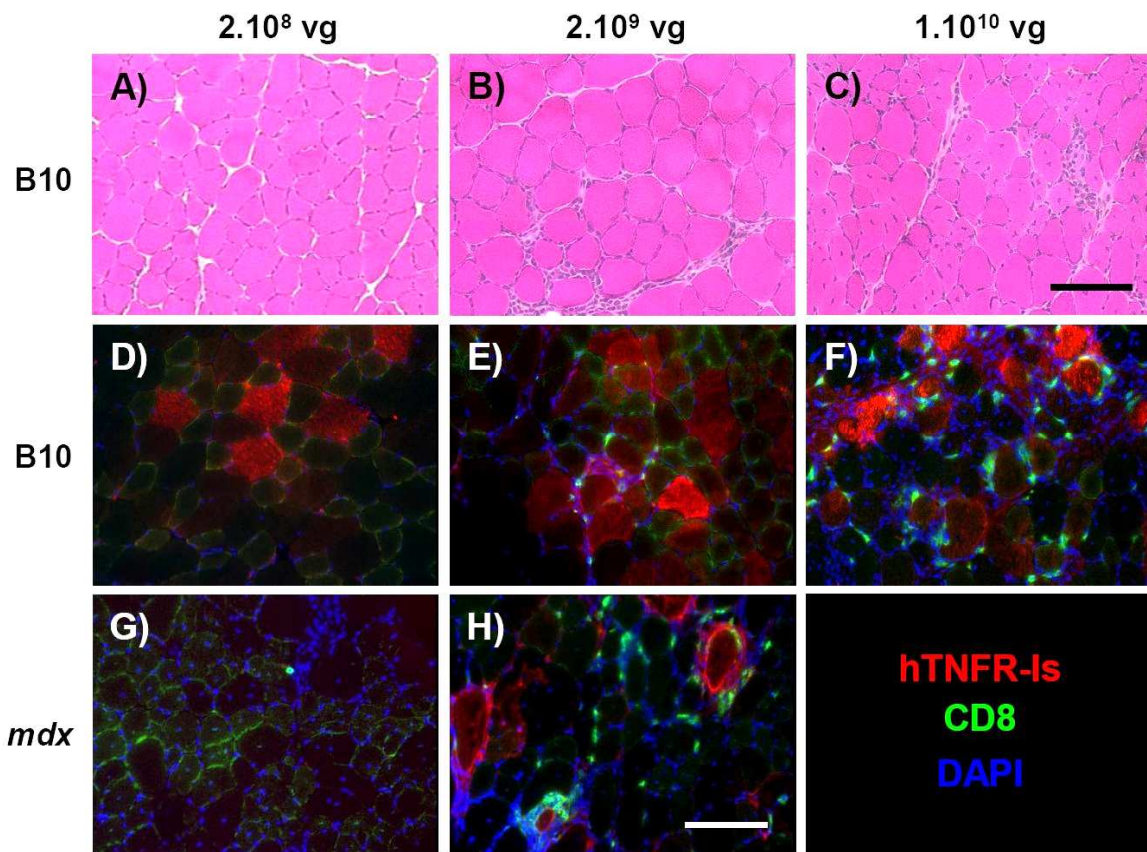


Les sous types de réponses immunes médiées par les cellules T helper sont bien caractérisés chez la souris. Une réponse immune principalement cellulaire de type Th1 est caractérisée par la présence d'anticorps IgG2a, alors qu'une réponse à médiation humorale de type Th2 est caractérisée par la forte présence d'anticorps IgG1 et 2b.

Pour définir de façon plus précise le profil d'IgG de la réponse immune générée chez les souris injectées avec l'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1, nous avons réalisé deux ELISA en parallèle pour détecter dans les plasmas les anticorps de type IgG2a ou IgG2b contre le hTNFR-I.

On retrouve dans la **figure 90A** et **B** un profil IgG2b similaire à ce que nous avons obtenu plus tôt en mesurant globalement les IgG dans les plasmas. Les plasmas immunoréactifs étant ceux des souris injectées aux doses  $2.10^9$  et  $1.10^{10}$  vg, avec une réponse plus intense chez la souris *mdx*. De plus, on observe une réponse IgG2a moins intense de même profil (**fig. 90C** et **D**), ce qui suggère bien qu'une réponse cellulaire modérée est à l'œuvre parallèlement à la réponse humorale, toutes deux participant à la disparition de la sécrétion.

Une coloration topographique HPS des muscles injectés ainsi que l'immunomarquage des lymphocytes T cytotoxiques CD8+ ont ensuite été réalisés.



**Figure 91 – Analyse histologique des muscles injectés par l'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1.**

**A) à C)** Coloration HPS des muscles injectés respectivement avec  $2.10^8$  vg (**A**),  $2.10^9$  vg (**B**) et  $1.10^{10}$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 (**C**). **D) à H)** Immunomarquage en fluorescence du hTNFR-Is (en rouge) et de l'expression de CD8 (en vert). Un marquage nucléaire est également effectué au DAPI en bleu sur les coupes. Les photographies **D) à F)** correspondent aux muscles B10 injectés respectivement avec  $2.10^8$  vg,  $2.10^9$  vg et  $1.10^{10}$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1. Les photographies **G)** et **H)** des muscles *mdx* injectés aux mêmes doses sont présentées directement dessous. Barre d'échelle : 100  $\mu$ m.

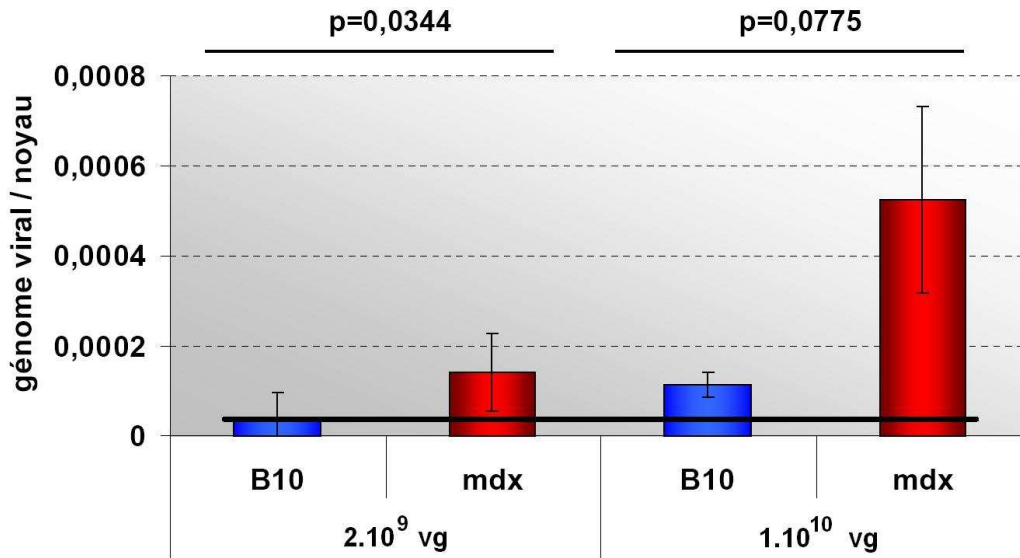
La coloration HPS des muscles B10 injectés avec l'AAV6-mSeAP ou l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 n'a révélé aucun événement de nécrose, d'infiltration inflammatoire ou de centronucléation des fibres musculaires à J35 aux différentes doses de vecteur. La même observation a été faite dans les muscles injectés avec  $2.10^8$  vg (**fig. 91A**) ou  $5.10^8$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 (non montré). Dans les photographies **B** et **C** de la **figure 91** on constate une infiltration de cellules mononuclées à partir de la dose de  $2.10^9$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1, et à la dose de  $1.10^{10}$  vg on observe des fibres centronuclées signant une nécrose suivie de régénération. Le vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 induit donc une réponse inflammatoire dose dépendante. Les colorations HPS des muscles *mdx* injectés sont en revanche moins informatives dans la mesure où il est impossible de distinguer l'inflammation induite par le vecteur du contexte inflammatoire pathologique (non montré).

Aucune présence de cellule CD8 positive n'est détectée à la dose de  $2.10^8$  vg d'AAV6-hTNFR-Is/mIgG1 chez les souris B10 (**fig. 91C**). De la même manière, aucune cellule CD8 positive n'est trouvée chez les souris B10 ou *mdx* injectées avec  $2.10^9$  vg d'AAV6-mSeAP ou d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 (non montré). Les photographies **E**, **F** et **H** de la **figure 91** montrent des cellules exprimant le transgène (en rouge) entourées de cellules CD8 positives (en vert). Le nombre de cellules CD8+ augmente avec la dose de vecteur chez la souris B10 (comparer **E** et **F**). Chez la souris *mdx* on trouve moins de cellules transduites (comparer le marquage rouge entre **G/H** et **D/E**). Chez la souris B10, la photographie **F** illustre la lyse de cellules exprimant le hTNFR-Is/mIgG1 par une réponse cytotoxique corrélée à une infiltration de cellules CD8+ ; ce qui explique le profil d'expression inférieur à la dose de  $1.10^{10}$  vg comparé à la dose de  $2.10^9$  vg vu précédemment chez les souris B10 dans la **figure 86** p151.

Il a été rapporté qu'il existe un niveau basal de cellules CD8+ équivalent entre un muscle sain et le muscle *mdx* [263]. Cependant, nous observons une infiltration CD8+ supérieure chez le muscle *mdx* exprimant le transgène immunogène hTNFR-Is/mIgG1.

L'ensemble de ces données démontre une réponse cellulaire cytotoxique conduisant à la perte de fibres musculaires transduites au cours du temps dans le cas du transgène immunogène hTNFR-Is/mIgG1. Étant donné que des fibres transduites sont toujours visibles à J35 alors que la concentration plasmatique de hTNFR-Is/mIgG1 est nulle, cela signifie que la forte réponse humorale concomitante est capable d'inhiber complètement la sécrétion.

e) Dissémination du vecteur AAV6 après une injection intramusculaire

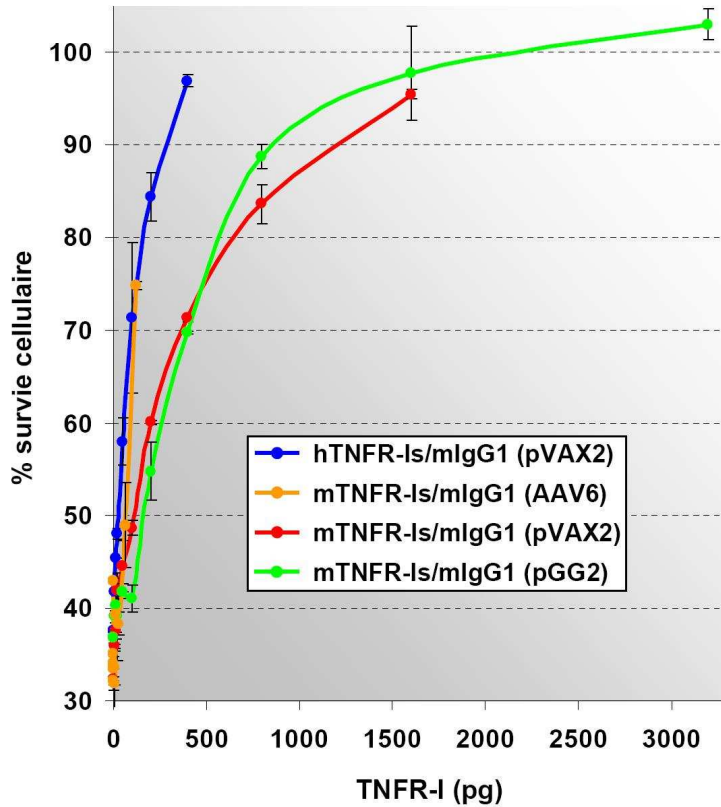


**Figure 92 – Dissémination du vecteur injecté dans le muscle dystrophique.**

Les génomes viraux présents dans le foie des souris B10 et *mdx* injectées en IM avec les AAV6- h et mTNFR-Is/mIgG1 ont été dosés par QPCR. Pour la dose  $2 \cdot 10^9$  vg n=6 souris par groupe, pour la dose  $1 \cdot 10^{10}$  vg n=3 par groupe. La ligne noire correspond au seuil de détection de la QPCR (sensibilité de un génome viral pour 25000 noyaux). Les résultats du test statistique comparant les moyennes obtenues chez les souris B10 et *mdx* à la même dose de vecteur sont indiqués au-dessus de l’histogramme.

Les foies des souris injectées par les AAV6- h et mTNFR-Is/mIgG1 en IM ont été systématiquement prélevés au sacrifice à J35 dans le protocole précédent. Cet organe a été choisi pour sa capacité à capter une grande partie de l’AAV circulant dans le sang. Ainsi nous avons analysé par QPCR la présence de génomes viraux dans le foie afin de déterminer si le muscle *mdx* injecté est plus « perméable » au vecteur que le muscle sain. On constate dans la **figure 92** que le vecteur passe dans le sang après une IM de  $2 \cdot 10^9$  vg dans le muscle sain car nous observons une faible quantité de génomes viraux – proche du seuil de détection (ligne noire) – dans le foie. La même dose injectée dans le muscle des souris *mdx* conduit à un passage supérieur dans le sang comme l’indique la quantité significativement supérieure de génomes viraux dosés dans le foie. Cette tendance est aussi observée entre souris B10 et *mdx* à la dose supérieure de  $1 \cdot 10^{10}$  vg injecté en IM. Le muscle dystrophique est donc plus « perméable » au vecteur AAV que le muscle sain. Ce phénomène peut également participer à la transduction inférieure du muscle dystrophique.

f) Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit par le vecteur AAV6



**Figure 93 – Activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 produit par transduction *in vitro*.**

L'activité biologique des variants du récepteur soluble du TNF est évaluée par leur capacité à inhiber la toxicité induite par le TNF murin sur la lignée cellulaire L929. Cette expérience compare l'activité biologique de milieux conditionnés provenant de la transfection de cellules MRC5-V2 *in vitro* par différents vecteurs. Les mTNFR-Is/mIgG1 provenant de la transfection des plasmides pVAX2, pGG2 ou de la transduction par le vecteur AAV6 sont comparés au hTNFR-Is/mIgG1 provenant de la transfection du plasmide pVAX2. Chaque échantillon est testé en triplicat.

Nous avons démontré précédemment la fonctionnalité de la protéine transgénique présente dans les plasmas des souris *mdx* électrotransférées par le pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1. Cependant, nous avons également obtenu un résultat étonnant montrant que la protéine produite *in vitro* est moins efficace que le hTNFR-Is/mIgG1. Avant de passer à l'évaluation du potentiel thérapeutique du vecteur, nous avons donc testé la fonctionnalité de la protéine transgénique produite à partir du lot d'AAV6 qui sera utilisé. Des cellules MRC5-V2 de faible passage ont donc été transduites avec l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1, puis nous avons évalué la capacité du milieu conditionné récolté à inhiber le TNF.

La **figure 93** dissipe tout doute en montrant bien que la protéine transgénique de ce milieu conditionné (en orange) est aussi efficace que le hTNFR-Is/mIgG1 (en bleu). Les milieux conditionnés des transfections de pVAX2- et pGG2-mTNFR-Is/mIgG1 produits le même jour montrent toujours une efficacité inférieure (courbes verte et rouge), ce qui confirme que le résultat obtenu plus tôt n'était pas dû à une erreur expérimentale, mais qu'il y a bien eu un souci lors de la production du mTNFR-Is/mIgG1 *in vitro* après transfection non virale.

## 2. Évaluation du potentiel thérapeutique du transfert de gène mTNFR-Is/mIgG1 chez la souris *mdx*

Le travail présenté jusqu'ici valide la possibilité de faire sécréter la protéine transgénique mTNFR-Is/mIgG1 par le muscle de la souris *mdx*, accompagnée ou non d'une réponse immune humorale selon la vectorisation et la dose choisie. Le potentiel thérapeutique du transfert du transgène mTNFR-Is/mIgG1 est évalué ci-après chez la souris *mdx* à différents stades de la maladie.

### 2.1. Protocole d'électrotransfert

#### a) Protocole

L'électrotransfert de 25 µg de pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 a montré la possibilité de faire sécréter une protéine chimérique mTNFR-Is/mIgG1 fonctionnelle par le muscle de manière stable durant au moins 35 jours. Cette sécrétion est accompagnée d'une réponse humorale non neutralisante, et au delà de J35 on observe une décroissance lente du niveau circulant de mTNFR-Is/mIgG1. Nous avons reproduit cette expérience avec cette fois pour but d'analyser un éventuel effet thérapeutique local dans le muscle injecté, ou encore un effet systémique sur des muscles distants. Rappelons le rationnel de l'utilisation de cet anti-TNF contre la pathologie dystrophique : le TNF est surexprimé dans le muscle dystrophique, et cette cytokine pro-inflammatoire potentialise l'infiltration et l'activation de cellules immunes qui participent à l'atteinte cellulaire initiant la maladie [371-373]. L'hypothèse est donc que l'inhibition du TNF permettrait aux atteintes mineures des membranes des fibres dystrophiques abîmées d'être réparées par « patching » plutôt que de se nécroser du fait du cumul des dommages membranaires.

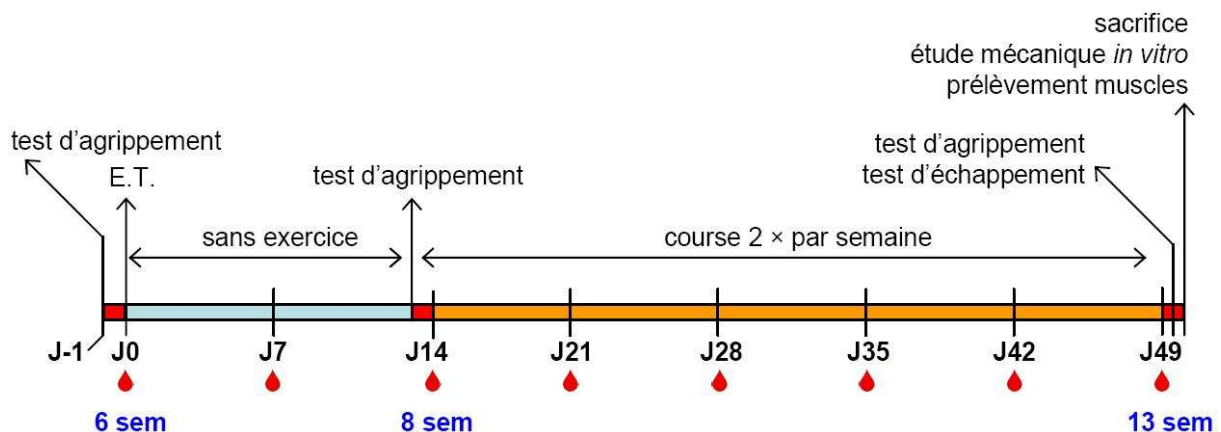
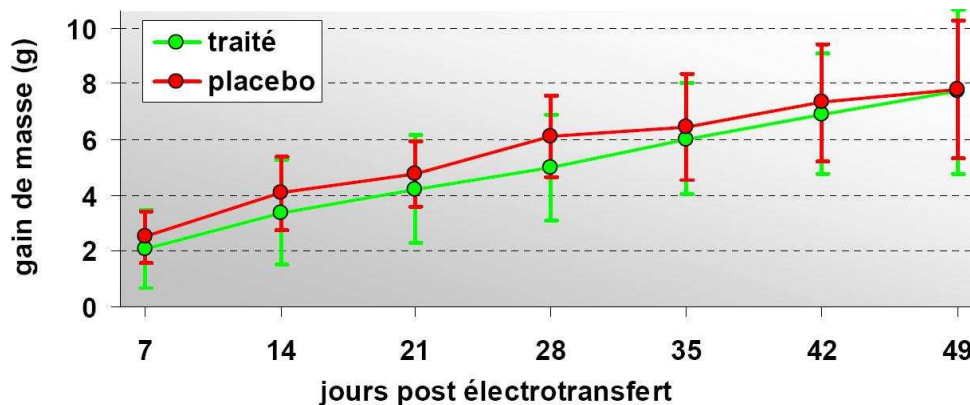


Figure 94 – Protocole d'évaluation fonctionnelle de la souris *mdx* électrotransférée avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.



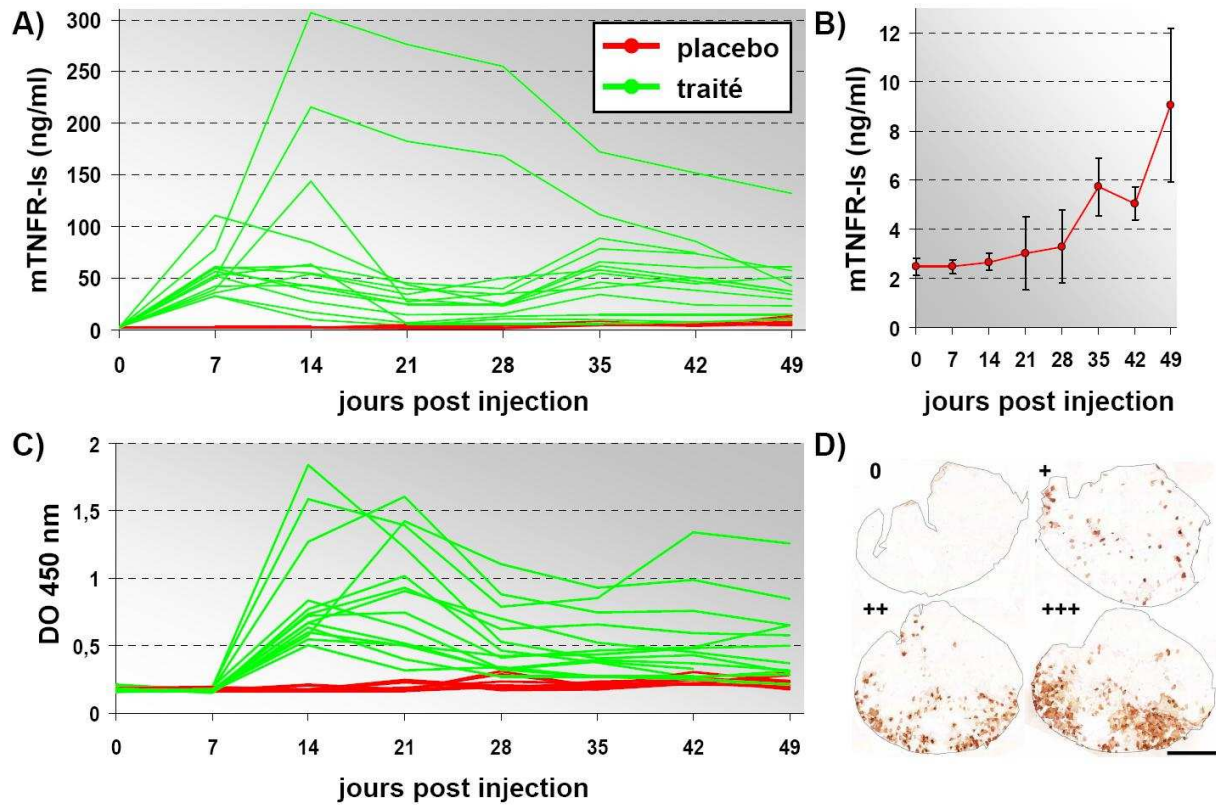
Le protocole d'étude présenté dans la **figure 94** consiste en la transfection du TAG de deux groupes de souris *mdx* mâles. Le premier groupe est électrotransféré avec 25 µg de plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 (35 µl), et sera qualifié par la suite de groupe « traité » (n=14 souris). Le second groupe qualifié de « placebo » est également électrotransféré avec un volume identique de solution physiologique dans le TAG (n=9). Les souris *mdx* sont âgées de 6 semaines au moment de l'électrotransfert, et nous évaluons le traitement sur une période de 7 semaines, les souris sont donc sacrifiées à l'âge de 13 semaines. La littérature rapporte que le pic de nécrose initial est terminé à 6 semaines, mais que par la suite les cycles de nécrose et de régénération sont encore actifs et diminuent progressivement jusqu'à se stabiliser à un faible niveau aux alentours de 12 semaines [156]. Les signes cliniques et histologiques sont alors faibles, de plus le déficit de force est léger chez la souris *mdx*. Nous avons donc soumis les souris *mdx* à un protocole de course sur tapis roulant 2 semaines après l'électrotransfert, alors que le niveau de mTNFR-Is/mIgG1 sanguin est en phase de stabilisation après le pic de sécrétion. Cette course de 30 minutes à la vitesse de 12 mètres par minute est imposée aux souris 2 fois par semaine jusqu'à la fin du protocole, et a pour but d'augmenter les signes cliniques de la pathologie. L'évaluation fonctionnelle du traitement correspond à une mesure de la force développée lors de trois tests d'agrippements : avant le traitement (J-1), avant le début du protocole de course et le jour du sacrifice des animaux. Chaque souris est pesée et prélevée en sang une fois par semaine afin de mesurer les niveaux circulants de protéine transgénique, de créatine kinase musculaire, ainsi que la réponse humorale. Dans la deuxième partie du protocole le sang est systématiquement prélevé 24 heures après la course. La veille du sacrifice les souris sont injectées avec du bleu Evans. Le jour du sacrifice la force développée par les souris est à nouveau évaluée par un test d'agrippement, et un test d'échappement, puis un dernier prélèvement de sang est effectué et des muscles d'intérêt sont prélevés. Les paramètres mécaniques sont évalués *in vitro* sur trois muscles prélevés : l'EDL (Extensor Digitorum Longus), le soléaire et le diaphragme. Les muscles injectés (TAG) et controlatéraux (TAD) ainsi que le gastrocnemius, l'EDL, le soléaire, le triceps et le diaphragme sont congelés pour analyse histologique. L'ensemble des procédures d'évaluation de la force *in vivo* et *in vitro* est détaillé page 198.



**Figure 95 – Gain de masse au cours du protocole d'évaluation fonctionnelle.**  
Moyennes des gains relatifs aux masses mesurées à J0 (traité : n=14 ; placebo : n=9).

La **figure 95** montre que le gain de masse est comparable entre le groupe traité et le groupe placebo au cours du protocole, ce qui suggère l'innocuité du traitement.

**b) Expression du transgène et du TNF au cours du protocole**



**Figure 96 – Expression du mTNFR-Is et réponse humorale chez les souris *mdx* électrotransférées avec le plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1.**

Chaque courbe correspond à une souris *mdx* mâle du protocole d'évaluation fonctionnel présenté dans la **figure 22**. **A)** Cinétique de sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 dans le sang des souris traitées (en vert) et placebo (en rouge). **B)** Sécrétion endogène moyenne de mTNFR-Is chez le groupe placebo. **C)** Analyse semi-quantitative par ELISA des IgG anti mTNFR-Is dans les plasmas (dilution 1/810). **D)** Immunomarquage du mTNFR-Is dans les muscles injectés. Trois photographies de TAG représentatifs des souris traitées sont classées par niveaux de sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 de + à +++. Le TAG 0 correspond à une souris contrôle du groupe placebo. Barre d'échelle : 1 mm.

Dans le groupe des souris traitées on retrouve un profil de sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1 comparable à l'expérience test que nous avons réalisée sur 3 souris *mdx*. En effet, trois sous groupes se détachent dans la **figure 96A** :

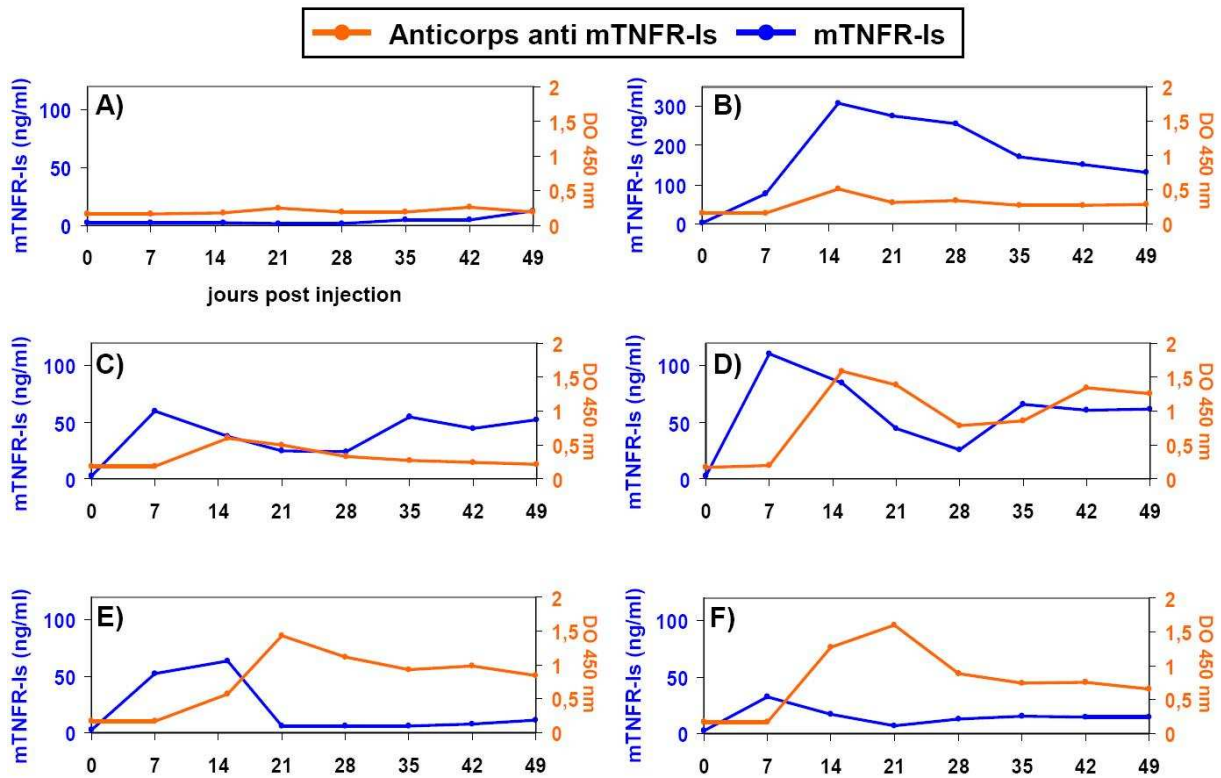
- 3 souris sur 14 ont un fort pic de sécrétion.
- 3 souris sur 14 ont une sécrétion faible qui rejoint le niveau endogène au cours du temps.
- La majorité des souris traitées (8/14) a une sécrétion aux alentours de 50 ng/ml. À noter que la sécrétion baisse entre J21 et J28 avant de remonter.

La **figure 96B** présente les courbes de sécrétion du mTNFR-Is endogène des souris placebo à une échelle plus adaptée. On constate une augmentation progressive de la concentration plasmatique de mTNFR-Is entre l'âge de 6 et 13 semaines. Cette variation pourrait être attribuée à première vue au protocole de course. Cependant, nous avons constaté une hausse similaire au même âge chez des souris *mdx* n'ayant pas couru (cf **fig 84** p151). Ce profil de sécrétion chez le groupe placebo est donc normal.

L'expression de mTNFR-Is dans le muscle injecté (TAG) a été évaluée par immunomarquage en fin de protocole à J49 (**fig. 96D**). Aucune expression n'est visible dans les fibres musculaires des muscles contrôle du groupe placebo (0). Dans le groupe traité on trouve une corrélation entre le niveau de sécrétion et l'expression dans le TAG (+ à +++). Dans le groupe traité les fibres transfectées sont réparties dans tout le muscle, et comme attendu elle sont bien plus nombreuses 7 semaines après l'injection que les quelques fibres positives que nous avons vues dans le protocole test plus de 6 mois après l'électrotransfert (cf **fig. 82** p146).

Enfin, l'analyse des IgG anti mTNFR-Is dans la **figure 96C** confirme l'apparition systématique d'une réponse humorale chez les souris du groupe traité.

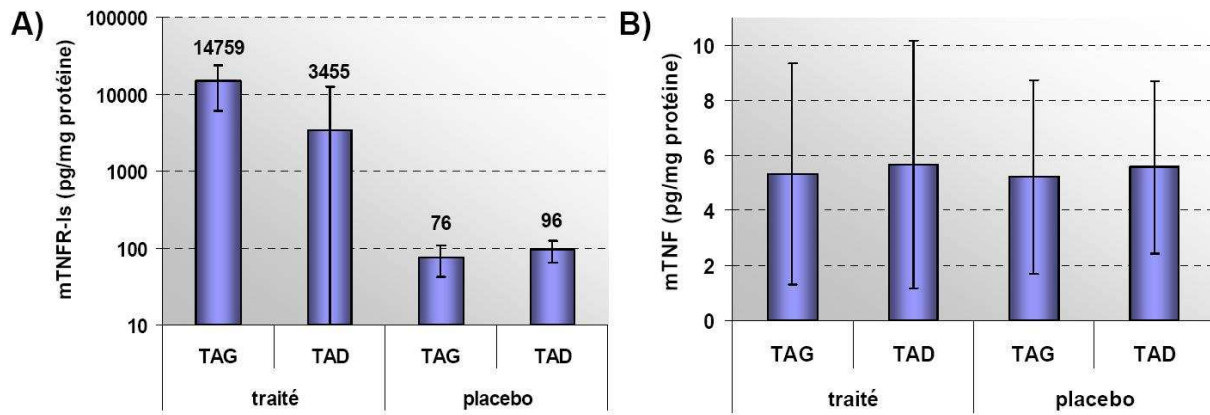
La sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 et la réponse humorale concomitante sont présentées au cas par cas dans la **figure 97** suivante.



**Figure 97 – Détail de la réponse humorale chez 6 souris du protocole d'électrotransfert.**

Les données de sécrétion de la protéine transgénique et la réponse IgG de la *figure 24* sont présentées ici individuellement. **A)** Chez une souris du groupe placebo. **B) à F)** Chez des souris traitées.

Aucune réponse immune n'est visible chez les souris du groupe placebo (*fig. 97A*). En revanche, on voit bien dans nos 5 exemples (**B** à **F**) la relation directe entre la sécrétion de la protéine transgénique en orange et l'apparition une semaine après de la réponse anticorps en bleu. La souris **B** est représentative des 3 souris du groupe à forte sécrétion, chez qui l'on observe une réponse humorale faible et transitoire. Les souris **C** et **D** font parties du groupe majoritaire, chez qui on observe une sécrétion moyenne baissant avec l'apparition d'une réponse immune d'intensité variable, puis remontant et se stabilisant avec la baisse des anticorps à partir de J21. Enfin, les souris **E** et **F** correspondent à 2 des 3 souris du groupe traité ayant une faible sécrétion rejoignant le niveau du récepteur endogène parallèlement à une forte réponse immune. L'intensité de la réponse immune semble donc d'autant plus faible que la sécrétion de protéine transgénique circulante est forte, et on observe dans la majorité des cas une réponse immune qui faiblit et la remontée du niveau sanguin de protéine transgénique. Ces deux points suggèrent l'induction d'une tolérance vis-à-vis du mTNFR-Is/mIgG1 lors de ce protocole.



**Figure 98 – Dosage du mTNFR-Is et du TNF dans le muscle injecté et son controlatéral.**

Le mTNFR-Is et le TNF ont été dosés par ELISA dans les lysats de TAG et de TAD prélevés au sacrifice à J49. **A)** Valeurs moyennes de mTNFR-Is dans le muscle électrotransféré (TAG) et dans son controlatéral TAD. **B)** Valeurs moyennes de mTNF.

Le mTNFR-Is et le TNF ont également été dosés dans le TAG électrotransféré et dans le muscle controlatéral TAD servant de contrôle. La **figure 98A** montre des niveaux comparables de mTNFR-Is à J49 dans le TAG et le TAD des souris placebo. Ce niveau basal correspond certainement à la population de cellules mononuclées infiltrantes que nous avons vue précédemment par immunomarquage chez la souris *mdx*. On trouve comme attendu une surexpression du mTNFR-Is dans le TAG des souris traitées, du fait de l'expression du transgène mTNFR-Is/mIgG1. Et on observe également un niveau de mTNFR-Is supérieur dans le TAD des souris traitées comparé aux souris placebo, ce qui signifie que le mTNFR-Is/mIgG1 circulant est capable de pénétrer dans des muscles distants du TAG sécréteur. Cependant, le niveau dosé dans le TAD de la majorité des souris traitées est proche du niveau endogène, et seules 2 souris sur les 14 traitées participent à cette moyenne élevée (d'où le grand écart type). Étonnamment, le niveau de mTNFR-Is dosé dans le TAD de ces 2 souris en particulier est bien supérieur à celui trouvé dans leur muscle sécréteur TAG. Cela pourrait signifier que la demi-vie du transgène dans le tissu musculaire est supérieure à celle de la protéine dans le sang.

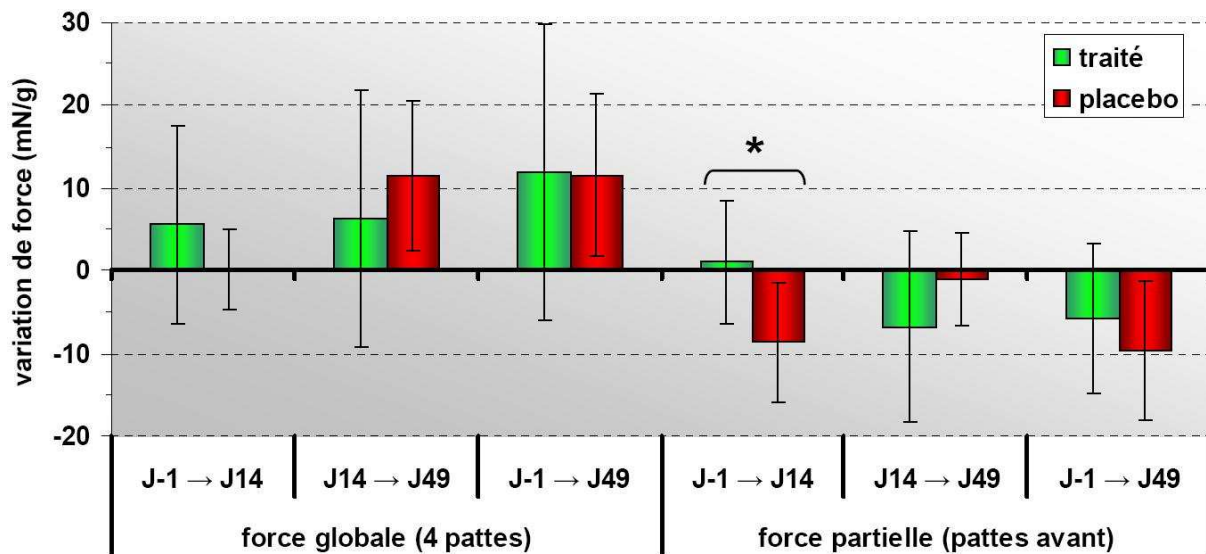
Au contraire du dosage plasmatique, il est possible de détecter le TNF dans le muscle par ELISA. La **figure 98B** montre que le TNF est présent en quantité comparable dans les muscles tibiaux antérieurs, que ces muscles expriment ou non le transgène.

Nous avons montré plus tôt que le niveau de TNF dans le sang des souris *mdx* en condition normale est en dessous du seuil de détection par ELISA. Et il est connu que l'exercice peut induire une augmentation du TNF circulant chez un individu sain. Nous nous sommes demandés si le protocole de course pouvait induire la sécrétion chronique de cette cytokine chez les souris *mdx*. Un dosage ELISA du TNF a donc été réalisé sur les plasmas prélevés avant et après le protocole de courses chez 3 souris placebo et chez 3 souris traitées. Aucun TNF n'a été détecté dans les échantillons. Ce qui signifie que le niveau de cette cytokine inflammatoire n'est pas supérieur 24 heures après une course sur tapis roulant chez la souris

*mdx*. Si la sécrétion de TNF est bien induite par la course chez la souris *mdx*, alors cela reste une réponse précoce de l'inflammation qui est terminée après quelques heures.

### c) Évaluation fonctionnelle

Les forces globales (4 pattes) et partielles (pattes antérieures) ont été suivies sur 2 périodes, avant et après le protocole de course, par comparaison des mesures réalisées à J-1, J14 et J49 lors des tests d'agrippement.



**Figure 99 – Variation de la force mesurée lors des tests d'agrippement.**

Trois tests d'agrippements mesurant la force des 4 pattes ou uniquement des pattes avant ont été réalisés chez les souris *mdx* traitées et placebo à J-1, J14 et J49. Ces mesures sont normalisées par la masse de l'animal au jour donné, puis la variation de force moyenne est calculé entre différentes périodes : sur l'intégralité du protocole de J-1 à J49, et de J-1 à J14 et de J14 à J49. Un astérisque (\*) est indiqué quand la variation moyenne de force est significativement différente entre le groupe traité et le groupe placebo ( $p < 0,05$ ).

Si l'on considère le protocole dans son ensemble (J-1 à J49) on observe que la force globale des animaux augmente, alors que la force des pattes antérieures baisse (**fig. 99**). Sur la période de deux semaines sans course suivant l'électrotransfert (J-1 à J14) on ne constate aucune différence significative entre la force globale du groupe traité et du groupe placebo. De même, le gain de force globale est comparable dans la deuxième période comprenant le protocole de course sur tapis roulant (entre J14 et J49). En revanche, on observe une différence significative de la variation de la force d'agrippement des pattes antérieures entre groupe traité et placebo durant les 2 premières semaines (de J-1 à J14). En effet, les souris *mdx* traitées par l'électrotransfert de pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 ne perdent pas de force des pattes antérieures sur cette période (en moyenne), alors que c'est le cas dans le groupe placebo. Aucune différence significative n'est par la suite constatée entre le groupe traité et le groupe placebo sur la période de J14 à J49. L'effet protecteur du traitement sur la force des pattes

antérieures les 2 premières semaines est intéressant car les muscles impliqués sont distants du muscle injecté situé dans la patte arrière gauche.

Un test d'échappement (méthode p198) a également été réalisé à J49, mais il n'a pas montré de différence significative entre la force mesurée chez les souris traitées ( $0,09 \pm 0,02$  N/g) et celle du groupe placebo ( $0,10 \pm 0,01$  N/g). Cette mesure de la force globale des souris confirme les résultats trouvés lors du test d'agrippement des 4 pattes.

		secousse			tétanos			contraction excentrique
		P0 N (mN/mm <sup>2</sup> )	TC (ms)	T50 (ms)	P0 N (mN/mm <sup>2</sup> )	pente (mN/ms)	T50 (ms)	% de chute de force
EDL	traité	46,40 ± 10,24	24,40 ± 4,58	25,84 ± 4,65	142,15 ± 19,86	9,33 ± 2,33	44,00 ± 5,26	-38,37 ± 11,28
	placebo	43,50 ± 16,14	25,00 ± 3,86	28,13 ± 5,68	133,72 ± 43,34	7,44 ± 3,20	44,00 ± 5,01	-43,32 ± 13,74
	p-value	0,4849	0,6668	0,1672	0,4018	0,0348	1,0000	0,2207
Sol	traité	10,02 ± 5,70	49,36 ± 11,37	66,55 ± 19,91	71,66 ± 29,73	0,81 ± 0,39	97,00 ± 18,63	
	placebo	9,66 ± 4,76	46,71 ± 9,79	59,57 ± 17,30	67,25 ± 33,36	0,81 ± 0,48	97,00 ± 14,22	
	p-value	0,8447	0,4776	0,2893	0,6752	0,9795	1,0000	
Dia	traité	19,97 ± 8,80	51,08 ± 6,20	66,46 ± 18,26	65,23 ± 22,89	0,90 ± 0,38	75,38 ± 10,31	-27,51 ± 9,77
	placebo	15,97 ± 5,41	49,11 ± 4,14	63,11 ± 14,11	58,15 ± 18,98	0,58 ± 0,23	72,89 ± 12,93	-26,85 ± 17,53
	p-value	0,2406	0,4167	0,6490	0,4548	0,0358	0,6200	0,9125

**Tableau 4 – Paramètres mécaniques des muscles.**

Les paramètres mécaniques des muscles EDL (Extensor Digitorum Longus), soléaires (Sol) et du diaphragme (Dia) des souris *mdx* du protocole d'évaluation fonctionnelle de l'électrotransfert du pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 ont été évalués *in vitro* (méthodes p200). Les données présentées correspondent aux moyennes de muscles gauches et droits dans le cas de l'EDL et du Sol. La p-value du test de Student comparant la moyenne du groupe traité à celle du groupe placebo est indiquée sous les valeurs correspondantes ; les différences significatives sont surlignées en jaune ( $p < 0,05$ ).

Le jour du sacrifice divers paramètres mécaniques ont été évalués *in vitro* sur les muscles EDL (Extensor Digitorum Longus), soléaires (Sol), et sur le diaphragme. Ces résultats sont présentés dans le **tableau 4**. Les contractions excentriques sont particulièrement délétères pour le muscle dystrophique. La chute de force observée chez les souris *mdx* du groupe placebo durant les contractions excentriques est donc supérieure à 20 % (valeur maximale que peut atteindre un muscle sain de souris B10). Cependant, aucune amélioration n'est observée sur ce paramètre dans le groupe de souris traitées. Cela est attendu car l'inhibiteur du TNF ne corrige pas l'atteinte membranaire consécutive à l'absence de dystrophine. Les valeurs de force maximale isométrique P0 N mesurées lors d'une secousse ou d'un tétanos ne sont pas non plus améliorées par le traitement. Le seul paramètre significativement amélioré chez le groupe *mdx* traité est la pente obtenue chez l'EDL et le diaphragme lors d'un tétanos. Le

traitement améliore donc la vitesse de contraction de l'EDL et du diaphragme lors d'une contraction tétanique.

Une analyse plus précise a également été effectuée en prenant en compte uniquement les 3 souris sur 14 ayant les plus fortes sécrétions du transgène mTNFR-Is/mIgG1 parmi le groupe traité. On retrouve chez ces 3 souris une pente significativement supérieure à celle du groupe placebo dans le diaphragme et l'EDL lors de la stimulation tétanique (non montré). De plus, la phase de contraction est significativement réduite lors d'une secousse musculaire dans l'EDL de ces 3 souris : TC de  $21,60 \pm 2,19$  vs  $25,00 \pm 3,86$  ms dans le groupe placebo ( $p=0,0408$ ). La tension musculaire moyenne que le diaphragme de ces 3 souris peut développer lors d'une stimulation isométrique (secousse) est également supérieure : P0 N de  $26,43 \pm 6,51$  vs  $15,97 \pm 5,41$  mN/mm<sup>2</sup> dans le groupe placebo ( $p=0,0195$ ). En revanche, le pourcentage de chute de force lors de contractions excentriques n'est toujours pas amélioré chez ces 3 souris.

En conclusion, le temps de réponse de l'EDL et du diaphragme est amélioré dans le groupe de souris *mdx* traité, et la fonction musculaire du diaphragme est d'autant plus améliorée que le niveau de mTNFR-Is/mIgG1 sécrété est important.

#### **d) Évaluation de l'atteinte membranaire et histologie du muscle dystrophique**

L'atteinte membranaire du muscle dystrophique a été évaluée chez les souris traitées et placebo en dosant la créatine kinase musculaire relarguée dans le sang, et également au niveau histologique en évaluant l'entrée du bleu Evans dans les fibres musculaires.



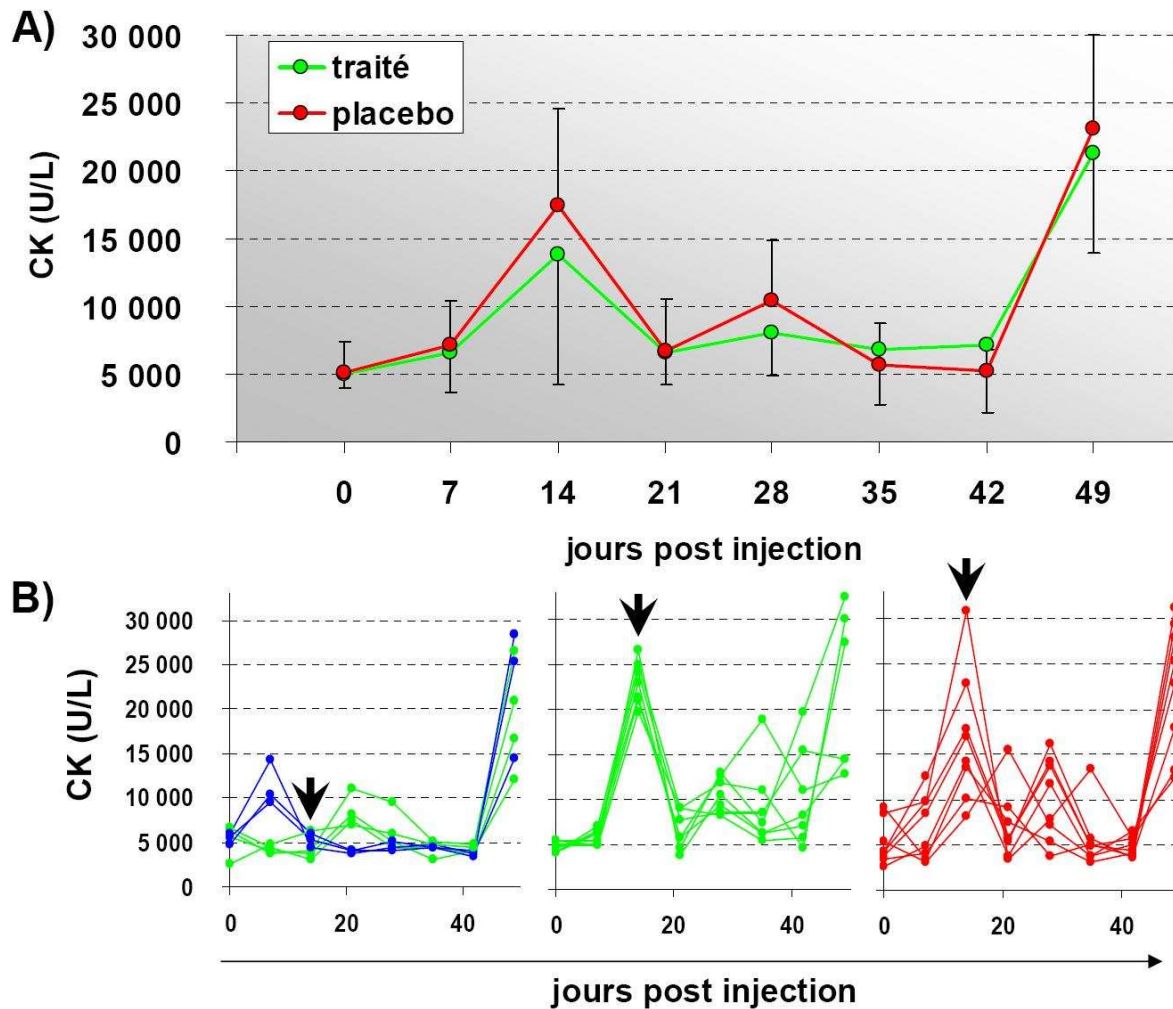


Figure 100 – Créatine kinase plasmatique.

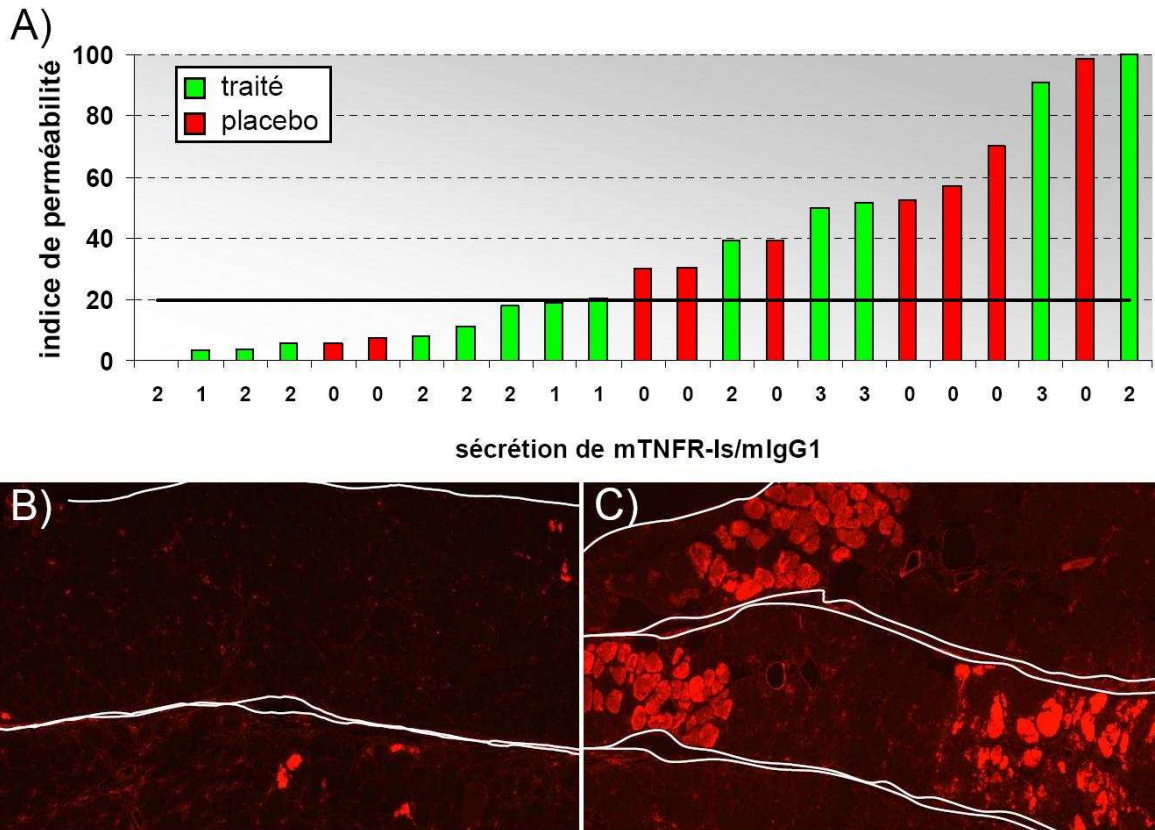
**A)** Courbes moyennes du groupe traité (n=14) et du groupe placebo (n=9). **B)** Chaque courbe correspond à une souris, avec en vert les souris traitées et en rouge les souris placebo. Le groupe traité a été divisé en 2 sous groupes de 7 souris en fonction du niveau de CK détecté à J14 (flèche). Les courbes des 3 souris traitées présentant les plus fortes sécrétions de mTNFR-Is/mIgG1 sont tracées en bleu. Toutes les courbes des souris placebo sont présentées dans le graphique de droite en rouge.

La créatine kinase (CK) circulante est un indicateur de l'état musculaire global, elle rend compte de la perméabilité de la membrane des fibres musculaires dystrophiques. La **figure 100A** présente le dosage de la CK plasmatique chez les souris au cours du protocole. On trouve un niveau de base moyen élevé de 5000 U/L de CK chez la souris *mdx* à J0, puis 3 pics sont observés à J14, J28 et J49. La première augmentation brusque à J14 correspond à la nécrose de fibres musculaires 24 heures après le second test d'agrippement. Le second pic de CK a lieu 2 semaines après l'initiation du protocole de course sur tapis roulant. Enfin, on observe une forte augmentation de la CK circulante à J49 dans l'heure suivant la série finale d'exercices que sont les tests d'agrippement et d'échappement. L'intensité des pics de CK 24 heures après les exercices d'agrippement à J14 et J49 fût une surprise, d'autant qu'aucune augmentation de cet ordre n'est visible 24 heures après le premier test d'agrippement à J-1. Même si ce test de force constitue en soi un exercice physique, nous nous attendions plutôt à

voir une augmentation marquée durant le protocole de course, mais la course a provoqué une augmentation de la CK plus progressive et modérée. Si l'on considère le protocole dans son ensemble, la courbe moyenne du groupe traité (en vert) est superposée à celle du groupe placebo (en rouge), et aucune différence statistiquement significative n'est trouvée aux différents temps (*fig. 100A*). Ce qui signifierait que la sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 ne confère pas ici d'avantage sélectif aux fibres musculaires dystrophiques lors d'une activité normale ou face à un exercice physique.

Cependant l'analyse détaillée du groupe traité montre un profil intéressant à J14 chez la moitié des souris. En effet, on constate dans le graphique de gauche de la *figure 100B*, que la moitié des souris du groupe traité ne présente pas d'augmentation de CK après le test d'agrippement à J14 (flèche). Parmi ce sous groupe, on retrouve les 3 souris ayant les plus forts niveaux de sécrétion du transgène (courbes bleues). Ce constat est d'autant plus intéressant que ces 3 souris présentent un profil CK différent, avec un pic à J7, puis un niveau pathologique normal de CK durant toute la suite du protocole, sans que l'exercice de course sur tapis n'induisse d'augmentation. Le pic à J7 a lieu durant la phase du protocole sans exercice physique imposé, il pourrait donc correspondre à une activité spontanée accrue chez ces souris. Il n'est pas non plus exclu que ce pic à J7 reflète une réponse cytotoxique contre les fibres transfectées du TAG.

Le profil de ce sous groupe de souris traitées diffère fortement de l'autre moitié du groupe de souris traitées (graphique du milieu), ainsi que de toutes les souris placebo (graphique de droite), chez qui la CK augmente fortement à J14 (voir flèches), puis durant le protocole de course. Le traitement protège donc une partie des souris de la nécrose induite dans le muscle dystrophique lors de l'exercice physique.



**Figure 101 – Perméabilité du diaphragme au bleu Evans.**

**A)** Ce graphique présente l'indice de perméabilité du diaphragme des souris du protocole. Les trois groupes de sécrétion sont présentés en abscisse : de 1 à 3. 0 correspondant aux souris placebo, et 1 à 3 correspondant aux groupes ayant une sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 faible, moyenne et forte respectivement. L'indice de perméabilité a été défini par analyse morphométrique du nombre de fibres positives pour le bleu Evans par unité de surface du diaphragme ; cet indice est sans grandeur et est présenté en % relativement au diaphragme le plus atteint fixé à 100 % (le diaphragme présentant le plus grand nombre de fibres positives par unité de surface). **B)** et **C)** Photographies de microscopie en fluorescence révélant le bleu Evans en rouge dans des coupes transversales de diaphragmes faiblement et fortement perméables. Le contour du diaphragme est délimité en blanc.

L'état général des muscles et l'atteinte membranaire ont également été évalués au niveau histologique par coloration HPS et par révélation de la fluorescence du bleu Evans respectivement. En effet, les souris ont reçu une injection de bleu Evans la veille du sacrifice. Cette molécule se lie à l'albumine dans le sang, et elle pénètre dans les fibres musculaires dont la membrane est perméable. En microscopie à fluorescence il est possible de l'exciter pour produire une fluorescence rouge permettant de visualiser les fibres musculaires abimées ou nécrosées. Suite aux résultats d'évaluation fonctionnelle *in vitro* nous avons décidé d'analyser la fluorescence du bleu Evans dans le diaphragme de toutes les souris du protocole. Une analyse morphométrique comptant le nombre de fibres positives pour le bleu Evans par unité de surface du diaphragme a donc été réalisée pour classer les différents diaphragmes par indice de perméabilité (**fig. 101**). Dans la **figure 101A** on constate une grande variabilité de la perméabilité des diaphragmes *mdx* vis-à-vis du bleu Evans. La majorité des diaphragmes des souris traitées (8/14) possède un indice de perméabilité inférieur à 20 %, alors que seules 2

souris placebo sur 9 sont sous ce seuil. Cependant l'analyse statistique de la perméabilité moyenne n'a pas révélé de différence significative entre le groupe traité et le groupe placebo ( $43 \pm 30\%$  vs  $30 \pm 32\%$  dans le groupe traité ;  $p=0,1794$ ).

De plus, il ne semble pas y avoir de corrélation entre la perméabilité de la membrane des fibres musculaires du diaphragme au bleu Evans et le niveau de sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1 (voir abscisse de **fig. 101A**). La **figure 101B** et **C** présente deux cas rencontrés : les diaphragmes les moins perméables au bleu Evans ont quelques fibres positives éparées (**fig. 101B**), alors que l'on trouve des fibres positives groupées par paquets dans les diaphragmes les plus atteints (**fig. 101C**). L'analyse de coupes sériées colorées par HPS confirme que la majorité des fibres positives perméables au bleu Evans ont un caractère nécrotique (non montré).

Divers muscles ont été évalués en plus du diaphragme : des muscles de la patte postérieure (tibials antérieurs, Gastrocnémus, EDL), ainsi que le triceps de la patte antérieure. La coloration HPS et la fluorescence du bleu Evans ont révélé une très forte hétérogénéité d'atteinte au sein du groupe traité et du groupe placebo. Ces fortes variations d'un muscle squelettique à l'autre et d'un groupe à l'autre n'ont pas permis de conclure au niveau histologique.

En conclusion, nous avons montré le potentiel thérapeutique de l'électrotransfert du plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 chez la souris *mdx* adulte à travers l'amélioration fonctionnelle de l'activité de certains muscles comprenant le diaphragme. En revanche, la sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 dans le sang des souris ne permet pas d'améliorer la qualité des fibres musculaires. En effet, le muscle reste aussi susceptible aux contractions excentriques, ce qui indique comme attendu que la stratégie anti-TNF ne corrige pas l'atteinte membranaire. Cependant, des tendances positives sont observées chez les souris traitées au niveau de la perméabilité membranaire. De fait, la sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 ne diminue pas le niveau pathologique de créatine kinase (CK) dans le sang, mais elle empêche l'augmentation de la concentration de CK circulante induite lors d'exercices physiques, particulièrement dans le cas où il y a production élevée de mTNFR-Is/mIgG1. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les anti-TNF favorisent la réparation membranaire des fibres atteintes au détriment de la nécrose.

## **2.2. Protocole utilisant l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1**

### **a) Pic de nécrose de la souris *mdx***

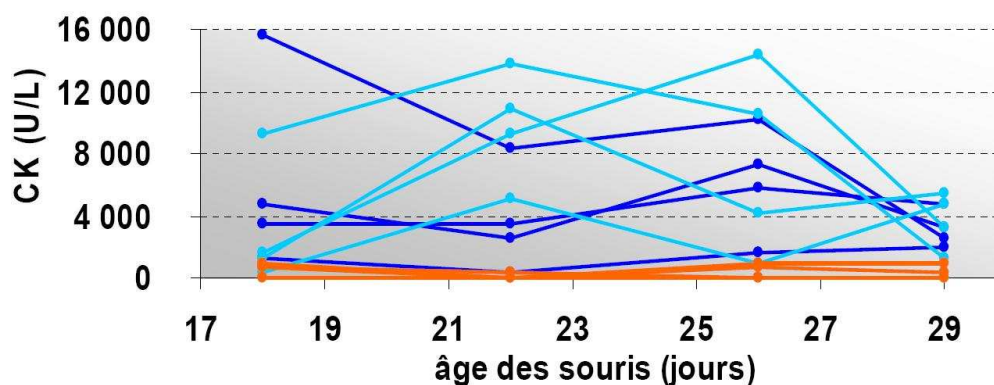
Au-delà d'un effet bénéfique en phase symptomatique, il serait intéressant de voir si la thérapie génique anti-TNF peut améliorer le phénotype dystrophique en intervenant avant l'apparition des signes cliniques. En effet, nous avons abordé dans l'introduction le fait que le TNF pourrait être impliqué dans l'initiation de la pathologie dystrophique. Miranda Grounds

et coll. ont par exemple montré la possibilité d'améliorer légèrement le profil histologique du muscle des souris *mdx* en administrant diverses protéothérapies anti TNF avant le pic de nécrose (Remicade, Etanercept, anticorps anti-TNF) [386-388].

L'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 est tout indiqué pour cette approche chez la souris *mdx* avant l'initiation du pic de nécrose. En effet, les électrodes dont nous disposons pour effectuer l'électrotransfert ne sont pas adaptées aux membres de la souris de moins de 15 grammes. Alors que le vecteur AAV6 peut être administré à des souris nouveaux-nés par simple injection intramusculaire. De plus, nous avons montré chez la souris *mdx* adulte que l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 permet une expression plus élevée de mTNFR-Is/mIgG1 dans le sang que l'électrotransfert.

Miranda Grounds constate l'initiation du pic de nécrose dans le muscle tibial antérieur de la souris *mdx* précisément à 19 jours [386]. Et Hofman et coll. indiquent que la majorité du muscle semble subir au moins un cycle de nécrose entre 2 et 3 semaines post partum [156].

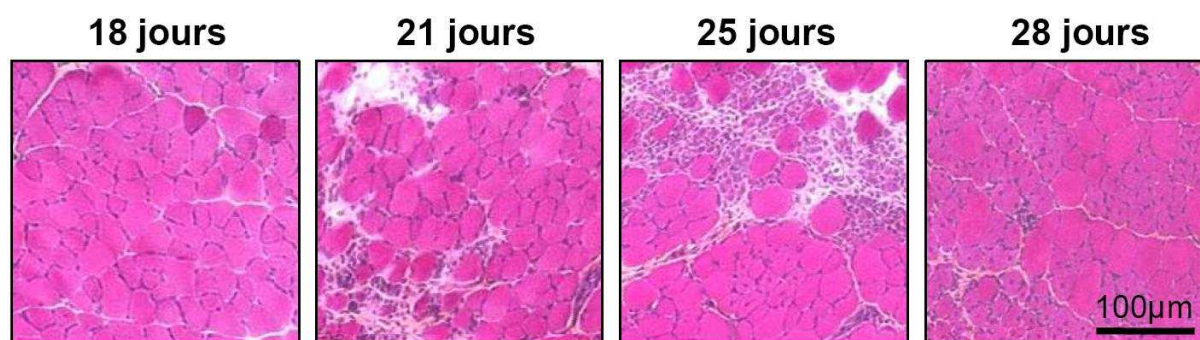
Certaines variations existant d'une colonie *mdx* à l'autre, nous avons tout d'abord vérifié la cinétique d'apparition du pic initial de nécrose chez les souris *mdx* de notre colonie. Pour cela nous avons effectué divers prélèvements de sang chez de jeunes souris *mdx* ou B10 non sevrées âgées de 16 à 29 jours. Un groupe de souris *mdx* a également été sacrifié à ces âges pour vérifier le profil histologique du TA par coloration HPS.



**Figure 102 – Créatine kinase plasmatique chez les jeunes souris *mdx*.**

Chaque courbe correspond au dosage de la créatine kinase dans le sang d'une souris prélevée à l'âge de 18, 22, 26 et 29 jours. Les courbes bleues sont des souris *mdx* mâles (bleu foncé) ou femelles (bleu clair). Les courbes orange correspondent à des souris B10 femelles.

La **figure 102** présente le dosage de la créatine kinase (CK) plasmatique chez ces souris. Le niveau de CK circulant est très élevé chez les jeunes souris *mdx* entre les âges de 18 et 26 jours (en bleu) comparé aux souris B10 (en orange). Puis le niveau de CK baisse chez les souris *mdx* après 26 jours, et on atteint à 29 jours une concentration proche de celle observée chez les souris *mdx* adultes (de l'ordre de 4 à 5000 U/L). Ces données sont en accord avec la littérature rapportant l'augmentation du niveau de créatine kinase de 10 fois entre 14 et 21 jours [323].

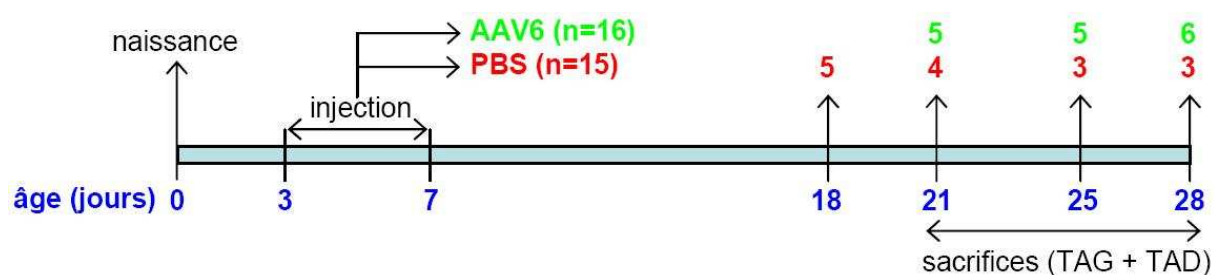


**Figure 103 – Coloration HPS du muscle tibial antérieur chez les jeunes souris *mdx*.**

La coloration HPS des tibials antérieurs (TA) prélevés chez les souris *mdx* entre 18 et 28 jours montre l'apparition progressive des signes histologiques de la pathologie. À l'âge de 18 jours le TA est encore épargné. Entre 18 et 21 jours la nécrose a commencé, des groupes de fibres nécrosées sont infiltrés de monocytes et des événements de phagocytose ont lieu. À 25 jours la nécrose fait place à la régénération et on observe de nombreux myoblastes, ainsi que les premières fibres centronuclées de petit calibre. Enfin, à 28 jours des événements de nécrose et de régénération sont toujours en cours et on observe de nombreux territoires composés de fibres musculaires centronuclées attestant des régénérations précédentes.

La CK circulante et le profil histologique du TA montrent donc bien que le pic de nécrose a lieu dans notre colonie *mdx* au cours de la 4<sup>ème</sup> semaine, avec les premiers signes histologiques apparaissant vers 21 jours.

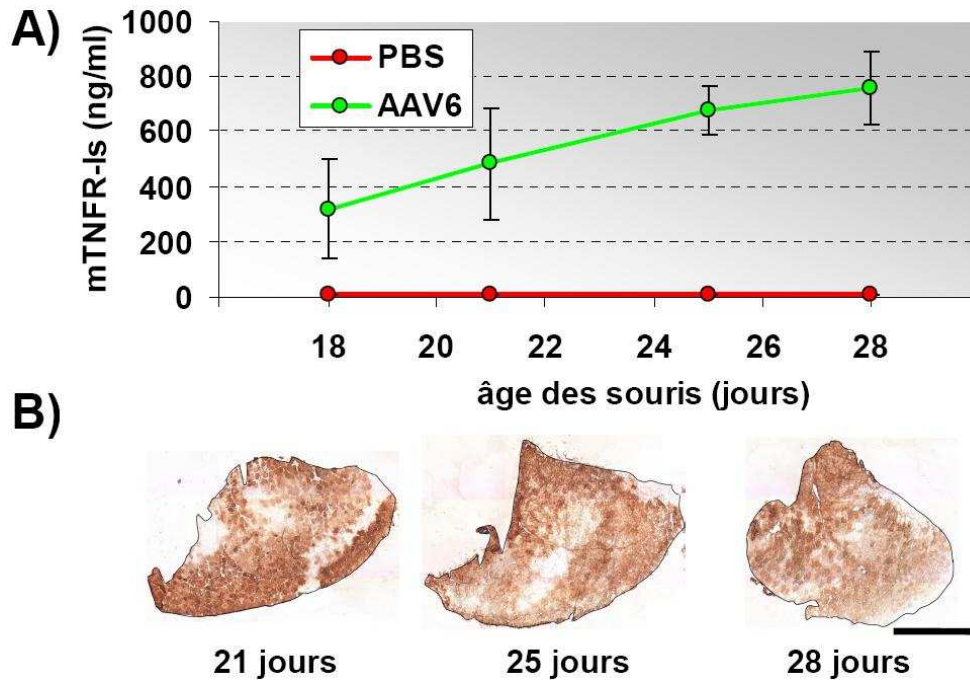
**b) Traitement AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 précédant le pic de nécrose de la souris *mdx***



**Figure 104 – Protocole d'évaluation de l'injection intramusculaire d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 chez des souris *mdx* nouveaux-nés.**

Nous avons donc lancé un protocole visant à évaluer l'apparition des signes histologiques chez la souris *mdx* injectée avec l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1. Ce protocole présenté dans la **figure 104** consiste en l'injection de 3 µl d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 ( $2,4 \cdot 10^9$  vg) dans le TAG de souris *mdx* entre 3 et 7 jours post partum. Chaque portée de souris est divisée en 2 groupes injectés soit avec l'AAV6, soit pour les souris contrôle avec 3 µl de PBS. Puis les souris sont prélevées en sang à l'âge de 18 jours, et une seconde fois le jour du sacrifice pour

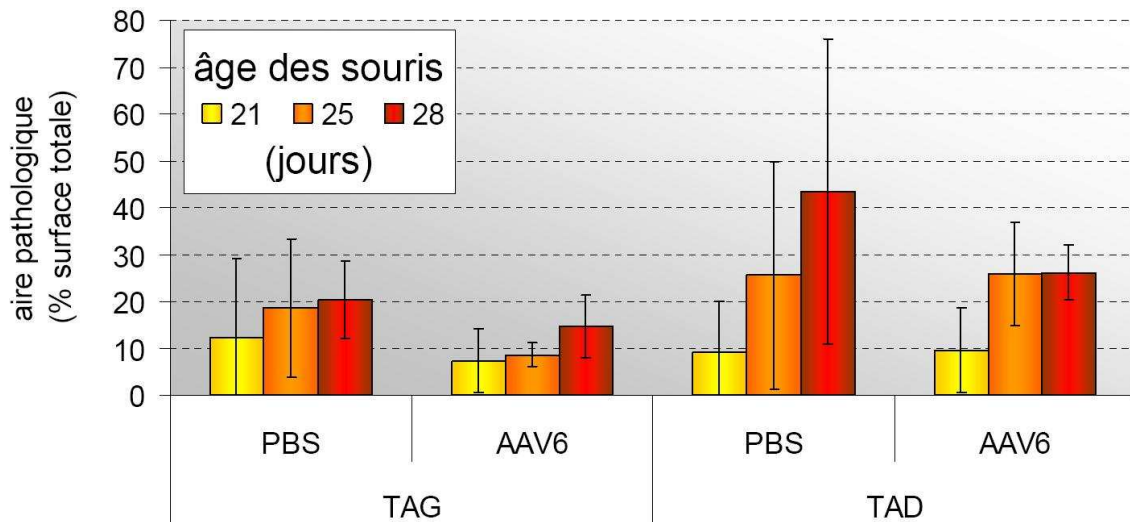
évaluer le niveau de sécrétion du mTNFR-Is/mIgG1. Un groupe contrôle de 5 souris est sacrifié à 18 jours, et trois groupes comparant souris traitées (AAV6) et placebo (PBS) sont sacrifiés à 21, 25 et 28 jours. Le TAG et le TAD sont systématiquement prélevés au sacrifice pour analyse histologique. Ce protocole mélange des souris *mdx* mâles et femelles car il est impossible d'identifier le sexe du souriceau au moment de l'injection entre 3 et 7 jours.



**Figure 105 – Expression du mTNFR-Is après une injection intramusculaire d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 chez des souris *mdx* nouveaux-nés.**

**A)** Cinétique de sécrétion du mTNFR-Is dans le sang des souris *mdx* injectées avec 2,4.10<sup>9</sup> vg d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 dans le TAG à l'âge de 3 à 7 jours. La courbe contrôle rouge correspond aux souris *mdx* injectées avec le même volume de PBS (3µl). **B)** Immunomarquage du mTNFR-Is dans les TAG injectés avec l'AAV6. Barre d'échelle : 1 mm.

L'expression du transgène obtenue chez l'ensemble des souris *mdx* nouveaux-nés injectées est indiquée dans la **figure 105** (se référer aux chiffres au-dessus des jours de sacrifice dans la **figure 104** pour connaître le nombre de souris par groupe d'âge). Au cours du protocole la concentration de mTNFR-Is/mIgG1 plasmatique augmente (**fig. 105A**), et dépasse même le plateau de sécrétion atteint chez les souris *mdx* adultes lors de l'injection IM de la dose proche de 2.10<sup>9</sup> vg. Les anticorps contre la protéine transgénique n'ont pas été analysés car aucune réponse humorale n'avait été détectée à la dose de 2.10<sup>9</sup> vg chez les adultes. De plus, l'avantage d'injecter les souris aussi jeunes est que leur système immunitaire est immature. Au niveau du muscle TAG injecté on constate une forte expression du transgène, et durant cette première semaine de nécrose on n'observe pas de perte notable de fibres transduites (**fig. 105B**).



**Figure 106 – Aire pathologique dans le muscle dystrophique des souris nouveaux-nés du protocole d’injection de l’AAV6-mTNFR-Is/mIgG1.**

L’analyse histologique des muscles injectés (TAG) et controlatéraux (TAD) confirme chez le groupe contrôle sacrifié à 18 jours l’absence de nécrose à cet âge. L’analyse morphométrique détaillée des signes cliniques entre 21 et 28 jours s’est avérée difficile. Il a été constaté que l’infiltration inflammatoire est moindre dans le TA des souris traitées (non montré). Mais il a été impossible de mesurer indépendamment les aires nécrotiques, les aires d’infiltration inflammatoire et de régénération au cours de la progression pathologique dans le TA car les 3 phénomènes se chevauchent souvent. L’aire correspondant à l’ensemble de ces signes histologiques que nous avons nommée ici « aire pathologique » a donc été mesurée relativement à la surface complète de la coupe transversale de TA (méthode p214) ; le résultat est présenté dans la **figure 106**. Aucune différence significative n’a été observée entre le TAG injecté avec du PBS et celui injecté avec l’AAV6-mTNFR-Is/mIgG1. De même aucune différence n’est visible dans le TAD controlatéral. La manipulation des souris nouveaux-nés est délicate, de plus la variabilité d’atteinte dans le TA durant le pic de nécrose est grande. En l’absence de tendances positives chez les souris traitées, il a été décidé de ne pas poursuivre ce protocole en incorporant de nouvelles souris contrôle pour compléter les groupes âgés de 25 et 28 jours comme cela était initialement prévu.



## **Conclusion et discussion**

Le TNF est surexprimé chez les patients atteints de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) [423]. Cette cytokine pro-inflammatoire potentialise l'infiltration et l'activation de cellules immunes qui participent à l'atteinte cellulaire initiant la maladie [371-373]. Des protéothérapies anti-TNF telles que l'injection régulière d'Etanercept, un récepteur soluble recombinant du TNF, permettent de réduire l'atteinte musculaire chez la souris *mdx* dystrophique [387]. Ce type de traitement ne corrige pas la fragilité du sarcolemme induite par l'absence de dystrophine, mais il pourrait retarder la progression de la faiblesse et de la dégénération des muscles, et ainsi améliorer la qualité de vie des patients en l'attente d'un traitement curatif.

Nous avons évalué la capacité du muscle dystrophique à sécréter dans le sang une protéine transgénique chimérique fusionnant le récepteur I du TNF et la partie constante d'une IgG1 (TNFR-Is/mIgG1) ; puis nous avons évalué le potentiel thérapeutique de cette approche chez la souris *mdx*.

### **Pathophysiologie relative au TNF chez la souris *mdx* :**

Le TNF circulant dans le sang de la souris *mdx* n'est pas dosable par ELISA. En revanche, il est possible de mesurer le taux des récepteurs circulants du TNF. Au cours de notre étude nous avons montré que la concentration de récepteur I endogène du TNF (mTNFR-Is) augmente dans le sang des souris *mdx* entre les âges de 6 et 10 semaines de 2,5 ng/ml à 7,8 ng/ml. Par la suite le niveau de mTNFR-Is se stabilise autour de 7 ng/ml jusqu'à l'âge de 6 mois. De plus, le niveau de mTNFR-Is circulant est significativement plus élevé chez la souris dystrophique *mdx* adulte (10 semaines) comparé à la souris saine B10 (7,8 ng/ml vs 5 ng/ml). Nous postulons donc dans le cas de la souris *mdx* que le récepteur soluble I du TNF est libéré du muscle dystrophique de manière compensatoire au fil de la progression de la maladie, ce qui explique le niveau plasmatique élevé comparé au niveau basal trouvé chez la souris saine B10.

### **Expression de la protéine transgénique hTNFR-Is/mIgG1 par le muscle dystrophique :**

L'électrotransfert du plasmide pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 permet d'obtenir l'expression du transgène hTNFR-Is/mIgG1 dans le muscle sain (souris B10) et dans le muscle dystrophique (souris *mdx*). Cependant, la présence de la protéine hTNFR-Is/mIgG1 sécrétée dans le sang est transitoire et disparaît entre 1 et 2 semaines après la transfection. En effet, la protéine transgénique hTNFR-Is/mIgG1 est immunogène chez les souris de fond génétique C57BL/10ScSn (CMH d'haplotype H-2b), et la disparition de la protéine dans le sang est corrélée à l'apparition d'une réponse anticorps.

Nous avons donc tenté de réduire la réponse immune induite contre le transgène hTNFR-Is/mIgG1 en transfectant le muscle des souris avec le plasmide pCOR-hTNFR-Is/mIgG1 dont le squelette plasmidique ne contient aucune séquence immunostimulatrice CpG hypométhylée. Cependant, aucune amélioration n'a été constatée, ce qui indique que la réponse immune contre le transgène est indépendante du caractère inflammatoire du squelette plasmidique utilisé.

Par la suite nous avons vectorisé la cassette d'expression du hTNFR-Is/mIgG1 dans un vecteur AAV6-hTNFR-Is/mIgG1. L'injection intramusculaire de ce vecteur a permis d'obtenir une sécrétion stable du hTNFR-Is/mIgG1 de l'ordre de 350 pg/ml chez les souris saines, sans réponse immune humorale contre le transgène. Ceci est possible quand le muscle est faiblement transduit en utilisant une dose de vecteur de  $5.10^8$  vg, mais au-delà de cette dose on observe une réponse immune humorale conduisant à la disparition de la protéine transgénique dans le sang. Nous avons également noté que le muscle dystrophique est moins bien transduit comparé au muscle des souris saines. De plus, la réponse immune contre le transgène est plus intense chez la souris *mdx* comparé aux souris B10, et la sécrétion de hTNFR-Is/mIgG1 est systématiquement transitoire chez la souris *mdx*. Cette observation peut être expliquée par le contexte inflammatoire du muscle dystrophique de la souris *mdx* adulte, chez qui l'on retrouve plus de cellules présentatrices d'antigènes que dans un muscle sain (macrophages résidants et cellules dendritiques) [263]. Enfin, l'analyse détaillée de la réponse immune contre le hTNFR-Is/mIgG1 a montré une réponse cellulaire cytotoxique s'installant parallèlement à la réponse humorale et participant à la destruction des fibres transduites.

### **Expression de la protéine transgénique mTNFR-Is/mIgG1 par le muscle dystrophique :**

L'expression du transgène hTNFR-Is/mIgG1 n'est donc pas une approche envisageable pour tester le potentiel thérapeutique d'une thérapie génique anti-TNF chez la souris *mdx*. Afin de baisser l'immunogénicité de la protéine transgénique nous avons produit une version murine du récepteur soluble chimérique : mTNFR-Is/mIgG1. L'expression de cette protéine chimérique murine chez la souris *mdx* s'est avérée peu immunogène. En effet, il est possible d'obtenir une sécrétion stable du mTNFR-Is/mIgG1 dans le sang de la souris *mdx* suite à la transfection du muscle dystrophique par électrotransfert du plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 ou par injection de l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1. Il se produit toujours une réponse humorale contre la protéine mTNFR-Is/mIgG1 lors de l'électrotransfert ou avec les fortes doses de vecteur AAV. Mais cette réponse anticorps est relativement plus faible que celle rencontrée contre la protéine hTNFR-Is/mIgG1. Notons également dans le cas de la protéine mTNFR-Is/mIgG1 que les sécrétions obtenues peuvent être jusqu'à 1200 fois plus élevées chez les souris *mdx* comparé à la sécrétion du récepteur chimérique humain suite à l'injection d'une même dose de vecteur AAV.

L'activité biologique du mTNFR-Is/mIgG1 présent dans le sang des souris transfectées a été testée *in vitro* pour sa capacité à inhiber la toxicité induite par le TNF sur la lignée cellulaire

L929. Il apparaît que la protéine chimérique murine produite *in vivo* est fonctionnelle et possède une activité comparable au hTNFR-Is/mIgG1. Le hTNFR-Is/mIgG1 étant notre molécule de référence dans la mesure où il a prouvé son efficacité dans un modèle murin d'arthrite induite [420] et dans un modèle d'uvéïte chez le rat [427].

De plus l'analyse de l'activité biologique anti-TNF dans des échantillons prélevés avant et après l'apparition des anticorps (IgG) contre la protéine transgénique indique que ces IgG ne sont pas neutralisantes.

### **Potentiel thérapeutique du transfert du transgène mTNFR-Is/mIgG1 chez la souris *mdx* à différents stades de la maladie :**

Le protocole d'électrotransfert de 25 µg de plasmide pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1 permet une sécrétion stable du transgène durant le protocole d'évaluation chez la majorité des souris *mdx* injectées à l'âge de 6 semaines. Il existe une certaine variabilité dans l'intensité du pic de sécrétion, mais la sécrétion se stabilise par la suite aux alentours de 50 ng/ml hormis chez 3 souris sur 14 chez qui la sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 rejoint le niveau de récepteur mTNFR-Is endogène en fin de protocole. Le dosage des IgG contre le mTNFR-Is confirme l'apparition systématique d'une réponse humorale chez les souris traitées. Notons que l'intensité de la réponse immune est d'autant plus faible que la sécrétion de protéine transgénique circulante est forte, et que l'on observe dans la majorité des cas que cette réponse IgG faiblit parallèlement à une remontée du niveau sanguin de protéine transgénique. Ces deux points suggèrent l'induction d'une tolérance vis-à-vis du mTNFR-Is/mIgG1 lors de ce protocole.

D'un point de vue fonctionnel, aucune différence significative entre la force globale des souris du groupe traité et du groupe placebo n'a été trouvée lors des différents tests d'agrippement et lors du test d'échappement en fin de protocole. En revanche, il a été constaté que les souris *mdx* traitées ne perdent pas de force au niveau des pattes antérieures durant les 2 premières semaines précédant le protocole de course sur tapis, au contraire des souris *mdx* du groupe placebo. Cet effet protecteur du traitement est intéressant car les muscles impliqués sont distants du muscle injecté situé dans la patte arrière gauche.

Lors de l'évaluation de la force *in vitro* sur muscle isolé les paramètres mécaniques des muscles EDL et du diaphragme soumis à des contractions excentriques particulièrement délétères pour le muscle dystrophique ont été mesurés. Aucune amélioration n'est observée sur ces paramètres chez les souris traitées, ce qui est attendu dans la mesure où l'inhibiteur du TNF ne corrige pas l'atteinte membranaire consécutive à l'absence de dystrophine. Les valeurs de force maximale isométrique mesurées lors d'une secousse ou d'un tétanos chez ces muscles ainsi que dans le soléaire ne sont pas non plus améliorées par le traitement. En revanche, il a été constaté que la pente de contraction de l'EDL et du diaphragme est supérieure chez les souris *mdx* traitées lors d'un tétanos.

En prenant en compte uniquement les 3 souris sur 14 ayant les plus fortes sécrétions du transgène mTNFR-Is/mIgG1 dans le groupe traité on observe également une phase de contraction significativement réduite lors d'une secousse musculaire dans l'EDL comparé aux souris placebo. De plus, la tension musculaire moyenne que le diaphragme de ces 3 souris peut développer lors d'une stimulation isométrique (secousse) est également supérieure. Il semble donc que la fonction musculaire du diaphragme est d'autant plus améliorée que le niveau de mTNFR-Is/mIgG1 sécrété est important.

L'atteinte membranaire du muscle dystrophique a été évaluée chez les souris traitées et placebo en dosant la créatine kinase musculaire (CK) relarguée dans le sang. Aucune différence significative n'a été observée lors du dosage de CK au cours du protocole entre le groupe traité et le groupe placebo. Cependant, il a été observé une tendance intéressante chez la moitié des souris du groupe traité 2 semaines après l'initiation du protocole, c'est-à-dire durant la période où nous avons constaté un effet protecteur du traitement sur la force des pattes antérieures. En effet, aucun pic de relargage de CK n'est observé à 2 semaines chez ces souris après l'exercice d'agrippement, contrairement à ce qui est observé chez l'autre moitié du groupe traité et chez toutes les souris placebo. Il est également intéressant de noter que les 3 souris ayant la plus forte sécrétion de transgène dans le sang font partie de ce sous groupe de souris traitées, et que l'on ne retrouve pas non plus d'augmentation du niveau de CK circulante chez ces 3 souris lors du protocole de course sur tapis roulant. Il semble donc que le traitement protège une partie des souris de la nécrose induite dans le muscle dystrophique lors d'exercices physiques. Ces observations renforcent l'hypothèse selon laquelle les anti-TNF favorisent la réparation du sarcolemme des fibres atteintes au détriment de la nécrose en inhibant la réponse inflammatoire.

La sécrétion de mTNFR-Is/mIgG1 dans le sang des souris *mdx* possède donc un potentiel thérapeutique en phase symptomatique. Cependant, nous n'avons pas constaté d'amélioration du profil histologique du muscle de la souris *mdx* injectée en IM avec l'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 durant l'initiation du pic de nécrose, malgré les nombreuses pistes impliquant le TNF dans l'initiation de la pathologie dystrophique.

### **Comparaison de notre étude à la littérature évaluant des anti-TNF chez la souris *mdx* :**

En ce qui concerne l'étude de la force *in vivo* nos résultats sont en accord avec la littérature. En effet, une étude de Messina et coll. montre une amélioration de 24 % de la force des pattes antérieures lors d'une stratégie pharmacologique d'inhibition du NF- $\kappa$ B avec la pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) entre les âges de 5 et 10 semaines [362]. Les auteurs observent également par western blot la baisse de la quantité de TNF présent dans le muscle. Dans notre cas, nous montrons que la stratégie du récepteur soluble permet également d'obtenir un gain fonctionnel dans les pattes antérieures en inhibant l'activité biologique du TNF en aval de sa synthèse, une même quantité de TNF étant alors dosable par ELISA dans les muscles traités ou distants. Une autre étude de Pierno et coll. montre qu'un traitement par l'inhibiteur

de TNF Etanercept durant 4 semaines à partir de l'âge 4 à 5 semaines empêche 60 % de la perte de la force des pattes antérieures induite par un protocole de course similaire au nôtre [424]. Or, nous n'observons pas de différence entre animaux traités et non traités sur ce paramètre lors de notre protocole de course. Il est possible que le niveau de transgène mTNFR-Is/mIgG1 sécrété lors du protocole d'électrotransfert soit encore inférieur à la quantité optimale présente dans le sang lors de ces protéothérapies. A ce titre l'injection du vecteur AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 en intramusculaire pourrait se révéler utile puisqu'elle permet une sécrétion finale du transgène au moins 7 fois supérieure.

Concernant le relargage de CK dans le sang des souris, Grounds et coll. montrent aussi une forte baisse du taux circulant de CK induit par un effort physique volontaire de 48 heures dans une roue chez des souris de 6 à 7 semaines suite à une unique injection d'Etanercept 24 heures avant l'exercice [387]. De même, la CK baisse jusqu'au niveau des souris n'ayant pas couru quand des souris *mdx* incluses dans un protocole d'exercice volontaire (roue) entre les âges de 4 et 12 semaines sont traitées avec un anticorps anti-TNF avant le pic de nécrose [388]. Notons également qu'à l'occasion de ce dernier protocole aucun bénéfice n'a été observé en HPS en terme de pourcentage de fibres nécrosées dans le muscle quadriceps entre souris traitées et non traitées du protocole de course volontaire. Notre protocole d'électrotransfert ajoute donc une donnée : nous montrons que la baisse de la perméabilité membranaire avec un traitement anti-TNF peut être obtenue sur une période d'exercice de plusieurs semaines chez les souris traitées ayant les plus forts niveaux d'expression, et ceci en intervenant en phase symptomatique (traitement à l'âge de 6 semaines après initiation du pic de nécrose).

Nos résultats sur la perméabilité membranaire par dosage de CK peuvent paraître contradictoires avec l'absence de différence entre souris traitées et non traitées lors de la révélation du bleu Evans dans les muscles en fin de protocole. Le fait qu'aucune différence morphologique ne soit visible en bleu Evans ou sur les colorations HPS alors que nous observons une protection contre le relargage de CK induit par l'exercice pourrait signifier que la membrane d'un certain nombre de fibres perméables au bleu Evans ou d'aspect nécrotique serait finalement réparée. Nous dosons la CK 24 heures après la course, cette hypothèse cadre donc bien avec le temps de la réparation membranaire qui est identique entre les fibres musculaires saines ou dystrophiques, et qui commence dès 12 heures et est terminée 24 heures après les dommages [428, 429]. Notons d'ailleurs que le niveau de CK circulant final n'est pas amélioré chez les souris traitées car le dernier prélèvement de sang est effectué 24 heures après une course sur tapis, mais aussi quelques dizaines de minutes seulement après les exercices physiques du test d'agrippement et d'échappement. L'hypothèse concernant la réparation membranaire favorisée par le traitement anti-TNF pourrait ainsi être vérifiée en prélevant les muscles plus de 2 jours après le dernier exercice afin de visualiser uniquement les fibres parties en nécrose, les fibres réparées étant alors majoritairement redevenues négatives pour le bleu Evans [430].

Grounds et coll. notent un délai dans l'apparition de la nécrose et de la régénération entre 21 et 28 jours lors du traitement des souris *mdx* avant et pendant le pic de nécrose avec l'anti-

TNF Remicade [386]. Nous ne retrouvons pas ces améliorations morphologiques malgré l'utilisation de l'AAV, ce qui pourrait signifier que le seuil thérapeutique d'expression de notre transgène est supérieur durant la vague initiale de nécrose et pourrait nécessiter de multiples injections.

Enfin, notons que nous montrons pour la première fois une amélioration de la fonction du diaphragme avec un anti-TNF, ce qui est encourageant dans la mesure où ce muscle vital reproduit correctement la pathologie humaine chez la souris *mdx*. Une étude a montré que le traitement anti-TNF Enbrel induit la baisse des niveaux d'ARNm du TGF- $\beta$ 1 et du collagène de type I dans le diaphragme de souris *mdx* de 6 semaines [431]. L'effet que nous observons pourrait donc être lié à l'implication du TNF dans la fibrose de ce muscle.

### **Avantages de l'approche de thérapie génique anti-TNF :**

L'administration de corticostéroïdes comme la Prednisone et le Deflazacort est actuellement le seul traitement ayant montré une efficacité chez les enfants atteints de DMD en ralentissant la progression de la pathologie [376]. Cependant le mécanisme par lequel les corticostéroïdes agissent chez DMD n'est pas clairement défini, ces molécules ayant un spectre large d'action. Les protéothérapies anti-TNF, et maintenant la thérapie génique anti-TNF, ont montré leur potentiel thérapeutique chez le modèle *mdx* en limitant l'action à l'inhibition d'une cytokine précise.

Contrairement aux protéothérapies, la thérapie génique ne nécessite pas une ré-administration régulière. D'un point de vue pharmacocinétique on s'affranchit également des fortes variations sanguines de la concentration en protéine thérapeutique en sécrétant un niveau stable et constant de protéine transgénique.

Enfin concernant le potentiel thérapeutique des anti-TNF pour DMD, rappelons que la souris *mdx* n'est pas un modèle parfait. En effet, la souris *mdx* présente parmi ses atteintes primaires une hypertrophie, tout comme les garçons atteints de DMD, mais contrairement à eux elle ne subit pas une atteinte secondaire atrophique. Or le TNF est impliqué dans le catabolisme protéique musculaire médié par la voie ubiquitine-protéasome [432], un point qui pourrait participer à l'atrophie musculaire chez les patients DMD. Ainsi le potentiel protecteur des anti-TNF contre l'atrophie musculaire ne peut être testé chez la souris *mdx*, mais pourrait l'être chez le chien GRMD par exemple qui modélise bien cette atteinte.

### **Impact de la réponse anticorps contre la protéine transgénique :**

Dans les cas où la protéine thérapeutique est sécrétée, la réponse anticorps contre la protéine transgénique peut limiter l'efficacité du traitement. Une disparition de la protéine dans le sang a par exemple été constatée suite à la transduction du muscle par des vecteurs AAV codant le

facteur de coagulation IX (FIX) pour traiter l'hémophilie B [265] ou encore avec l' $\alpha_1$ -antitrypsine [266].

Nous avons rencontré ce type de réponse dans le cas du transgène d'origine partiellement humain hTNFR-Is/mIgG1 exprimé chez la souris. Dans le cas de la protéine chimérique murine mTNFR-Is/mIgG1 nous avons constaté une réponse IgG beaucoup moins prononcée. De fait, on observe de légères décroissances du taux sanguin de protéine transgénique lors du protocole d'électrotransfert, et la sécrétion consécutive à l'injection d'AAV6-mTNFR-Is/mIgG1 ne provoque une réponse immune qu'aux plus fortes doses de vecteur. De plus, la réponse IgG ne neutralise pas l'activité du mTNFR-Is/mIgG1 sécrété, et on retrouve la protéine dans des muscles distants du TAG transfecté. Enfin, les bénéfices fonctionnels trouvés lors du protocole d'électrotransfert concernent également des muscles distants du TAG injecté tels que le diaphragme ou les pattes antérieures, ce qui suggère bien que la réponse immune n'affecte pas l'efficacité systémique du traitement.

### **Le muscle dystrophique en tant qu'organe exocrine sécréteur de protéine transgénique :**

Le muscle est un tissu accessible et permissif au transfert de gène par vectorisation virale ou non virale. Cet organe essentiellement post-mitotique permet l'expression à long terme de protéines transgéniques biologiquement actives qui ne sont normalement pas synthétisées par ce tissu, tel que le facteur de coagulation IX [264, 265], l' $\alpha_1$ -antitrypsine [266], l'érythropoïétine [278] et l'interleukine 10 [433, 434]. De plus, la grande vascularisation du muscle permet un transport efficace pour la sécrétion de la protéine transgénique dans le sang. Néanmoins, le transfert de gène dans le muscle dystrophique est plus difficile que dans le muscle sain du fait du contexte inflammatoire et du processus constant de nécrose et de régénération. L'injection locale limite la dissémination du vecteur, mais d'un point de vue réglementaire cet argument ne peut être repris au profit du vecteur AAV dans le cas de l'administration intramusculaire, d'autant plus pour le muscle dystrophique qui est davantage « perméable » à ce vecteur.

Au cours de nos travaux nous avons montré que le muscle dystrophique est capable de sécréter la protéine transgénique faiblement immunogène mTNFR-Is/mIgG1, et que celle-ci est biologiquement active et confère un gain fonctionnel aux muscles de la souris *mdx*. Cependant ce transgène ne conférant aucun avantage sélectif direct aux fibres musculaires, on observe à long terme (plusieurs mois) la perte progressive des fibres transfectées/transduites avec les cycles de nécrose et de régénération.

### **Intérêt des thérapies géniques combinées :**

L'évaluation à long terme du potentiel thérapeutique du mTNFR-Is/mIgG1 chez la souris *mdx* pourrait donc nécessiter une réadministration. Une alternative serait également d'administrer en parallèle un second traitement conférant un avantage sélectif aux fibres transduites. Cela pourrait être obtenu par différentes approches telles que : une thérapie génique permettant

l'expression de dystrophine, de mini- ou micro-dystrophine [202] ; la surexpression d'utrophine par approche pharmacologique [435, 436] ou par thérapie génique [437] ; une approche antisens pour réaliser du saut d'exon au niveau de l'ARN pré-messager de la dystrophine en administrant des oligonucléotides ou un AAV [438] ; ou encore l'utilisation de molécules comme le PTC124® permettant d'effectuer de la translecture\* des codons stop prématurés [439].

Abmayr et coll. ont par exemple montré que le niveau d'ARNm du transgène et le niveau de génomes viraux décroît dans le muscle de la souris *mdx* injectée par l'AAV6-mIGF-1, à moins de co-administrer un second AAV6 codant une microdystrophine permettant la stabilisation du cycle de nécrose/régénération des fibres musculaires [202].

Notons que les thérapies géniques utilisant les mini- et micro-dystrophines permettent une correction substantielle du sarcolemme visible au niveau morphologique (protection contre la perméabilité au bleu Evans) et une normalisation du phénotype (centronucléation réduite) chez les souris *mdx* traitées de manière précoce. Mais les propriétés contractiles du muscle – notamment lors de l'exercice excentrique – ne sont pas complètement restaurées [208].

En plus de la possibilité d'étude à long terme, les approches combinées pourraient également additionner les bénéfices thérapeutiques. Ainsi, l'approche basée sur la co-administration d'AAV6 codant l'IGF-1 et une microdystrophine cumule les avantages de chaque approche individuelle en conférant au muscle une protection contre les dommages induits par contraction excentrique, et également un gain de masse musculaire et de force [202].

---

\* Le codon stop n'est pas lu comme tel et le processus de traduction continue, la traduction de l'ARNm est donc ininterrompue et se fait au-delà du codon stop



## **Partie III - Matériels et méthodes**

## 1. Biologie moléculaire

### 1.1. Plasmides et clonages

Les plasmides pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 et pCOR-hTNFR-Is/mIgG1 (obtenus du Dr Pascal Bigey, ENSCP Paris) ont été créés par sous-clonage de l'insert codant la protéine de fusion associant le récepteur soluble de type I du TNF humain au fragment constant de l'IgG1 murine (hTNFR-Is/mIgG1) dans les plasmides pCOR et pVAX2 [440]. L'insert codant le hTNFR-Is/mIgG1 a été obtenu par clonage et fusion des ADNc du hTNFR-Is et du mIgG1 par PCR à travers le site de fusion de l'hexapeptide sensible à la thrombine selon la méthode décrite par Peppel et coll. [418]. Le plasmide vide pCOR est un vecteur de clonage de la société Aventis-Gencell. Le pVAX2 est un vecteur de clonage issu du vecteur commercial pVAX1 (Invitrogen), dans lequel le promoteur a été remplacé par celui du plasmide pCMV $\beta$  (Clontech).

Le gène du TNFR-Is murin (mTNFR-Is) a été cloné comme suit : les ARN totaux ont été extraits du cerveau de souris C57Bl6 en utilisant la méthode Trizol (Gibco BRL). Puis une réaction de transcription inverse a été réalisée avec l'enzyme Superscript II (Invitrogen) et l'amorce suivante : 5'-TTAGGCAGTACCTGAGTCCTGGG (basée sur la séquence Genbank X57796 du récepteur murin TNFR1). Le produit a été amplifié par une réaction PCR standard (Accuzyme enzyme, Abcys) en utilisant les amorces suivantes contenant les sites de restriction des enzymes BspE1 et BamH1 : amorce amont 5' – CGCTCCGGAGCCACCATGGGTCTCCCCACCGTGCCTG et amorce aval 5' - TCAGGATCCACGCGGAACCAGGGCAGTACCTGAGTCCTGGGGGTT. Le produit PCR a ensuite été sous-cloné dans pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1 à la place du hTNFR-Is en utilisant les enzymes BspE1 et BamH1.

Les inserts hTNFR-Is/mIgG1 et mTNFR-Is/mIgG1 ont été excisés par des enzymes de restriction depuis les plasmides pVAX2 correspondants et clonés dans le plasmide pGG2, entre les ITR2 et en aval du promoteur CMV, pour créer les plasmides AAV pGG2-hTNFR-Is/mIgG1 et pGG2-mTNFR-Is/mIgG1.

L'ensemble des plasmides que nous venons de décrire possède le signal de polyadénylation du SV40. Une fois construits, ces plasmides ont été contrôlés par digestion enzymatique puis validés par un séquençage réalisé par le service de Généthon selon la méthode de Sanger.

L'ensemble des plasmides produits ou utilisés est décrit dans le **tableau 5** ci-après :

plasmide	taille (pb)	promoteur	gène d'intérêt	utilisation
pVAX2-hTNFR-Is/mIgG1	4272	CMV	hTNFR-Is/mIgG1	transfert de gène
pCOR-hTNFR-Is/mIgG1	3406	CMV	hTNFR-Is/mIgG1	
pVAX2-mTNFR-Is/mIgG1	4214	CMV	mTNFR-Is/mIgG1	
pSUB(ITR)LacZ	8435	CMV	LacZ (ITR2)	production AAV
pGG2-mSeap	6375	CMV	mSeAP (ITR2)	
pGG2-MCK-mSeAP	7573	MCK	mSeAP (ITR2)	
pGG2-Luc	7279	CMV	luciférase (ITR2)	
pGG2-hTNFR-Is/mIgG1	6804	CMV	hTNFR-Is/mIgG1 (ITR2)	
pGG2-mTNFR-Is/mIgG1	6776	CMV	mTNFR-Is/mIgG1 (ITR2)	
pLTRCO2	7026		<i>rep2</i> et <i>cap</i> sérotype 1	
pRepCap4	7142		<i>rep2</i> et <i>cap</i> sérotype 2	
pAAV5	7425		<i>rep2</i> et <i>cap</i> sérotype 5	
pLTRCO6	7030		<i>rep2</i> et <i>cap</i> sérotype 6	
pAAV2-9	7327		<i>rep2</i> et <i>cap</i> sérotype 9	
pXX6	18727		gènes adénoviraux helper	
pGG2-Titin	5605	CMV	exon 362 de la titine (mex5) et ITR2	

**Tableau 5 – Plasmides.**

Les plasmides ont été produits par transformation et culture de bactéries chimiocompétentes One Shot E. Coli TOP 10 (Invitrogen) et purifiés à l'aide du kit Midi-Prep (Qiagen). Les plasmides destinés à l'injection *in vivo* ont tous été purifiés en condition exempte d'endotoxine à l'aide du kit « EndoFree Plasmid Mega kit » (Qiagen) en utilisant le protocole du fournisseur.

## 1.2. Quantification de génomes viraux dans les organes par PCR en temps réel

Les organes à analyser (~25 mg) étaient broyés avec le système FastPrep-24 (MP Biomedicals) dans 800 µl de tampon « Nuclei Lysis solution » (Promega). 100 µl étaient congelés à -20°C pour un dosage ultérieur de la mSeAP, et les 700 µl de lysats restant étaient utilisés pour une extraction d'ADN génomique à l'aide du kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) selon le protocole du fournisseur. La concentration totale d'ADN obtenu était déterminée par mesure de l'absorbance à 260 nm à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop ND-8000 (Nanodrop Technologies). L'ADN génomique extrait est alors utilisé comme matrice lors d'une réaction de PCR quantitative. La PCR quantitative (QPCR) était réalisée en utilisant des sondes de chimie Taqman en amplifiant sur chaque échantillon d'ADN génomique un amplicon du promoteur CMV pour déterminer le nombre de génomes viraux, et un amplicon du gène de la titine pour normaliser le titrage par le nombre de génomes diploïdes.

Le **tableau 6** suivant présente les sondes Taqman et amorces utilisées :

		séquence
<b>CMV</b>	<b>amorce amont</b>	5'-CATCAATGGGCGTGGATAGC-3'
	<b>amorce aval</b>	5'-GGAGTTGTTACGACATTTTGGAAA-3'
	<b>sonde Taqman</b>	5'-ATTTCCAAGTCTCCACCC-3'
<b>Titin</b>	<b>amorce amont</b>	5'-AAAACGAGCAGTGACGTGAGC-3'
	<b>amorce aval</b>	5'-TTCAGTCATGCTGCTAGCGC-3'
	<b>sonde Taqman</b>	5'-TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC-3'

**Tableau 6 – Sondes et amorces de QPCR**

La réaction de PCR était réalisée sur 70 ng d'ADN génomique dilués dans du milieu QPCR ROX Mix (Thermo Fischer scientifique), avec 0,1 µM de sonde Taqman, et 0,2 µM des amorces (amont et aval) dans un volume final de 18 µl. La PCR était réalisée sur un thermocycleur 7900 HT (Applied Biosystem) en utilisant les conditions suivantes : une phase d'activation de la Taq ADN polymérase à 95°C durant 15 minutes, suivie de 40 cycles comprenant une étape de dénaturation de 15 secondes à 95°C et une élongation de 1 minute à 60°C. Chaque plaque 96 puits de QPCR comprenait une gamme du plasmide standard pGG2-Titin dilué en série, contenant la séquence du promoteur CMV et l'exon 362 du gène de la titine. Les réactions étaient réalisées en duplicat sur chaque échantillon, et le résultat était exprimé en copies de génomes viraux par génome diploïde (vg/noyau).

Le statut sanitaire des animaux de l'animalerie de Généthon et du fournisseur Charles Rivers est « Exempt d'Organisme Pathogène Spécifique », les souris sont donc seronégatives pour le cytomégalovirus (CMV). L'amplification par PCR du promoteur CMV permet ainsi de suivre uniquement l'infection expérimentale de vecteur AAV sans faux positifs.

## 2. Production et purification des vecteurs AAV

### 2.1. Production des vecteurs

La production des vecteurs AAV est réalisée par transfection transitoire de cellules HEK-293 (ATCC : CRL-1573) avec les plasmides suivants :

- le plasmide pXX6 permettant l'apport en trans des protéines adénovirales nécessaires à la réplication de l'AAV. La production est donc réalisée dans un système exempt d'adénovirus.
- le plasmide vecteur contenant la cassette d'intérêt encadrée d'ITR (Internal terminal repeat) de serotype 2 (par exemple pGG2).
- et un des plasmides helper suivants : pLT-RCO2, pRepCap4, pAAV5, pLT-RCO6 ou pAAV2-9 codant respectivement pour les protéines de la capsid AAV de sérotype 1, 2, 5, 6 et 9.

Hormis l'AAV2, les autres vecteurs sont donc pseudotypés du fait de l'encapsulation d'un génome viral recombinant dérivé du sérotype 2 dans une capsidite du sérotype voulu. Les vecteurs AAV pseudotypés 2/1, 2/5, 2/6 ou 2/9 seront par la suite nommés AAV1, AAV5, AAV6 et AAV9, respectivement.

La transfection est effectuée en boîtes de culture de 175 cm<sup>2</sup>. La culture cellulaire est effectuée dans un incubateur thermostaté à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité contenant 5 % de CO<sub>2</sub>, et toute la procédure décrite ci-après est rapportée à une boîte de culture.

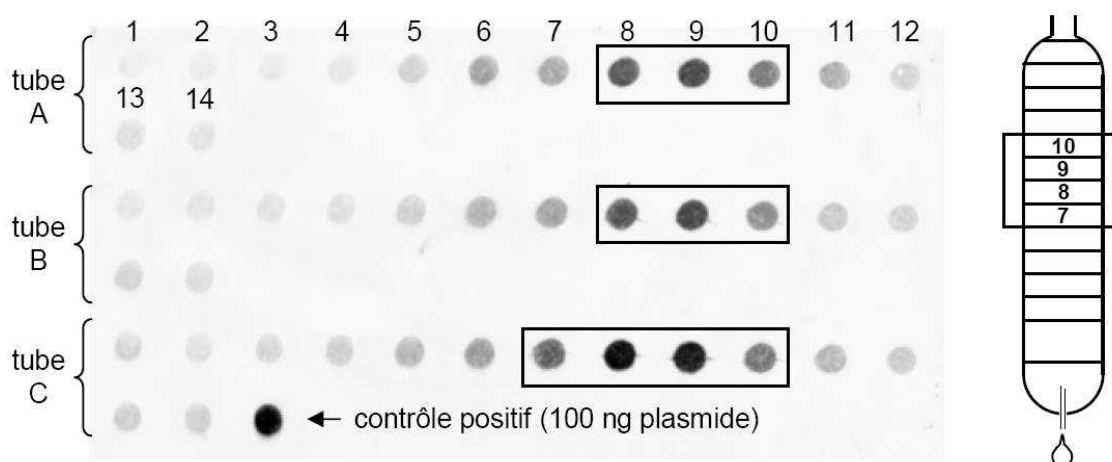
Des complexes transfectants sont générés dans 2 ml final de NaCl 150 mM par incubation à température ambiante durant 20 minutes de 28,125 µg de polyéthylèneimine branchée (PEI 25 kDa; Sigma) avec 50 µg de mélange des 3 plasmides décrits précédemment selon les proportions suivantes : 25 µg de pXX6, 12,5 µg de plasmide helper et 12,5 µg de plasmide vecteur.

Les cellules sont cultivées dans le milieu suivant : DMEM 4,5 g/l de glucose, Glutamax-1 1 mM, sérum de veau foetal (SVF) 10 %, pyruvate de sodium 1 mM, pénicilline 50 U/ml, streptomycine 50 µg/ml. Les cellules sontensemencées à 5.10<sup>6</sup> par boîte 3 jours avant la transfection. Le milieu de transfection déposé sur les cellules est un milieu de culture appauvri en sérum (1% SVF) contenant 1/7<sup>ème</sup> de complexes transfectants (v/v) ; 14 ml sont distribués par boîte. Après 6 h d'incubation du milieu de transfection sur les cellules le taux de glucose du milieu est baissé à 2,5 g/l et la concentration de SVF est montée à 5 % par ajout de 12 ml de milieu à 1 g/l glucose et 10 % de SVF par boîte. Les cellules sont alors cultivées dans ces conditions durant 72 h, au-delà desquelles elles sont récoltées par grattage, culottées par centrifugation à 700 g durant 10 minutes et resuspendues dans 1 ml de tampon de lyse (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM). Cette suspension est lysée par 4 cycles de congélation/décongélation afin de libérer le vecteur qui est essentiellement cytoplasmique.

## **2.2. Purification des vecteurs AAV**

Le lysat brut obtenu est centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes à 4°C pour séparer les débris cellulaires (culot) du surnageant contenant le vecteur. Celui-ci est traité par 25 U/ml de benzonase durant 30 minutes à 37°C afin de digérer les acides nucléiques contaminants, puis le lysat est centrifugé à 10 000 g pendant 20 minutes à 4°C afin de culotter les débris cellulaires restants. Le vecteur présent dans le surnageant est alors précipité par ajout d'un volume équivalent de sulfate d'ammonium saturé froid à 1 M et pH 7, et incubé une heure sur glace avant de procéder à une centrifugation de 12 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot d'AAV est resuspendu dans du PBS contenant des ions calcium et magnésium (CaCl<sub>2</sub> 0,9 M et MgCl<sub>2</sub> 0,5 M).

Les AAV sont alors purifiés par une première ultracentrifugation en gradient discontinu de chlorure de césium (CsCl), et un réfractomètre est utilisé pour collecter les fractions ayant une densité comprise entre 1,368 et 1,376. Une seconde ultracentrifugation isopycnique des fractions sélectionnées est alors réalisée en CsCl. Des aliquots des différentes fractions de gradient récoltées sont traités à la soude NaOH/EDTA (0,4N/10mM) 5 minutes à 95°C ce qui libère les génomes viraux des capsides ; un dot blot est alors réalisé avec une sonde froide spécifique du génome viral afin de sélectionner les fractions les plus riches en vecteur (*fig. 107*).



**Figure 107 – Dot blot.**

14 fractions sont récoltées dans les tubes A, B et C (ici une tri-transfection de 120 boîtes) à l'aide d'une aiguille insérée à la base du tube. La sonde marquée par la phosphatase alcaline (kit AlkPhos, Amersham) permet une révélation chimioluminescente dont l'intensité est déterminée pour chaque fraction du dot blot à l'aide d'un scanner Storm 840 (Molecular Dynamics) et du logiciel ImageQuantTL. Seules les fractions ayant une intensité  $\geq$  au tiers de l'intensité maximale trouvée dans chaque tube sont sélectionnées (ici 10 fractions de 500  $\mu$ l encadrées). Les tubes A, B et C correspondant ici tous à une production d'AAV2-CMV-mSeAP, les fractions les plus riches en vecteur seront donc dialysées ensemble (5 ml).

La purification est finalisée par une dialyse des fractions les plus riches en vecteur contre du PBS contenant du  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  dans une cassette possédant une membrane à limite d'exclusion de 10 kDa (4 bains successifs de 2 heures et un bain de 12 heures).

La production de vecteur AAV est titrée par PCR quantitative en temps réel (décrit ci-après) et la concentration obtenue est exprimée en génomes viraux par millilitre (vg/ml).

On obtient au final environ 3 ml de vecteur AAV pour 60 boîtes transfectées. Les titres obtenus varient en fonction de la taille du génome viral encapsidé et du sérotype de la capside.

Voici un tableau résumant les titres moyens de tous les lots de vecteur AAV produits pour cette thèse :

Vecteur	titre moyen (vg/ml)
AAV1-CMV-mSeAP	1,57.10 <sup>12</sup>
AAV1-CMV-Luc	1,60.10 <sup>12</sup>
AAV2-CMV-mSeAP	6,20.10 <sup>11</sup>
AAV2-MCK-mSeAP	3,00.10 <sup>11</sup>
AAV2-CMV-LacZ	4,54.10 <sup>11</sup>
AAV2-CMV-Luc	5,00.10 <sup>11</sup>
AAV5-CMV-mSeAP	2,00.10 <sup>11</sup>
AAV6-CMV-mSeAP	1,79.10 <sup>12</sup>
AAV6-CMV-Luc	2,36.10 <sup>11</sup>
AAV6-hTNFR-Is/mIgG1	1,00.10 <sup>12</sup>
AAV6-mTNFR-Is/mIgG1	8,11.10 <sup>11</sup>
AAV9-CMV-mSeAP	9,82.10 <sup>11</sup>
AAV9-CMV-Luc	8,37.10 <sup>11</sup>

**Tableau 7 – Titre des vecteurs AAV.**

### 2.3. Titrage de la production de vecteur AAV

Les génomes viraux sont extraits sur 5 µl de la production de vecteur AAV à l'aide du kit « High Pure Viral Nucleic Acid » (Roche) selon le protocole du fournisseur (destruction des capsides à l'aide de protéinase K après une étape de digestion des ADN contaminants par la DNaseI, et purification finale sur colonne de silice). Les génomes viraux purifiés sont alors dilués en série (en duplicat) et soumis à une réaction de PCR quantitative utilisant la sonde Taqman et les amorces CMV selon le protocole décrit précédemment p189. Une gamme de plasmide pGG2-Titin interne à la plaque PCR et soumise au même protocole PCR est utilisée pour titrer la production AAV en génomes viraux par millilitre (vg/ml).

Dans le cas de la production d'AAV2-MCK-mSeAP, la QPCR a été effectuée dans les mêmes conditions, à l'exception d'une température d'élongation de 54°C, en utilisant la sonde de chimie Taqman-MGB et les amorces suivantes spécifiques de l'ITR2 :

<b>ITR2</b>	<b>amorce amont</b>	5'-CTCCATCACTAGGGGTTCCTTG-3'
	<b>amorce aval</b>	5'-GTAGATAAGTAGCATGGC-3'
	<b>sonde</b>	5'-TAGTTAATGATTAACCC-3'

### 3. Expérimentation animale

#### 3.1. Souris

Les souris Balb/C proviennent du fournisseur Charles Rivers, et aucune expérimentation n'était effectuée avant une période d'acclimatation minimale d'une semaine à l'animalerie de Généthon. Les souris *mdx* (C57BL/10ScSn-*DmD*<sup>mdx</sup>/J) et B10 (C57BL/10ScSn/J) proviennent des colonies entretenues à Généthon. Toutes les souris provenant de Charles Rivers ou de Généthon sont élevées dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (ou EOPS pour Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques), et elles ont accès à volonté à la nourriture et à l'eau. Les souris B10 sont sevrées à 3 semaines, et les souris *mdx* à 4 semaines. Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec les règles européennes d'éthique concernant l'utilisation des animaux pour la recherche expérimentale.

#### 3.2. Anesthésie

Les souris sevrées étaient anesthésiées avant chaque injection intramusculaire et avant chaque prélèvement de sang par une injection intrapéritonéale d'un mélange de Kétamine à 100 mg/kg et de Xylazine à 1 mg/kg (0,1 ml/10 g).

#### 3.3. Injections

##### **- Intramusculaire :**

Un prélèvement de sang contrôle (J0) est effectué sur la souris anesthésiée avant l'injection. Puis l'injection intramusculaire est réalisée sur l'animal anesthésié longitudinalement au niveau du muscle tibial antérieur gauche (TAG) dans un volume final de 25 à 35  $\mu$ l (AAV ou plasmide) selon le protocole en utilisant une seringue hamilton équipée d'une aiguille de 27G (27 mm). Dans le cas des souris nouveaux-nés aucun prélèvement sanguin n'est effectué avant l'injection. L'injection d'un volume de 3  $\mu$ l d'AAV est effectuée dans le TAG du souriceau vigile à l'aide d'une seringue hamilton de 10  $\mu$ l graduée chaque 0,1 $\mu$ l et équipée d'une aiguille de 30G (10 mm).

##### **- Sous-cutanée :**

La souris vigile est plaquée contre une surface plane avec une manœuvre de contention qui l'immobilise tout en pinçant la peau de la nuque entre pouce et index (côté dorsal). Une seringue à insuline (29G) est utilisée pour injecter 450  $\mu$ l de vecteur AAV au niveau du pli de peau formé au niveau du cou. Le volume de liquide injecté dans le tissu conjonctif, qui forme une bulle sous le derme, est résorbé après 15 minutes par le drainage lymphatique. 35 jours



après l'injection les souris sont sacrifiées par surdosage anesthésique (trois fois la dose utilisée pour l'anesthésie), et un carré de tissu comprenant la peau, l'hypoderme et le panniculus carnosus est prélevé au niveau du point d'injection, puis roulé pour son inclusion histologique dans la gomme et sa congélation dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide.

#### **- Intraveineuse :**

Le prélèvement de sang contrôle (« J0 ») est réalisé la veille des expériences impliquant une injection intraveineuse (IV). Le jour de l'injection les souris sont placées sous une lampe chauffante avec accès à la boisson, puis elles sont placées dans un cylindre de contention et l'injection est réalisée dans la veine caudale à l'aide d'une seringue à insuline (29G). Le vecteur AAV injecté en IV est dilué dans un volume final de 450 µl de PBS contenant du Ca<sup>2+</sup> et Mg<sup>2+</sup>. Dans le cas des expériences utilisant un adjuvant, un volume d'adjuvant de 200 µl est injecté dans la veine caudale 3 à 5 minutes avant le vecteur AAV à la veine caudale (ou après un délai plus long lors de l'étude de l'impact de ce facteur).

### **3.4. Adjuvant et produits injectés**

La liste des produits injectés lors des protocoles expérimentaux ainsi que leur modalité d'utilisation est décrite ci-après par ordre alphabétique (hors vecteurs et anesthésiques) :

#### **- Acide polyinosinique (pI) :**

**Référence :** Sigma P4154. **Solution mère :** dissout à 3,33 µg/µl dans de l'eau pour injection (stérile et sans endotoxines). **Utilisation :** dilué dans une solution de glucose 5 % final et administré par voie IV caudale dans un volume de 200 µl.

#### **- Bleu Evans :**

**Référence :** Sigma E2129. **Solution mère :** 10 µg/µl en NaCl 150 mM. **Utilisation :** La veille du sacrifice les souris sont injectées avec un volume de 100 µl/10g d'une dilution au 1/20<sup>ème</sup> de la solution mère en intrapéritonéale (soit 5 mg/kg) à l'aide d'une seringue de 1 ml équipée d'une aiguille de 27G.

#### **- EDTA :**

**Référence :** Sigma E7889. **Solution mère :** solution de sel disodique à 0,5 M. **Utilisation :** en nous basant sur la littérature, la dose d'EDTA a été fixée à 40 mg/kg soit 800 mg pour une souris de 20 g. Le protocole d'injection consiste en l'injection IV de 100 µl/20g d'une solution de 20 mM (8 mg/ml). L'injection rapide d'EDTA pouvant causer une hypocalcémie aiguë, la tétanie voire même une arythmie cardiaque, nous avons donc procédé à une perfusion lente sur 10 minutes avec un pousse-seringue. Mais cela a été abandonné en raison de la lourdeur de la procédure, et en raison d'un effet irritant systématique et de la mort d'une

des 3 souris test. Le protocole finalement adopté est l'injection IV caudale lente à la main de cette même dose diluée au tiers dans une solution de NaCl physiologique. Cela correspondait donc à l'injection de 300 µl par souris d'une solution de 7 mM d'EDTA, qui est toujours légèrement irritante mais parfaitement tolérée. La demi-vie d'élimination de l'EDTA injecté en IV étant de 20 à 60 minutes, le vecteur AAV était injecté 30 minutes après l'administration d'EDTA.

**- Facteur de venin de cobra :**

**Référence :** Quidel A600. **Solution mère :** 91 U/ml dans PBS. **Utilisation :** quantité de CVF voulue diluée dans du PBS pour un volume final de 200 µl et injecté en intrapéritonéale.

**- Méthylprednisolone :**

**Référence :** Solu-médrol (Pfizer). **Solution mère :** 20 µg/µl. **Utilisation :** préparée extemporanément dans une solution de glucose 5 %. Injection en IV à la veine caudale de 10 µl/g d'une solution à 200 µg/ml (soit 2 mg/kg) 4 heures avant injection de l'AAV, puis 24 et 48 heures après.

**- Poly-L-arginine (pR) :**

**Référence :** Sigma P4663. **Solution mère :** dissout à 10 µg/µl dans de l'eau pour injection (stérile et sans endotoxines). **Utilisation :** cf. acide polyinosinique.

**- Poly-L-lysine (pK) :**

**Référence :** Sigma P0879, P6516, P7890, P2636. **Solution mère :** dissout à 25 µg/µl dans de l'eau pour injection (stérile et sans endotoxines). **Utilisation :** cf. acide polyinosinique.

**- Sulfate de dextran :**

**Référence :** Sigma 31395 (500 KDa). **Solution mère :** dissout dans de l'eau pour injection à 2 µg/µl. **Utilisation :** utilisé en co-administration IM à 10 µg/ml avec le vecteur AAV dans une solution de glucose 5 % (dose la plus efficace constaté *in vivo* par Yeung et coll. avec le vecteur HSV [93]). Administration IV : cf. acide polyinosinique.

**- Warfarine :**

**Référence :** Sigma A2250. **Utilisation :** préparation extemporanée à 665 µg/ml dans de l'huile d'arachide (Sigma P2144), et injection sous-cutanée de 200 µl (soit 133 µg) à J-3 et J-1 avant l'injection IV du vecteur AAV.

### 3.5. Electrotransfert *in vivo*

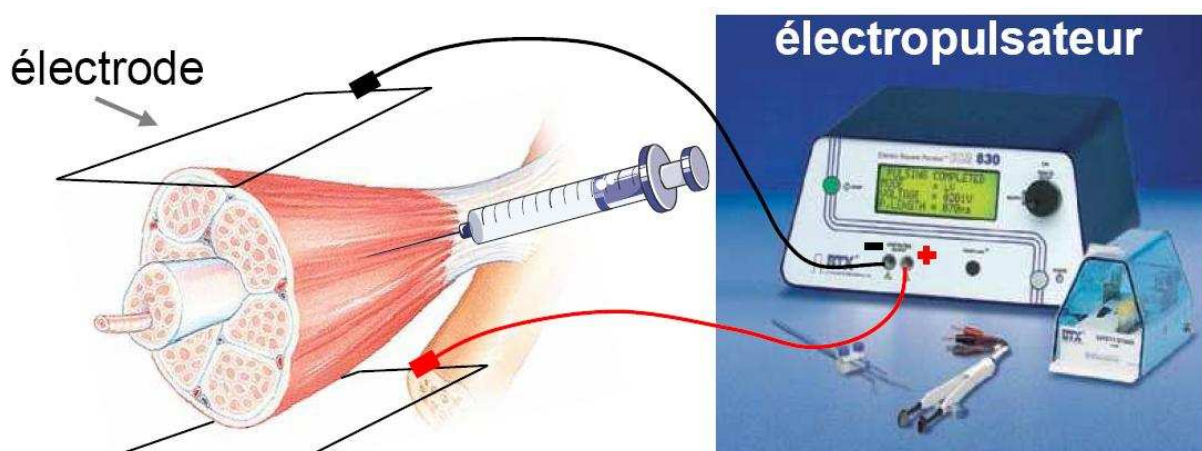


Figure 108 – Schéma de l'électrotransfert.

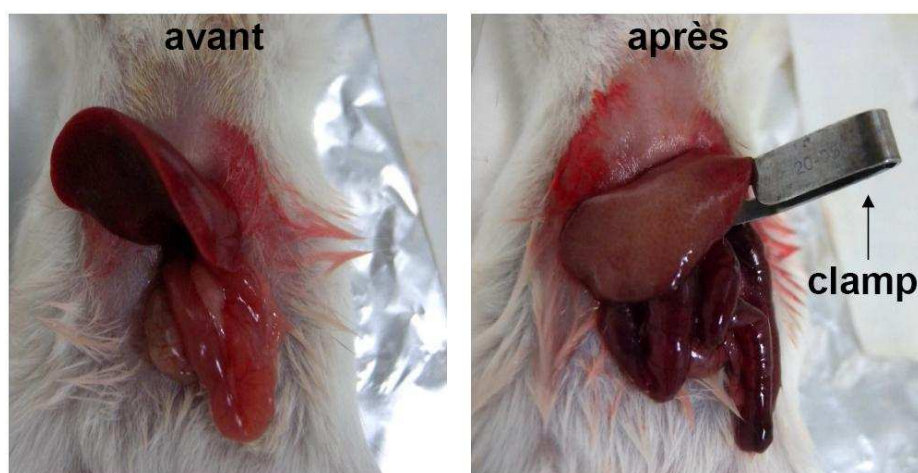
Les souris sont endormies (anesthésiées), puis un prélèvement de sang J0 est effectué au sinus. La patte postérieure est ensuite rasée au niveau du muscle injecté (TAG) à l'aide d'une tondeuse. Un volume de 35  $\mu$ l de plasmide en solution de NaCl 150 mM est alors injecté longitudinalement dans le TAG à l'aide d'une seringue hamilton (27G). La patte injectée est ensuite recouverte par un gel de conduction (MI3.G250.US, Comepa Solutions) et, dans la minute suivant l'injection, des impulsions électriques unipolaires carrées sont délivrées par un électropulsateur ECM 830 (BTX) à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable placées de chaque côté de la patte (champ électrique perpendiculaire aux faisceaux de fibres). Une vis en téflon permet d'ajuster l'écart entre les électrodes par rapport à la taille de la patte de l'animal, et l'intensité du champ électrique appliqué est calculée en fonction de l'écartement des électrodes afin d'obtenir une valeur effective de 200 V/cm. Tous les électrotransferts sont effectués en délivrant 8 impulsions d'une durée de 20 ms, à la fréquence de 2 Hz, et d'une intensité effective de 200 V/cm [268]. Ces conditions permettent d'obtenir un taux élevé d'expression du transgène tout en minimisant les dommages tissulaires. En effet, le voltage optimal pour transférer le muscle sain est, entre nos mains, de 250V/cm dans le TAG, mais nous avons jugé que cela n'est pas applicable au muscle dystrophique, cette condition potentialisant notamment la réponse immune.

L'injection d'ADN nu a été réalisée de la même manière que le protocole décrit ci-dessus mais sans l'électrotransfert.

### 3.6. Shunt hépatique

Le shunt hépatique est une procédure chirurgicale qui a été effectuée par le personnel habilité du service « bioexpérimentation » du laboratoire Généthon. Les souris sont injectées avec un analogue morphinique en sous-cutanée au niveau du cou (Temgesic®, Buprénorphine 0,075

mg/kg) puis immédiatement anesthésiées à l'isoflurane (l'analgésique agit environ 20 minutes après injection). Le ventre est alors rasé et désinfecté, avant de procéder à la laparotomie à l'aide d'un scalpel. Le foie et les intestins sont partiellement exteriorisés afin d'accéder à la veine et à l'artère hépatique accolées au canal biliaire. L'ensemble est alors clampé à l'aide d'une pince. L'intraveineuse de 450  $\mu$ l de solution de vecteur AAV (en PBS contenant  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) est alors immédiatement réalisée au sinus avec une seringue à insuline (29G). Le shunt du foie est maintenu durant 15 minutes avant d'enlever le clamp ; durant toute la procédure la souris est sous une lampe chauffante et les viscères sont régulièrement hydratés avec une solution physiologique chauffée à 37°C. Les viscères sont ensuite réintroduits dans la cavité abdominale, et la paroi musculaire et la peau sont alors suturées respectivement avec du fil résorbable et du fil non résorbable. La suture est nettoyée à la betadine puis la souris est laissée sur plaque chauffante le temps du réveil. A noter que l'on ajoute un antibiotique dans l'eau de boisson pendant la semaine qui suit l'opération (Marbocyl ®, Marbofloxacin 4 mg/kg/jour).



**Figure 109 – Shunt hépatique.**

Ces photographies présentent la mise au point de la méthode de shunt hépatique. A gauche, on voit un lobe du foie correctement irrigué et les intestins avant la pose du clamp. A droite, on constate une décoloration du foie et une stase du sang dans les intestins consécutive à l'arrêt de la circulation portale 15 minutes après la pose du clamp.

### 3.7. Mise à jeûn

Les souris sont privées de nourriture (mais elle conservent l'accès à l'eau de boisson) la veille jusqu'aux injections intraveineuses qui ont lieu le lendemain matin. La perte de masse moyenne chez les souris Balb/c âgées de 9 semaines après 18 heures de jeûne est de 11 %.

### **3.8. Sacrifices et prélèvements**

#### **a) Prélèvement de sang**

Le sang est prélevé au sinus rétro-orbitaire à l'aide d'un capillaire hépariné sur la souris anesthésiée. Le plasma est collecté après une étape de centrifugation de 15 minutes à 3000 g et 4°C, puis conservé à -20°C en attendant l'analyse. Dans le cas des protocoles impliquant un prélèvement chaque semaine, une alternance est réalisée entre le prélèvement au sinus droit et le prélèvement au sinus gauche des souris.

#### **b) Prélèvement et préparation des organes**

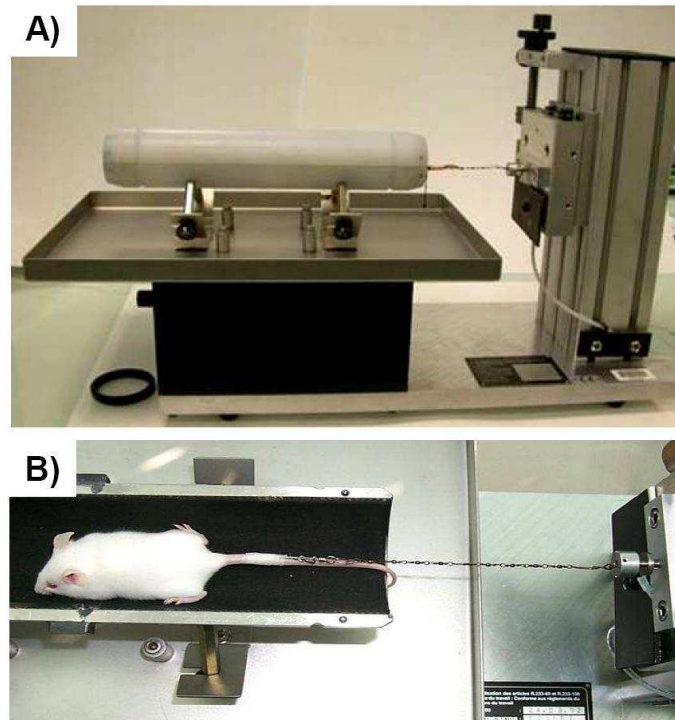
Toutes les souris étaient sacrifiées par élongation cervicale sauf en cas d'injection sous-cutanée. Les prélèvements ont été recueillis immédiatement après le sacrifice. Si les prélèvements sont destinés à une analyse biochimique ou au dosage par QPCR, ils sont directement congelés dans de l'azote liquide dans des tubes eppendorf 1,5 ml individuels, puis conservés à -80°C en attendant d'être analysés. Dans les cas où une analyse histologique est prévue, les prélèvements sont montés sur des bouchons de liège surplombés de gomme tragacanth (Sigma), puis congelés dans de l'isopentane refroidi à l'azote liquide. Une fois les tissus congelés, les prélèvements sont placés à -80°C en vue d'une coupe au cryostat.

### **3.9. Évaluation fonctionnelle**

#### **a) Étude *in vivo***

##### - Test d'échappement :

**A)** L'animal est placé dans un tube de 30 cm de long. Sa queue est reliée à un capteur de force. En réponse à un pincement de l'extrémité de la queue, la souris tente de s'échapper et tire sur le capteur. Cette opération est recommencée à intervalles réguliers avec au minimum 10 mesures sur un temps maximal de 3 minutes. Les cinq pics de plus grande amplitude, quantifiant la force globale développée par l'animal, sont moyennés et normalisés par rapport au poids de chaque souris. Le test d'échappement ne peut être réalisé qu'une seule fois (les souris comprennent et ne réagissent pas de la même façon au pincement de la queue), il est donc effectué en fin de protocole d'évaluation fonctionnelle.

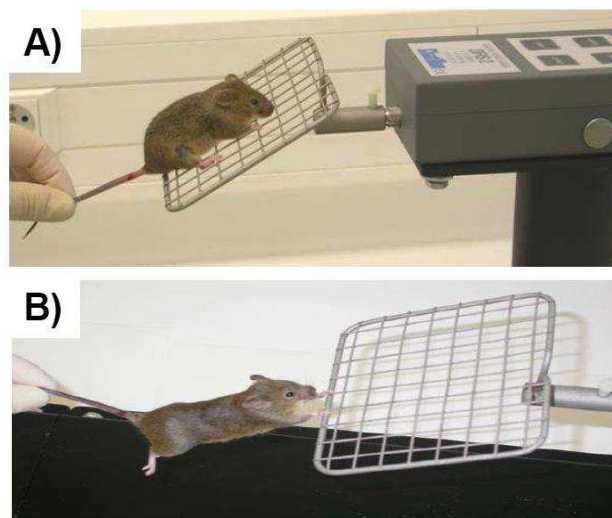


**Figure 110 – Test d'échappement.**

A) Dispositif expérimental. B) La souris, placée dans le tube, est reliée au capteur de force.

- Test d'agrippement :

Une autre méthode permettant l'évaluation de la force musculaire des souris est le test d'agrippement. Ces mesures sont répétables et sont effectuées à divers moments clés des protocoles d'évaluation. L'animal est placé sur une grille reliée à un capteur de force. L'opérateur exerce une tension sur la souris qui s'agrippe et tire alors sur le capteur. La force développée est normalisée par rapport au poids de l'animal et peut illustrer soit la force globale (quand les 4 pattes sont sur la grille) soit la force des seules pattes avant.

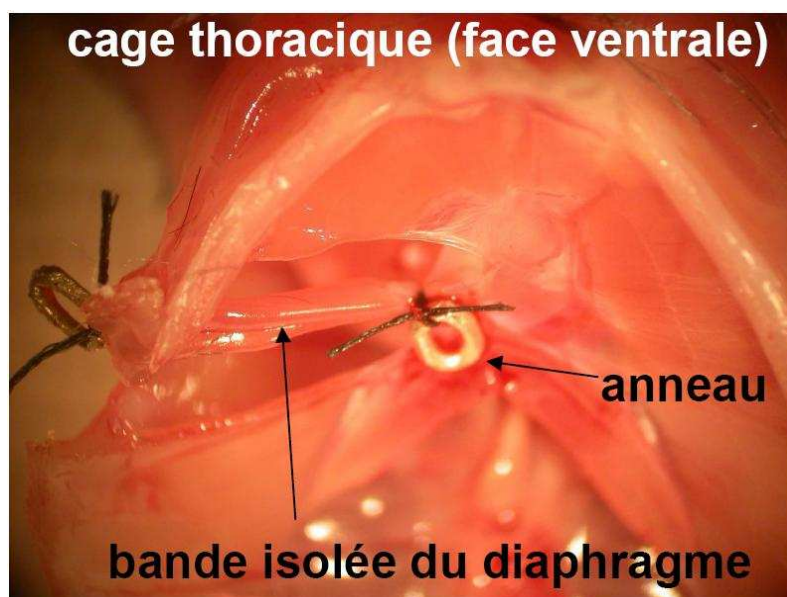


**Figure 111 – Test d'agrippement.**

Ce test évalue la résistance de l'animal à la traction. A) Force globale. B) Force des pattes antérieures.

## b) Étude *in vitro*

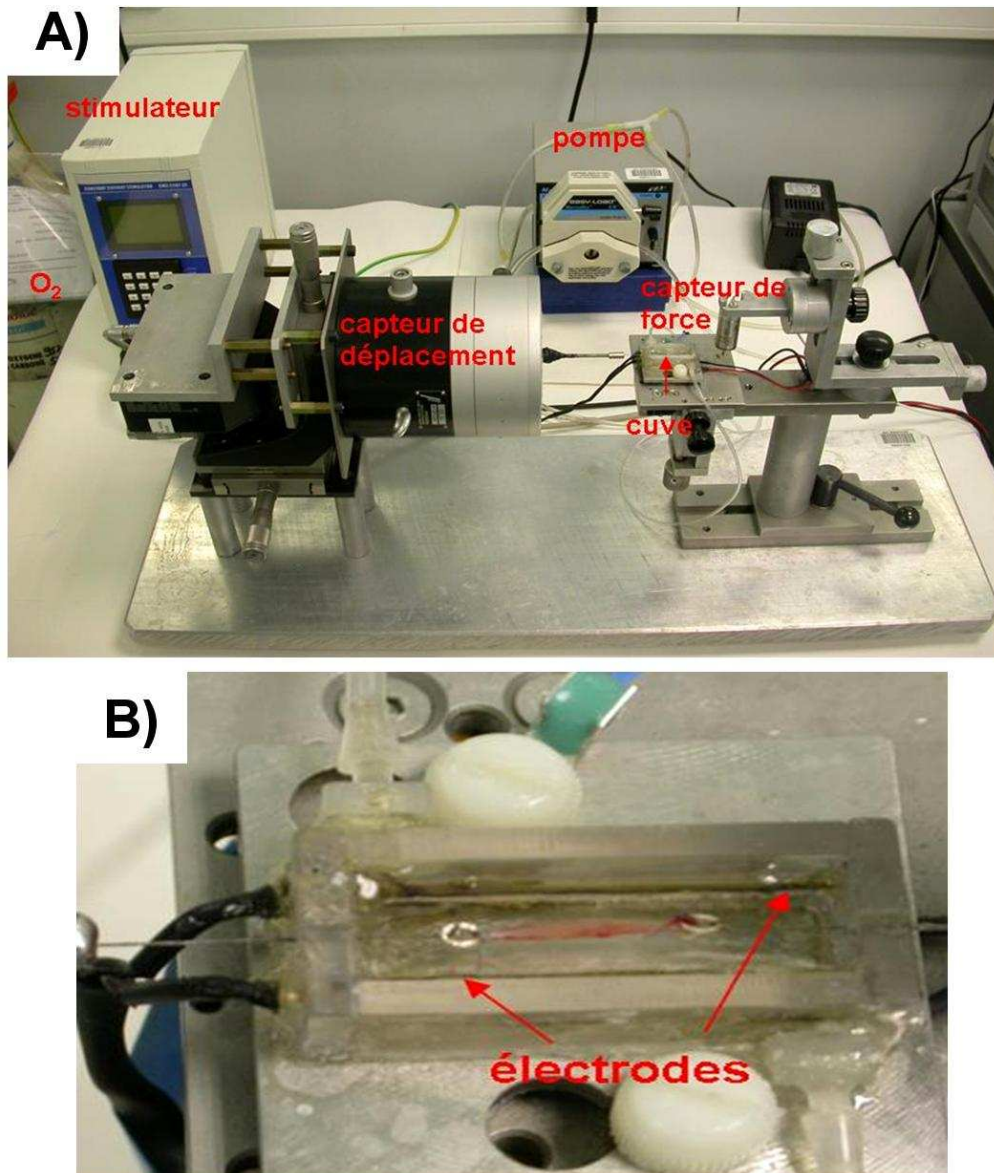
La propriété contractile du muscle de la souris *mdx* a également été évaluée « *in vitro* » sur muscles isolés en mesurant différents paramètres lors de stimulations électriques. Ces mesures de mécanique musculaire ont été réalisées sur les muscles EDL (Extensor Digitorum Longus), sur le soléaire (Sol), ainsi que sur le diaphragme. L'individualisation des tendons à chaque extrémité de l'EDL et du Sol permet un isolement complet et sans lésion du muscle. L'enregistrement du diaphragme est effectué sur une bande isolée du muscle prélevée à la localisation présentée dans la **figure 112** ci-après.



**Figure 112 – Bande isolée du diaphragme pour évaluation fonctionnelle *in vitro*.**

Cette photographie montre la découpe de la bande de diaphragme aux extrémités de laquelle des anneaux sont attachés pour réaliser les mesures de tension musculaire dans le dispositif expérimental.

La stimulation nerveuse de ces muscles est artificiellement reproduite par une stimulation électrique. Celle-ci agit sur les terminaisons nerveuses motrices du muscle et sur les fibres musculaires directement. La contraction musculaire résulte de raccourcissements des myofibrilles qui composent les fibres. Le raccourcissement de la fibre se répercute sur la matrice extracellulaire jusqu'aux tendons. De plus, des forces externes s'exerçant sur le muscle contribuent au changement ou non de sa longueur. On distingue ainsi trois types de contractions : (i) contraction isométrique qui se produit quand le muscle engendre une tension sans changer de longueur, (ii) une contraction isotonique produite quand le muscle se raccourcit et déplace une charge, (iii) une contraction excentrique produite quand la charge externe exercée sur le muscle est supérieure à la tension musculaire, ce qui provoque l'allongement du muscle au cours de la période d'activité contractile.



**Figure 113 – Dispositif expérimental de mesure des propriétés mécaniques du muscle isolé.**

A) Dispositif expérimental. Le dispositif expérimental comprend un stimulateur électrique, un capteur de force, un capteur de déplacement (ou pot vibrant), un circuit d'asservissement permettant de maintenir la longueur du muscle constante lors de la stimulation, une pompe permettant de faire circuler une solution physiologique oxygénée à température constante et un dispositif d'enregistrement. B) Le muscle est placé dans la cuve et relié au capteur de force et au pot vibrant. Il est stimulé électriquement à l'aide d'électrodes situées le long de la cuve, parallèlement au muscle.

Le dispositif expérimental du laboratoire Généthon permet d'étudier différents paramètres musculaires. Il permet non seulement de réaliser des contractions isométriques mais aussi de faire subir au muscle un allongement ou un raccourcissement lors de sa stimulation. Nous avons réalisé trois types de contractions *in vitro* et mesuré différents paramètres décrits ci-après :



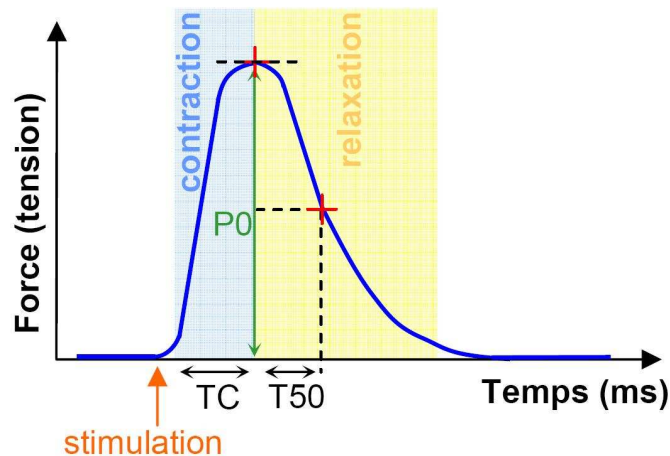
- La secousse :

Figure 114 – Secousse musculaire.

Le nombre de fibres musculaires parallèles et leur diamètre déterminent la force maximale que le muscle peut développer. Cette force est mesurée suite à l'application d'un stimulus électrique unique qui produit une « secousse musculaire ». La *figure 114* présente les 2 phases de la secousse : la phase de contraction et la phase de relaxation. La secousse est caractérisée par la durée de sa phase de contraction (TC), son amplitude maximale développée (P0) et par son temps de relâchement nécessaire pour obtenir une chute de tension de 50 % (T50). Différentes secousses musculaires sont effectuées pour déterminer la longueur optimale  $L_0$ . La longueur optimale ( $L_0$ ) est la longueur pour laquelle le muscle développe la plus grande force lors d'une contraction isométrique (en l'absence de toute contrainte externe). Ce paramètre important, mesuré pour chaque muscle testé, nous permettra de normaliser les forces mesurées.  $L_0$  doit également être connue pour effectuer des contractions excentriques comme nous le verrons plus loin.

Les paramètres TC et T50 sont donnés en millisecondes. La force P0 (exprimée en milli-Newton) est traduite en tension P0 N (force normalisée par unité de surface exprimée en  $mN/mm^2$ ) en prenant en compte différents paramètres du muscle (longueur de fibres, densité et poids du muscle) selon la formule suivante :

$$P0\ N = (P0 \times A \times 1,06 \times L_0) / \text{masse du muscle}$$

Où A est un facteur sans échelle correspondant à la longueur des fibres dans un muscle donné. La littérature indique que A est égal à 0,48 pour l'EDL et à 0,68 pour un Sol. Le diaphragme n'étant pas décrit, son facteur A est arbitrairement fixé à 1. Le facteur 1,06 correspond à la densité du muscle en  $mg/mm^3$ , et  $L_0$  est la longueur optimale du muscle.

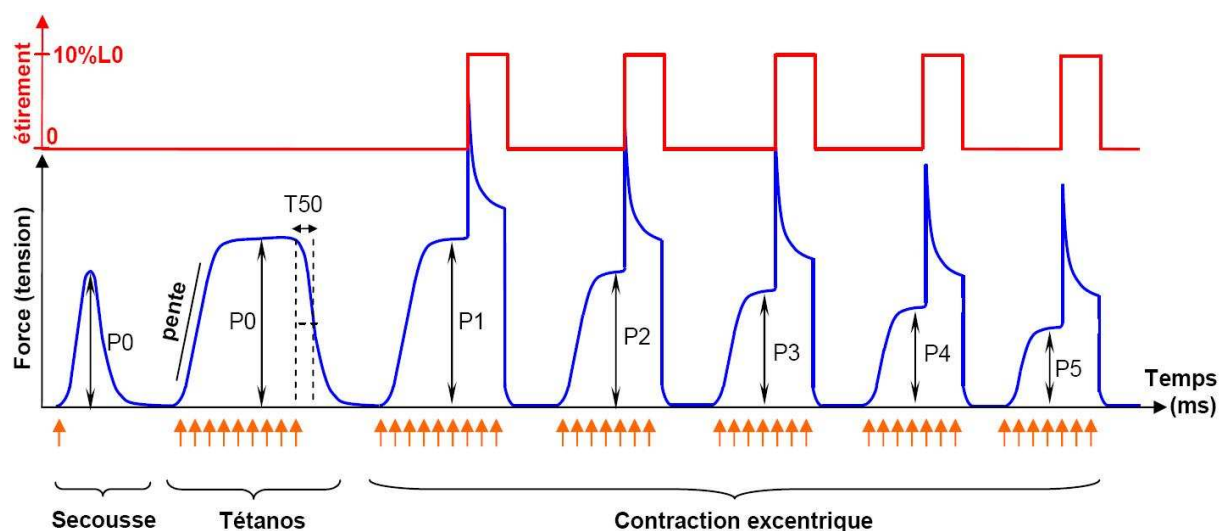


Figure 115 – Myogramme des tests *in vitro* sur muscle isolé.

### - Le tétanos :

Pour obtenir un tétanos la fréquence des stimulations électriques est augmentée ce qui permet d'aboutir à une sommation et une fusion des secousses. Si la fréquence est assez grande, le plateau est rectiligne et le tétanos est dit parfait (ou fusionné). Le myogramme obtenu présente alors une allure de plateau comme on peut le voir dans la *figure 115*. Chaque muscle est stimulé à sa longueur optimale. Tout comme la secousse, le tétanos est caractérisé par son amplitude maximale développée ( $P_0$ ) et son temps de relâchement nécessaire pour obtenir une chute de force de 50 % ( $T_{50}$ ).  $P_0$  sera traduit en tension ( $P_0$  N), et la pente de contraction sera également mesurée (en mN/ms).

### - Contraction excentrique :

Les contractions excentriques se retrouvent en situation physiologique par exemple dans le cas de la descente d'un escalier où le muscle activé est étiré par un groupe de muscles antagonistes également activés mais développant une force supérieure.

*In vitro*, la contraction excentrique est reproduite en appliquant un étirement de 10 % de sa longueur optimale  $L_0$  sur un muscle en contraction. Le muscle est soumis à 5 contractions excentriques successives espacées de 3 minutes. Cela produit une chute progressive de la force isométrique (avant étirement) qui peut être quantifiée en exprimant sa chute relative entre la première ( $F_1$ ) et la cinquième ( $F_5$ ) contraction excentrique (voir *fig. 115*). Cette mesure n'est pas effectuée sur le muscle soléaire, les muscles lents étant insensibles à l'exercice excentrique. La chute de force peut être observée dans un muscle rapide comme l'EDL, elle est  $\leq$  à 20 % dans le cas du muscle sain de la souris C57BL/10ScSn. Le muscle dystrophique est particulièrement sensible à l'exercice excentrique : on observe une chute de force supérieure chez la souris *mdx* qui est directement corrélée à la déficience de la membrane musculaire.

## 4. Dosages et mesure d'activité biologique

### 4.1. Dosage de la mSeAP

L'activité enzymatique de la mSeAP dans un plasma, un milieu conditionné ou un lysat tissulaire est quantifiée par une réaction chimioluminescente. Les échantillons sont dilués dans le **tampon de dilution** (à partir de 1/4 pour un plasma déterminé de manière empirique), puis les phosphatases alcalines endogènes sont inactivées par une incubation à 65°C pendant 5 minutes pour un plasma ou pendant 30 minutes pour un milieu conditionné ou un lysat tissulaire. L'activité de la mSeAP thermorésistante est alors quantifiée sur un luminomètre (Perkin Elmer, Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel counter) en plaque blanche 96 puits (50 µl de la dilution de l'échantillon) après l'ajout du **tampon réactionnel** (50 µl) et du substrat CSPD (50 µl, kit Phosphalight, Applied Biosystems). La concentration des échantillons est exprimée en ng/ml à l'aide d'une gamme étalon de phosphatase alcaline placentale humaine purifiée (kit Phosphalight).

Les lysats tissulaires étaient préparés comme décrit p188, puis 1,7 µl de cocktail inhibiteur de protéase (Complete Mini, Roche) étaient ajoutés par 100 µl de lysat. Le dosage de la mSeAP tissulaire était réalisé, puis normalisé par un dosage protéique de chaque échantillon en utilisant le kit NanoOrange (Invitrogen).

#### Tampons :

- **Tampon de dilution** : Tris-HCl 0,05 M ; NaCl 150 mM ; pH 7,4.
- **Tampon réactionnel** : diéthanolamine 2M ; MgCl<sub>2</sub> 2 mM ; L-homoarginine 20 mM.

### 4.2. Titration des anticorps neutralisant le vecteur AAV

La veille de la titration, des plaques de culture de 48 puits sontensemencées avec  $5.10^4$  cellules Hela par puits et cultivées à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub> durant 24 heures. Le jour du test les échantillons de plasma sont décomplémentés à 56°C durant 30 minutes. Les plasmas décomplémentés sont alors dilués 10 fois, puis 2 fois en série avant d'être incubés 1 heure à 37°C avec un volume équivalent de vecteur AAV-Luc du sérotype testé dilué dans du DMEM supplémenté de 10 % de SVF ; soit une dilution finale des plasmas allant de 1/20 à 1/12800. Ces milieux contenant  $5.10^3$  vg/cellule sont alors ajoutés dans un milieu de culture frais sur les cellules Hela (DMEM, 10 % SVF) et incubés à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>. Chaque condition est réalisée en duplicat. Après 48 heures les cellules sont lavées au PBS puis elles sont lysées et l'activité luciférase est déterminée selon le protocole décrit plus loin. L'activité luciférase obtenue (exprimée en RLU/10sec/mg protéine) est utilisée pour calculer le pourcentage d'inhibition de transduction de chaque plasma relativement à l'efficacité de transduction maximale correspondant à l'AAV-Luc incubé avec du PBS. Le titre en anticorps neutralisant est défini comme étant l'inverse de la dilution qui inhibe 50 % de la transduction maximale.

### 4.3. Dosage de l'activité luciférase

Le dosage est basé sur une réaction enzymatique chimio-luminescente de la luciférase avec son substrat conduisant à une émission de photons qui est proportionnelle à l'activité de l'enzyme. Les lysats cellulaires sont préparés en aspirant le milieu dans les plaques 48 puits de l'expérience de transduction, puis en lavant les cellules au PBS. 150 µl de **tampon de lyse** sont alors ajoutés dans chaque puits, et la plaque congelée à -80°C jusqu'à analyse. Le jour du dosage la plaque est décongelée et les cellules encore adhérentes sont grattées. Le dosage est réalisé dans une plaque 96 puits blanche opaque dans laquelle sont déposés un aliquot de 10 µl de chaque lysat cellulaire préalablement centrifugé durant 3 minutes à 4°C et 15 000 g afin de sédimenter les débris cellulaires. L'activité luciférase est mesurée par un luminomètre (VICTOR<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter, PerkinElmer life sciences) traitant de manière automatisée et séquentielle chaque puits en ajoutant 50 µl de **tampon essai** optimisant la réaction enzymatique, puis 50 µl de substrat de la firefly luciférase (luciférine). La mesure de l'émission de photons (RLU) se fait sur 10 secondes. Les mesures sont normalisées par un dosage protéique de chaque échantillon par la méthode de Bradford et exprimées en RLU/10sec/mg protéine.

#### Tampons :

- **Tampon d'essai** : 25 mM Tris-phosphate, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT (dithiothreitol), 1 mM EDTA, 15 % Glycérol, et 2 mM d'ATP ajouté extemporanément le jour du test.
- **Tampon de lyse** : tampon d'essai sans ATP supplémenté de détergent Triton X-100 à 1 %.

### 4.4. Mesure d'activité du complément

Il s'agit d'un test hémolytique mesurant indirectement l'activité du complément présent dans le plasma testé à travers sa capacité à former des complexes d'attaque membranaire sur des globules rouges sensibilisés, le relargage d'hémoglobine est alors mesuré par spectrophotométrie.

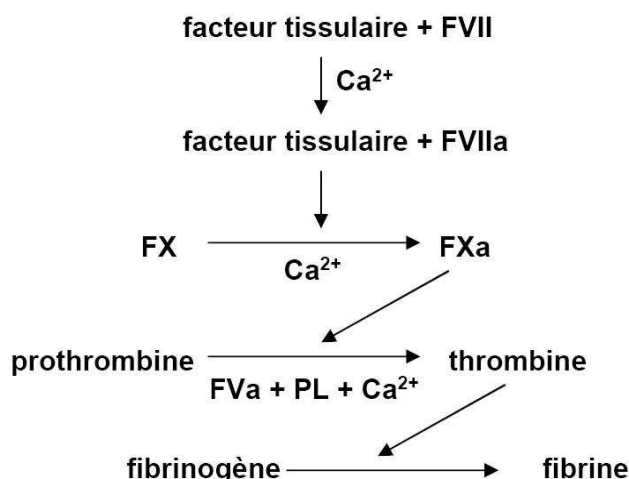
Dans un premier temps, des globules rouges de moutons sont lavés 3 fois par des centrifugations de 5 minutes à 1000 g et 4°C suivies de resuspension du culot de globules rouges dans 3 volumes de solution de Alsever (Sigma). Une solution de  $1.10^9$  globules rouges/ml est alors préparée en resuspendant les globules rouges dans du **tampon HBS** suite à une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 1000 g et 4°C. Cette solution mère est sensibilisée par une hémolysine (antisérum contre hématie de mouton, Sigma S 1389) à 1/50 durant 30 minutes à température ambiante. Parallèlement, les plasmas à tester sont dilués au 1/5<sup>ème</sup> dans du **tampon HBS** puis dilués en série au demi jusqu'à 1/5120<sup>ème</sup>. Un contrôle négatif (**tampon HBS** seul) et un contrôle positif de lyse sont également préparés (20 µl de **tampon HBS** contenant 1 % triton X-100). Les dilutions des plasmas et les contrôles sont déposés par 20 µl dans une plaque 96 puits à fond rond, puis 200 µl de globules rouges sensibilisés sont ajoutés

dans chaque puits et le mélange est incubé 1 heure à 37°C sous agitation de 100 rpm. Après cette incubation les globules rouges et les débris cellulaires sont sédimentés par une centrifugation de 10 minutes à 2000g. Les surnageants obtenus sont transférés dans une nouvelle plaque à fond plat qui est lue au spectrophotomètre Discovery HT-R (Bio-TEK) à 415 nm (hémoglobine) et à 750 nm (bruit de fond). La densité optique mesurée (DO 750 nm soustraite à la DO 415 nm) est proportionnelle à l'activité en complément des plasmas testés.

- **Tampon HBS** (Hepes-buffered saline) : Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,15 mM (pH 7,3 ajusté au NaOH).

#### 4.5. Mesure du temps de coagulation

Le temps de coagulation est mesuré par le test de Quick qui explore la voie dite extrinsèque de la coagulation puisqu'elle est initiée par un facteur tissulaire (thromboplastine). Cette voie fait intervenir les facteurs de coagulation VII, V, X et la prothrombine comme cela est résumé dans la *figure 116* ci-après.



**Figure 116 – Voie extrinsèque de coagulation.**

La thromboplastine ajoutée au plasma (citraté pour chélater une grande partie du calcium) se lie au facteur VII. Le complexe ainsi formé va activer le facteur X en facteur Xa. Le FXa est capable d'activer le facteur VII en FVIIa (rétro-contrôle positif), et il active la prothrombine en thrombine. L'activation de la prothrombine se fait par l'intermédiaire d'un complexe, appelé prothrombinase, comprenant le FXa, les phospholipides (PL), du calcium, ainsi que le cofacteur FV sans activité enzymatique. La thrombine générée transforme le fibrinogène en fibrine.

Le temps de Quick est le temps de coagulation à 37°C d'un plasma citraté en présence de calcium et de la thromboplastine qui est un mélange de facteur tissulaire et de phospholipides. Le prélèvement de sang est réalisé au sinus avec un capillaire sec dans un tube contenant un volume de solution de citrate de sodium à 3,8 % pour 9 volumes de sang. Les plasmas sont préparés en centrifugeant 5 minutes à 3000 g à température ambiante le sang citraté prélevé chez les souris traitées ou non par la warfarine. Le test est alors réalisé sur 100 µl de plasma à

37°C en ajoutant 200 µl d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 10 mM contenant 175 µg de thromboplastine (Sigma 44213). Le temps de Quick est déterminé à l'œil nu en observant le temps de formation du caillot de fibrine.

#### **4.6. Production de milieux conditionnés h et mTNFR-Is/mIgG1 par transfection**

Les cellules MRC5-V2 sontensemencées la veille dans une plaque de culture de 6 ss de manière à avoir des cellules adhérentes à une confluence de l'ordre de 70 à 90 % pour la transfection du lendemain. Le jour de la transfection les complexes transfectants sont préparés en incubant durant 20 minutes 12 µg de plasmide avec 48 µl de polyéthylèneimine branchée à 10 mM en amine (PEI 25 kDa; Sigma) dans un volume final de 800 µl de NaCl 150 mM à température ambiante. Le milieu de transfection final de 4 ml est préparé en ajoutant 3,2 ml de milieu DMEM sans sérum sur les 800 µl de complexes transfectants. La transfection transitoire est effectuée par ajout de 4 ml de milieu de transfection par puits sur les cellules préalablement rincées avec du PBS. Après une incubation de 3 heures, le milieu de transfection est remplacé par 4 ml de milieu de culture complet (DMEM 10 % SVF, pénicilline 50 U/ml, streptomycine 50 µg/ml). Après 30 heures d'incubation à 37°C, les milieux conditionnés sont récoltés et conservés à -80°C en attendant l'analyse (ELISA pour détecter le transgène, ou évaluation d'activité biologique de la protéine transgénique, décrits ci-après).

#### **4.7. Dosage par ELISA du hTNFR-Is, mTNFR-Is et mTNF**

Les dosages du hTNFR-Is, du mTNFR-Is et du TNF murin ont été effectués sur différents échantillons : des milieux conditionnés obtenus par transfection transitoire *in vitro*, des lysats de muscles, du plasma. Le dosage est effectué par ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay), à l'aide des kits DuoSet correspondants (R&D Systems DY225, DY425 et DY410), selon les recommandations du fabricant. La concentration des échantillons est déterminée par mesure de l'absorbance à 450 nm (système HRP/TMB) sur un spectrophotomètre Discovery HT-R (Bio-TEK) à l'aide d'une gamme étalon interne à chaque plaque 96 puits réalisée avec la protéine recombinante correspondante. Les concentrations massiques de TNFR-Is/mIgG1 sont exprimées en équivalent de monomère TNFR-Is recombinant.

Dans le cas du dosage ELISA sur des lysats tissulaires, les organes (25 mg) étaient broyés à l'aide du système FastPrep-24 (MP Biomedicals) dans un volume de 500 µl de tampon de lyse (Tris base 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, triton-X100 0,1 %). Puis le dosage ELISA était réalisé et le résultat était normalisé pour chaque échantillon par un dosage protéique réalisé selon la méthode de Bradford.

#### 4.8. Évaluation de l'activité biologique de la protéine TNFR-Is/mIgG1

L'activité biologique des TNFR-Is/mIgG1 contenus dans les milieux conditionnés de transfection *in vitro* ou dans le plasma des souris est évaluée par l'inhibition de la lyse induite par le TNF sur les cellules sensibles L929. Cette inhibition est évaluée par détermination de la viabilité des cellules L929 grâce à un dosage MTT. Les cellules L929 sont des cellules de tissu conjonctif de souris de morphologie fibroblastique (ECACC 85011425). Elles sont cultivées à 37°C dans une étuve à 5 % de CO<sub>2</sub>, dans un milieu DMEM contenant les antibiotiques pénicilline (50 U/ml) et streptomycine (50 µg/ml) ainsi que 10 % de SVF.

La veille du test 100 µl de milieu contenant 4.10<sup>4</sup> cellules L929 est ensemencé dans chaque puits de plaques de culture 96 puits. Le jour du test les échantillons (ou encore du TNFR-Is recombinant humain ; R&D Systems) sont dilués par 2 en série dans un volume final de 100 µl de milieu de culture en présence de 200 pg/ml de TNF recombinant murin (R&D Systems) et de 4 µg/mL d'actinomycine D. L'actinomycine D est un inhibiteur de la transcription qui empêche la synthèse protéique et notamment celle des protéines anti-apoptotiques induites par la voie NF-κB, ce qui potentialise la cytotoxicité du TNF. Un contrôle positif correspondant à du milieu sans TNF contenant 4 µg/mL d'actinomycine D est également préparé. Les milieux obtenus sont incubés sur les cellules L929 pendant 18 heures à 37°C avant de réaliser le test MTT.

Le test MTT est un dosage colorimétrique reposant sur la capacité des déshydrogénases mitochondriales des cellules viables à réduire le sel de tétrazolium (MTT) en formazan bleu.

Le milieu de chaque puits est remplacé par 100 µl de milieu de culture sans SVF contenant 500 µg/ml de MTT. La plaque est ensuite incubée 2 heures à 37°C, puis le milieu est aspiré et les cristaux de formazan formés sont dissouts en même temps que les cellules par l'ajout de 100 µl de DMSO dans chaque puits. Finalement l'absorbance est lue à 570 nm sur un spectrophotomètre Discovery HT-R (Bio-TEK). Le pourcentage de survie est calculé relativement aux cellules contrôle incubées avec du milieu sans TNF contenant 4 µg/mL d'actinomycine D (100 % de survie). La concentration en protéine transgénique des échantillons de milieu conditionné ou de plasma est connu avant de réaliser le test (dosage par ELISA), ce qui permet d'exprimer la survie cellulaire en fonction de la quantité de TNFR-Is/mIgG1 incubée sur les cellules L929.

#### 4.9. Analyse d'IgG par ELISA

L'analyse semi-quantitative des **IgG plasmatiques** anti mTNFR-Is ou anti hTNFR-Is est réalisée par un ELISA en sandwich. La protéine de capture hTNFR-Is recombinant ou mTNFR-Is recombinant (R&D Systems, 636-R1/CF et 425-R1/CF) est fixée au fond de la plaque de dosage (R&D Systems, DY990) par une incubation d'une nuit à température ambiante, à la concentration de 200 ng/mL dans 100 µl de PBS. La plaque est alors lavée avec

du PBS-tween (tween20 0,05 %), puis le blocage est réalisé pendant 2 heures avec 300 µl de PBS contenant 1 % d'albumine de sérum bovin (ASB) par puits. Les échantillons sont ensuite déposés en dilutions successives (200 µl final dans du PBS 1 % ASB), et incubés durant 2 heures. Un anticorps secondaire de mouton anti IgG de souris (Amersham biosciences, NA 931) couplé à la Horse Radish Peroxidase (HRP) est alors incubé deux heures à 1/5000. Après lavage, l'ajout du substrat de la peroxydase, le TMB (tétraméthylbenzidine), permet l'obtention d'une réaction colorée proportionnelle à la quantité d'IgG présente dans l'échantillon. La réaction est stoppée au bout de 20 minutes par ajout d'acide sulfurique 2N, puis la plaque est lue à 450 nm sur un spectrophotomètre Discovery HT-R (Bio-TEK).

Le TNFR-Is/mIgG1 murin étant moins immunogène que le hTNFR-Is/mIgG1, les plasmas sont dilués à 1/90 contre 1/2490 pour ce dernier.

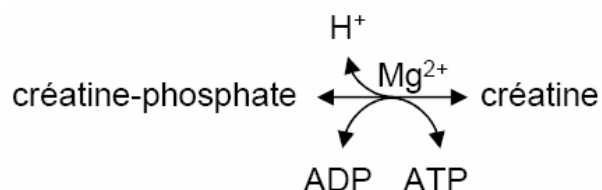
Les plasmas collectés chaque semaine chez une souris sont tous analysés sur une même plaque, et tous les plasmas d'un même protocole sont analysés parallèlement le même jour. Un plasma est considéré immunoréactif si l'absorbance obtenue après le traitement est supérieure ou égale à deux fois l'absorbance obtenue avant traitement à J0 (bruit de fond). Les plasmas immunoréactifs correspondent bien à une réponse humorale contre les transgènes TNFR-Is/mIgG1 car aucune présence d'anticorps anti hTNFR-Is n'est détectée chez les souris contrôles ; de plus, toute souris présentant une auto-immunité contre son mTNFR-Is endogène à J0 est éliminée des analyses.

L'analyse semi-quantitative des **sous classes d'IgG 2a et 2b** ainsi que des **IgG anti AAV6** est réalisée selon le même protocole à l'exception des points suivants :

- pour l'analyse des **IgG2a et 2b** les anticorps secondaires suivants sont utilisés : anticorps de chèvre anti IgG2a ou IgG2b (SouthernBiotech, 1080-05 et 1090-05) utilisés au 1/4000. Les plasmas sont dilués au 1/30 pour les IgG2a et au 1/300 pour les IgG2b.
- pour l'analyse des **IgG contre l'AAV6** :  $2.10^9$  vg d'AAV6-Luc sont adsorbés au fond de chaque puits dans du tampon carbonate à 0,1 M (pH 9,5) une nuit à 4°C dans une plaque 96 puits Maxisorp (Nunc, 442404). La dilution des plasmas est de 1/30<sup>ème</sup>.

#### 4.10. Dosage de la créatine kinase plasmatique

La créatine kinase musculaire (CK) est une enzyme principalement trouvée dans le muscle, le cœur et le cerveau. La CK libérée dans le sang après une atteinte membranaire des fibres musculaires peut être dosée en mesurant son activité enzymatique. La créatine kinase catalyse le transfert d'un radical phosphoryl de la créatine-phosphate (substrat) vers le coenzyme ADP selon la réaction réversible suivante :





L'activité de la CK est mesurée par spectrophotométrie en suivant la formation de NADPH à 340 nm lors d'une réaction couplée. Cette réaction enzymatique couplée exploite les enzymes hexokinase (HK) et glucose-6-phosphate deshydrogénase (G-6-PDH). L'hexokinase phosphoryle du D-glucose en D-glucose-6-phosphate en utilisant l'ATP produit lors de la 1<sup>ère</sup> réaction, puis la glucose-6-phosphate deshydrogénase oxyde le D-glucose-6-phosphate avec une réduction concomitante de NADP<sup>+</sup> en NADPH.

Chaque échantillon de plasma dosé est dilué au 1/10<sup>ème</sup> dans le **tampon A**, puis 15 µl sont déposés en plaque 96 puits (perméable aux UV). La réaction enzymatique est initiée par l'ajout de 200 µl de **tampon B**. L'apparition de NADPH est mesurée à 340 nm sur une cinétique de 10 minutes (1 mesure par puits par 10 secondes) avec un spectrophotomètre Discovery HT-R (Bio-TEK) thermostaté à 37°C. La vitesse initiale est mesurée pour chaque échantillon en calculant la pente de la phase stationnaire linéaire des courbes réactionnelles. La concentration de CK de l'échantillon est mesurée grâce à une courbe étalon de CK (créatine kinase musculaire de lapin, Sigma C3755) exprimant la vitesse initiale en fonction de la concentration. Les résultats sont exprimés en U/L ; une unité de créatine kinase transfère 1 mmole par minute de phosphate de la phosphocréatine vers l'ADP à 30°C et pH 7,4. Les échantillons donnant une vitesse initiale en dehors de la phase linéaire de la gamme sont dosés à nouveau à une dilution de 1/100<sup>ème</sup>.

#### Tampons (kit CK-NAC, RANDOX) :

- **Tampon A** : tampon imidazole 0,10 M pH 6,7 ; glucose 20 mM ; Mg-acétate 10 mM ; EDTA 2 mM.

- **Tampon B** (enzymes, coenzymes et substrats) : ADP 2 mM ; AMP 5 mM ; diadenosine pentaphosphate 10 µM ; NADP 2 mM ; HK ≥ 2,5 U/ml ; G-6-PDH ≥ 1,5 U/ml ; N-acétyl-L-cystéine 20 mM (réactivateur enzymatique de la créatine kinase) ; créatine phosphate 30 mM.

## 5. Histologie

### 5.1. Préparation des échantillons

À l'aide d'un cryostat (Leica CM3050, possédant une enceinte à -20°C) des coupes transversales de 8 µm d'épaisseur sont réalisées sur les muscles précédemment congelés et montés sur bouchon. Puis les coupes sont étalées sur lame et conservées à -80° en attendant l'analyse.

### 5.2. Coloration HPS

L'Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) est une coloration histopathologique de routine mettant en évidence les différentes structures tissulaires et cellulaires. L'hématoxyline (colorant basique) colore les acides nucléiques en bleu noir tandis que la phloxine (colorant

acide) colore en rouge plus ou moins intense les cytoplasmes et certaines structures extracellulaires, qui sont dits « éosinophiles ». Enfin, le safran colore les fibres conjonctives (collagène) en jaune-orangé.

Un premier bain de 3 minutes est effectué dans l'hématoxyline de Harris (Sigma), puis les lames sont lavées à l'eau puis plongées rapidement dans une solution d'alcool chlorhydrique à 0,2 % (v/v) pour éliminer l'excédent de colorant. Après un nouveau lavage à l'eau, les tissus sont bleuis dans l'eau de Scott (solution à 3,5 g/l de bicarbonate de sodium et 20 g/l de sulfate de magnésium) pendant 1 minute avant d'être de nouveau rincés à l'eau et colorés à la phloxine 1 % (Sigma) pendant 30 secondes. Après rinçage à l'eau, les coupes sont déshydratées à l'éthanol 70° pendant 1 minute, puis rincées dans l'éthanol absolu. Les tissus sont ensuite colorés au safran 1 % (v/v dans de l'éthanol absolu) pendant 3 minutes et rincés à l'éthanol absolu. Finalement, les lames sont montées en milieu *Eukitt* (Fluka) après 2 bains d'Histosol de 2 minutes.

### **5.3. Marquages histo-enzymatiques**

#### **a) Révélation de la mSeAP**

La révélation histo-enzymatique de la mSeAP est réalisée sur coupes histologiques décongelées puis fixées avec un solution de glutaraldéhyde 0,5 % (v/v) durant 10 minutes. Les coupes sont alors lavées 2 fois au PBS et les phosphatase alcalines endogènes sont inactivées par un bain de PBS chauffé à 65°C durant 30 minutes. La révélation de la mSeAP (en violet) est alors effectuée par une incubation d'une nuit dans une chambre humide à 37°C à l'aide d'une solution contenant 0,165 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP, Promega), 0,33 mg/ml de nitrobleue tetrazolium (NBT, Promega), 100 mM de Tris-HCl (pH 9,5), 100 mM de NaCl et 50 mM de MgCl<sub>2</sub>. Les lames sont alors contre-colorées avec du rouge à noyau (1,2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo(2,1-b)thiozole à 1 mM ; levamisole ; Sigma) par un traitement de 1 minute. Les lames sont finalement plongées 4 minutes dans du butanol, déshydratées par des bains d'alcool croissants suivis d'un bain de xylène, puis montées à l'Eukitt (Fluka).

#### **b) Révélation de la $\beta$ -galactosidase**

Après décongélation, les coupes transversales sont fixées pendant 10 minutes dans une solution de glutaraldéhyde 0,5 % (v/v) avant d'être rincées 3 minutes dans du PBS puis dans une solution de MgCl<sub>2</sub> 1 mM. La révélation de la  $\beta$ -galactosidase (en bleu) est ensuite réalisée en incubant les coupes dans une solution de X-Gal à 1 mg/ml (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside), K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mM, et MgCl<sub>2</sub> 1 mM dans du PBS

pendant 5 heures à 37°C. Les lames sont enfin rincées deux fois dans du PBS avant d'être contre-colorées au rouge à noyau et montées à l'Eukitt (Fluka).

## **5.4. Immunomarquages**

### **a) TNFR-Is et CD8**

Les immunomarquages du mTNFR-Is et du hTNFR-Is ont été réalisés par immunohistochimie en utilisant la révélation HRP/DAB, ou encore par immunofluorescence lors d'un co-marquage avec le CD8. Dans le cas du marquage immunoenzymatique des TNFR-Is révélés par la HRP (horse raddish peroxydase), les coupes ont été décongelées, réhydratées avec du PBS, puis les peroxydases endogènes ont été inactivées par une incubation de 20 minutes avec de l'eau oxygénée diluée. Après 2 lavages au PBS, les sites non spécifiques sont bloqués par une incubation de 30 minutes avec du PBS contenant 10 % de sérum de lapin. Les anticorps primaires suivants ont ensuite été incubés 2 heures sur les lames : anticorps polyclonal de chèvre anti-TNFR-Is humain ou murin à 1,5 µg/ml (AF225 et AF425, R&D Systems). Après un lavage au PBS un anticorps secondaire polyclonal de lapin anti-IgG de chèvre couplé à la HRP a été ajouté 1 heure à 2,5 µg/ml (P 0449, DAKO). Finalement, après de nouveaux lavages au PBS, les complexes immuns couplés à la HRP sont révélés avec le substrat diaminobenzidine (DAB ; DAKO), et les lames sont déshydratées et montées à l'eukitt (Fluka).

Dans le cas des immunomarquages en fluorescence du CD8 et du TNFR-Is humain, le même anticorps primaire que celui décrit ci-dessus est utilisé pour hTNFR-Is, mais on ajoute sur les coupes un anticorps primaire de rat anti CD8α à 5 µg/ml (clone CT-CD8a ; Caltag Laboratories). Les anticorps secondaires suivants sont ensuite utilisés : anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de chèvre couplé à l'AlexaFluor-594 à 2 µg/ml (A-11058, Invitrogen molecular probes) et un anticorps polyclonal de lapin anti-IgG de rat biotinylé utilisé à 3,85 µg/ml (P0467, DAKO) avec de la streptavidine conjuguée à l'AlexaFluor-488 à 5 µg/ml (S-11223, Invitrogen molecular probes). Du sérum de souris est utilisé au 1/50<sup>ème</sup> lors de l'incubation de l'anticorps de lapin anti-rat biotinylé afin d'éviter une cross-réactivité au niveau des IgG murines présentes dans le muscle pathologique dystrophique. Enfin, les lames sont montées en milieu Fluoromount G (0100-20, Southern BiotechVector) contenant du DAPI pour marquer les noyaux.

### **b) Myosine lente**

L'immunomarquage de la myosine lente a été réalisé par immunohistochimie en utilisant la révélation HRP/DAB selon le protocole décrit plus haut pour les TNFR-Is avec les exceptions

suivantes : le blocage est réalisé avec 10 % de sérum de souris, l'anticorps primaire utilisé est un anticorps monoclonal de souris anti-myosine lente humaine reconnaissant également la myosine lente de souris (clone NOQ7.5.4D, Sigma) incubé au 1/1000<sup>ème</sup> dans du PBS une nuit à 4°C. L'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre anti IgG de souris couplé à la HRP (EnVision K4001, Dako) incubé 30 minutes sur la lame.

### **5.5. Observation du bleu Evans**

Les coupes de muscle sont séchées puis fixées à l'acétone refroidi à -20°C pendant 10 minutes avant d'être rincées au PBS. Les lames sont ensuite montées au Vectashield/Fluoromount (Vector) puis scellées avec un vernis incolore.

## **6. Acquisition et analyse d'images de microscopie**

### **a) Acquisition**

Les photographies des colorations HPS et marquages de la mSeAP,  $\beta$ -galactosidase, et des TNFR-Is (HRP) ont été prises en transmission à l'aide d'un microscope Nikon ECLIPSE E600 équipé d'une caméra Sony 3CCD DSP et d'une plateforme motorisée. Le logiciel Cartograph (Microvision) permet de réaliser des photographies de coupes transversales complètes de muscles en assemblant automatiquement des champs de microscopie non chevauchants pris avec un objectif 4X.

Les photographies de microscopie en fluorescence révélant le bleu Evans sur coupes entières ont été obtenues en utilisant un microscope à fluorescence inversé LEICA DM IRBE équipé d'une platine motorisée et d'une caméra couleur à une longueur d'onde d'excitation de 633 nm avec un objectif 10X. Le logiciel Cartograph (Microvision) a été utilisé pour prendre les photographies.

Les photographies de champs microscopiques des marquages multiples en fluorescence du hTNFR-Is, du CD8 et du DAPI ont été prises avec un microscope inversé Zeiss Axiophot2 couplé à une caméra 3CCD couleur HAMAMATSU à l'aide d'un objectif 20X. Les filtres d'excitation de la rhodamine, du FITC et un filtre UV ont été utilisés pour acquérir 3 images de fluorescence émises respectivement par le hTNFR-Is (rouge), le CD8 (vert) et le DAPI (bleu) ; ces 3 photographies au format RVB (Rouge-Vert-Bleu) ont été assemblées par la suite à l'aide du logiciel Adobe Photoshop 7.0.

## **b) Analyses morphométriques**

Les analyses morphométriques ont été réalisées sur des images de coupes transversales complètes en utilisant le logiciel ImageJ 1.41o (NIH). La première étape consiste à délimiter les contours du muscle à l'aide d'un stylet et d'une tablette graphique Wacom afin de mesurer l'aire totale de la coupe transversale (donnée en nombre de pixels). Puis les mesures des aires d'intérêt (cas HPS) ou le comptage des fibres positives pour le bleu Evans étaient réalisés. Finalement, chaque aire d'intérêt est rapportée à la surface totale de la coupe transversale correspondante afin d'exprimer l'aire en pourcentage de la surface de la coupe. Dans le cas de l'analyse morphométrique des colorations HPS les aires d'intérêt ont été définies comme :

- l'aire d'infiltration et de nécrose
- ou l'aire pathologique correspondant à l'aire d'infiltration et de nécrose additionnée des aires de régénération.

L'infiltration est définie comme étant l'aire des fibres adjacentes à plus de 2 monocytes présents dans la zone interstitielle.

Les fibres considérées comme nécrotiques sont soit hyalines gonflées et rondes, soit fragmentées et ayant un contour indistinct, soit en cours de phagocytose, ou encore calcifiées.

La régénération est caractérisée par la centronucléation de fibres de calibre normal (immature), ou de myotubes centronucléés basophiles de petit diamètre en fin de régénération.

Les groupes de myoblastes n'ayant pas encore fusionné (distingués des monocytes par leur cytoplasme légèrement plus abondant et basophile) sont également intégrés dans l'aire de régénération.

Le décompte des fibres positives pour le bleu Evans se fait aisément car même si l'intensité de fluorescence est variable d'une fibre à l'autre, les seules autres structures fluorescentes dans le rouge sont des vaisseaux sanguins ou parfois un très léger marquage interstitiel.

Le comptage des fibres positives pour le bleu Evans a servi à classer les muscles selon un « indice de perméabilité » défini comme étant le nombre de fibres positives pour le bleu Evans par unité de surface. Cet indice est sans grandeur et est présenté en pourcentage relativement au muscle le plus atteint du protocole fixé à 100 %.

## **7. Statistiques**

L'analyse statistique de comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad InStat.

Un test de normalité a été effectué pour évaluer la distribution des populations testées selon la méthode de Kolmogorov et Smirnov. En cas de distribution non Gaussienne un test non paramétrique Mann-Whitney a été réalisé. En cas de distribution Gaussienne un test paramétrique est réalisé : le test T de Student. Dans le cas où les écarts-types des 2

populations étaient significativement différents (testé par la méthode de Bartlett), un test T modifié de Welch a été appliqué.

L'ensemble des tests a été réalisé selon une hypothèse bilatérale, aucun a priori n'étant fixé quant au sens d'une différence entre les moyennes (augmentation ou baisse du niveau de mSeAP plasmatique dosé lors de transduction AAV en présence d'un traitement adjuvant par exemple). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne  $\pm$  écart type, et le seuil de signification choisi est de  $p=5\%$ .

## Partie IV - Bibliographie

1. Goyenvalle, A., et al., *Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping*. Science, 2004. **306**(5702): p. 1796-9.
2. Meister, G. and T. Tuschl, *Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA*. Nature, 2004. **431**(7006): p. 343-9.
3. Mayor, H.D., et al., *Structure and Composition of a Small Particle Prepared from a Simian Adenovirus*. J Bacteriol, 1965. **90**(1): p. 235-42.
4. Melnick, J.L., et al., *Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses*. J Bacteriol, 1965. **90**(1): p. 271-4.
5. Kronenberg, S., J.A. Kleinschmidt, and B. Bottcher, *Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids*. EMBO Rep, 2001. **2**(11): p. 997-1002.
6. Erles, K., P. Sebokova, and J.R. Schlehofer, *Update on the prevalence of serum antibodies (IgG and IgM) to adeno-associated virus (AAV)*. J Med Virol, 1999. **59**(3): p. 406-11.
7. Berns, K.I., *Parvovirus replication*. Microbiol Rev, 1990. **54**(3): p. 316-29.
8. Kotin, R.M., R.M. Linden, and K.I. Berns, *Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination*. Embo J, 1992. **11**(13): p. 5071-8.
9. Chen, C.L., et al., *Molecular characterization of adeno-associated viruses infecting children*. J Virol, 2005. **79**(23): p. 14781-92.
10. Goncalves, M.A., *Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector*. Virol J, 2005. **2**: p. 43.
11. Dave, U.P., N.A. Jenkins, and N.G. Copeland, *Gene therapy insertional mutagenesis insights*. Science, 2004. **303**(5656): p. 333.
12. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1*. Science, 2003. **302**(5644): p. 415-9.
13. Bushman, F.D., *Retroviral integration and human gene therapy*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2083-6.
14. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, *Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus*. J Virol, 1998. **72**(3): p. 2224-32.
15. Samulski, R.J., L.S. Chang, and T. Shenk, *Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression*. J Virol, 1989. **63**(9): p. 3822-8.
16. Samulski, R.J., et al., *Cloning of adeno-associated virus into pBR322: rescue of intact virus from the recombinant plasmid in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(6): p. 2077-81.
17. Berns, K.I. and J.A. Rose, *Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: isolation and separation of complementary single strands*. J Virol, 1970. **5**(6): p. 693-9.
18. Clark, K.R., et al., *Cell lines for the production of recombinant adeno-associated virus*. Hum Gene Ther, 1995. **6**(10): p. 1329-41.
19. Urabe, M., C. Ding, and R.M. Kotin, *Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(16): p. 1935-43.

20. Rutledge, E.A., C.L. Halbert, and D.W. Russell, *Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (AAV) serotypes other than AAV type 2*. J Virol, 1998. **72**(1): p. 309-19.
21. Chiorini, J.A., et al., *Cloning and characterization of adeno-associated virus type 5*. J Virol, 1999. **73**(2): p. 1309-19.
22. Gao, G.P., et al., *Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11854-9.
23. Rodino-Klapac, L.R., et al., *Gene therapy for duchenne muscular dystrophy: expectations and challenges*. Arch Neurol, 2007. **64**(9): p. 1236-41.
24. Schmidt, M., et al., *Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity*. J Virol, 2008. **82**(3): p. 1399-406.
25. Van Vliet, K., et al., *Adeno-associated virus capsid serotype identification: Analytical methods development and application*. J Virol Methods, 2009. **159**(2): p. 167-77.
26. Gao, G., et al., *Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues*. J Virol, 2004. **78**(12): p. 6381-8.
27. Summerford, C. and R.J. Samulski, *Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1438-45.
28. Blackburn, S.D., R.A. Steadman, and F.B. Johnson, *Attachment of adeno-associated virus type 3H to fibroblast growth factor receptor 1*. Arch Virol, 2006. **151**(3): p. 617-23.
29. Di Pasquale, G., et al., *Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction*. Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1306-12.
30. Wu, Z., et al., *Alpha2,3 and alpha2,6 N-linked sialic acids facilitate efficient binding and transduction by adeno-associated virus types 1 and 6*. J Virol, 2006. **80**(18): p. 9093-103.
31. Olofsson, S. and T. Bergstrom, *Glycoconjugate glycans as viral receptors*. Ann Med, 2005. **37**(3): p. 154-72.
32. Buning, H., et al., *Recent developments in adeno-associated virus vector technology*. J Gene Med, 2008. **10**(7): p. 717-33.
33. Johnson, J.S. and R.J. Samulski, *Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus*. J Virol, 2009. **83**(6): p. 2632-44.
34. Ferrari, F.K., et al., *Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 3227-34.
35. Fisher, K.J., et al., *Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis*. J Virol, 1996. **70**(1): p. 520-32.
36. Thomas, C.E., et al., *Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors*. J Virol, 2004. **78**(6): p. 3110-22.
37. Vincent-Lacaze, N., et al., *Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle*. J Virol, 1999. **73**(3): p. 1949-55.
38. Nakai, H., et al., *Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver*. J Virol, 1999. **73**(7): p. 5438-47.
39. Schnepf, B.C., et al., *Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3495-504.
40. Cervelli, T., et al., *Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins*. J Cell Sci, 2008. **121**(Pt 3): p. 349-57.



41. Wang, Z., et al., *Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 321-8.
42. Schuettrumpf, J., et al., *The inhibitory effects of anticoagulation on in vivo gene transfer by adeno-associated viral or adenoviral vectors*. Mol Ther, 2006. **13**(1): p. 88-97.
43. Vandenberghe, L.H., et al., *Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid*. Nat Med, 2006. **12**(8): p. 967-71.
44. Davidoff, A.M., et al., *Comparison of the ability of adeno-associated viral vectors pseudotyped with serotype 2, 5, and 8 capsid proteins to mediate efficient transduction of the liver in murine and nonhuman primate models*. Mol Ther, 2005. **11**(6): p. 875-88.
45. Wang, L., et al., *Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3079-86.
46. Manno, C.S., et al., *Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response*. Nat Med, 2006. **12**(3): p. 342-7.
47. Jiang, H., et al., *Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs*. Blood, 2006. **108**(1): p. 107-15.
48. Inagaki, K., et al., *Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8*. Mol Ther, 2006. **14**(1): p. 45-53.
49. Vandendriessche, T., et al., *Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(1): p. 16-24.
50. Arruda, V.R. and W. Xiao, *It's all about the clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(1): p. 12-5.
51. Marks, W.J., Jr., et al., *Safety and tolerability of intraputaminial delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial*. Lancet Neurol, 2008. **7**(5): p. 400-8.
52. Buch, P.K., J.W. Bainbridge, and R.R. Ali, *AAV-mediated gene therapy for retinal disorders: from mouse to man*. Gene Ther, 2008. **15**(11): p. 849-57.
53. Grimm, D., et al., *Preclinical in vivo evaluation of pseudotyped adeno-associated virus vectors for liver gene therapy*. Blood, 2003. **102**(7): p. 2412-9.
54. Arruda, V.R., et al., *Regional intravascular delivery of AAV-2-F.IX to skeletal muscle achieves long-term correction of hemophilia B in a large animal model*. Blood, 2005. **105**(9): p. 3458-64.
55. Herweijer, H. and J.A. Wolff, *Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery*. Gene Ther, 2007. **14**(2): p. 99-107.
56. Ohshima, S., et al., *Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle*. Mol Ther, 2009. **17**(1): p. 73-80.
57. Murphy, S.L., et al., *Prolonged susceptibility to antibody-mediated neutralization for adeno-associated vectors targeted to the liver*. Mol Ther, 2008. **16**(1): p. 138-45.
58. Zincarelli, C., et al., *Analysis of AAV Serotypes 1-9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection*. Mol Ther, 2008.
59. Bessis, N., F.J. GarciaCozar, and M.C. Boissier, *Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms*. Gene Ther, 2004. **11** **Suppl 1**: p. S10-7.

60. Boutin, S., et al., *Prevalence of Serum IgG and Neutralizing Factors Against Adeno-Associated Virus (AAV) Types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the Healthy Population: Implications for Gene Therapy Using AAV Vectors*. Hum Gene Ther, 2010.
61. Jiang, H., et al., *Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3321-8.
62. Zaiss, A.K., et al., *Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors*. J Virol, 2008. **82**(6): p. 2727-40.
63. Mingozzi, F., et al., *CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans*. Nat Med, 2007. **13**(4): p. 419-22.
64. Bostick, B., et al., *Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration*. Gene Ther, 2007. **14**(22): p. 1605-9.
65. Wu, Z., et al., *Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose*. Mol Ther, 2008. **16**(2): p. 280-9.
66. Davidoff, A.M., et al., *Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway*. Blood, 2003. **102**(2): p. 480-8.
67. Yue, Y., et al., *A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs*. Mol Ther, 2008. **16**(12): p. 1944-52.
68. Calcedo, R., et al., *Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses*. J Infect Dis, 2009. **199**(3): p. 381-90.
69. Girod, A., et al., *Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2*. Nat Med, 1999. **5**(12): p. 1438.
70. Grifman, M., et al., *Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids*. Mol Ther, 2001. **3**(6): p. 964-75.
71. Nicklin, S.A., et al., *Efficient and selective AAV2-mediated gene transfer directed to human vascular endothelial cells*. Mol Ther, 2001. **4**(3): p. 174-81.
72. Muller, O.J., et al., *Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(9): p. 1040-6.
73. Grimm, D., et al., *In vitro and in vivo gene therapy vector evolution via multispecies interbreeding and re-targeting of adeno-associated viruses*. J Virol, 2008. **82**(12): p. 5887-911.
74. Perabo, L., et al., *Heparan sulfate proteoglycan binding properties of adeno-associated virus re-targeting mutants and consequences for their in vivo tropism*. J Virol, 2006. **80**(14): p. 7265-9.
75. Huttner, N.A., et al., *Genetic modifications of the adeno-associated virus type 2 capsid reduce the affinity and the neutralizing effects of human serum antibodies*. Gene Ther, 2003. **10**(26): p. 2139-47.
76. Zhong, L., et al., *Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression*. Virology, 2008. **381**(2): p. 194-202.
77. Zhong, L., et al., *Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(22): p. 7827-32.
78. Ding, W., et al., *Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors*. Gene Ther, 2005. **12**(11): p. 873-80.
79. Manno, C.S., et al., *AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B*. Blood, 2003. **101**(8): p. 2963-72.

80. Gregorevic, P., et al., *Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors*. Nat Med, 2004. **10**(8): p. 828-34.
81. Wang, Z., et al., *Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression*. Mol Ther, 2007. **15**(6): p. 1160-6.
82. Gao, G., et al., *Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates*. Mol Ther, 2006. **13**(1): p. 77-87.
83. Opie, S.R., et al., *Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding*. J Virol, 2003. **77**(12): p. 6995-7006.
84. Baskar, J.F., et al., *The enhancer domain of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter determines cell type-specific expression in transgenic mice*. J Virol, 1996. **70**(5): p. 3207-14.
85. Mislick, K.A. and J.D. Baldeschwieler, *Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12349-54.
86. Kay, M.A., et al., *Expression of human alpha 1-antitrypsin in dogs after autologous transplantation of retroviral transduced hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(1): p. 89-93.
87. Wang, M., et al., *MUSEAP, a novel reporter gene for the study of long-term gene expression in immunocompetent mice*. Gene, 2001. **279**(1): p. 99-108.
88. Yang, L., et al., *A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3946-51.
89. Pacak, C.A., et al., *Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo*. Circ Res, 2006. **99**(4): p. e3-9.
90. Pruchnic, R., et al., *The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers*. Hum Gene Ther, 2000. **11**(4): p. 521-36.
91. Haisma, H.J., et al., *Polyinosinic acid enhances delivery of adenovirus vectors in vivo by preventing sequestration in liver macrophages*. J Gen Virol, 2008. **89**(Pt 5): p. 1097-105.
92. Zaiss, A.K., et al., *Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors*. J Virol, 2002. **76**(9): p. 4580-90.
93. Yeung, S.N., K. Bockhold, and F. Tufaro, *Efficient infection of mature skeletal muscle with herpes simplex virus vectors by using dextran sulfate as a co-receptor*. Gene Ther, 1999. **6**(9): p. 1536-44.
94. Bengtsson, S., et al., *The Basis For The Interaction Between Attenuated Poliovirus And Polyions*. Virology, 1964. **24**: p. 617-25.
95. Dyer, A.P., et al., *Dextran sulfate can act as an artificial receptor to mediate a type-specific herpes simplex virus infection via glycoprotein B*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 191-8.
96. Shayakhmetov, D.M., et al., *Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity*. J Virol, 2005. **79**(12): p. 7478-91.
97. Ito, M. and H.D. Mayor, *Hemagglutinin of type 4 adeno-associated satellite virus*. J Immunol, 1968. **100**(1): p. 61-8.
98. Seiler, M.P., et al., *Adeno-associated virus types 5 and 6 use distinct receptors for cell entry*. Hum Gene Ther, 2006. **17**(1): p. 10-9.
99. Plank, C., et al., *Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(2): p. 319-32.

100. Plank, C., et al., *Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery*. Hum Gene Ther, 1996. **7**(12): p. 1437-46.
101. Van den Berg, C.W., P.C. Aerts, and H. Van Dijk, *In vivo anti-complementary activities of the cobra venom factors from Naja naja and Naja haje*. J Immunol Methods, 1991. **136**(2): p. 287-94.
102. Ramesh, N., et al., *High-level expression from a cytomegalovirus promoter in macrophage cells*. Hum Gene Ther, 1995. **6**(10): p. 1323-7.
103. Donahue, B.A., et al., *Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery*. J Gene Med, 1999. **1**(1): p. 31-42.
104. Boucas, J., et al., *Engineering adeno-associated virus serotype 2-based targeting vectors using a new insertion site-position 453-and single point mutations*. J Gene Med, 2009. **11**(12): p. 1103-13.
105. Yu, C.Y., et al., *A muscle-targeting peptide displayed on AAV2 improves muscle tropism on systemic delivery*. Gene Ther, 2009. **16**(8): p. 953-62.
106. Walters, R.W., et al., *Incorporation of adeno-associated virus in a calcium phosphate coprecipitate improves gene transfer to airway epithelia in vitro and in vivo*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 535-40.
107. Fein, D.E., et al., *Cationic lipid formulations alter the in vivo tropism of AAV2/9 vector in lung*. Mol Ther, 2009. **17**(12): p. 2078-87.
108. Lee, G.K., et al., *PEG conjugation moderately protects adeno-associated viral vectors against antibody neutralization*. Biotechnol Bioeng, 2005. **92**(1): p. 24-34.
109. Carlisle, R.C., et al., *Coating of adeno-associated virus with reactive polymers can ablate virus tropism, enable retargeting and provide resistance to neutralising antisera*. J Gene Med, 2008. **10**(4): p. 400-11.
110. Akache, B., et al., *The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9*. J Virol, 2006. **80**(19): p. 9831-6.
111. Duchenne, G.-B., *Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclérotique*. Vol. 11. 1868: Archives Générales Médecines. 5-25, 179-209, 305-321, 421-443, 552-588.
112. Gowers, W.R., *A manual of diseases of the nervous system*. 1886, London: Churchill Ed.
113. Tyler, K.L., *Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy"*. Muscle Nerve, 2003. **28**(4): p. 402-22.
114. Erb, W., *Dystrophia muscularis progressiva: Klinische und pathologische anatomische Studien*. 1891: Dtsch Nervenheilk. 13-94.
115. Boucraut, J.F.P.J.J.L.C.D.D.F.-B.J., *Dystrophies musculaires liées au gène DMD, myopathie de Duchenne, myopathie de Becker et formes de sexe féminin*. Vol. Neurologie. 1991: Encyclopédie médico-chirurgicale.
116. McDouall, R.M., M.J. Dunn, and V. Dubowitz, *Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy*. J Neurol Sci, 1990. **99**(2-3): p. 199-217.
117. Pestronk, A. *Dystrophinopathies: Duchenne*. 2005 [cited; Available from: <http://neuromuscular.wustl.edu/pathol/dmdpath.htm>].
118. Emery, A.E., *The muscular dystrophies*. Lancet, 2002. **359**(9307): p. 687-95.
119. Bonifati, M.D., et al., *A multicenter, double-blind, randomized trial of deflazacort versus prednisone in Duchenne muscular dystrophy*. Muscle Nerve, 2000. **23**(9): p. 1344-7.
120. Monaco, A.P., et al., *Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene*. Nature, 1986. **323**(6089): p. 646-50.

121. Koenig, M., et al., *Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals*. Cell, 1987. **50**(3): p. 509-17.
122. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
123. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. **51**(6): p. 919-28.
124. den Dunnen, J.T., et al., *Direct detection of more than 50% of the Duchenne muscular dystrophy mutations by field inversion gels*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 640-2.
125. Blake, D.J., et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*. Physiol Rev, 2002. **82**(2): p. 291-329.
126. Ahn, A.H. and L.M. Kunkel, *The structural and functional diversity of dystrophin*. Nat Genet, 1993. **3**(4): p. 283-91.
127. Boyce, F.M., et al., *Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(4): p. 1276-80.
128. Gorecki, D.C., et al., *Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters*. Hum Mol Genet, 1992. **1**(7): p. 505-10.
129. Hoffman, E.P., R.H. Brown, and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. 1987. Biotechnology, 1992. **24**: p. 457-66.
130. Ohlendieck, K. and K.P. Campbell, *Dystrophin constitutes 5% of membrane cytoskeleton in skeletal muscle*. FEBS Lett, 1991. **283**(2): p. 230-4.
131. Koenig, M., A.P. Monaco, and L.M. Kunkel, *The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein*. Cell, 1988. **53**(2): p. 219-28.
132. Koenig, M. and L.M. Kunkel, *Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4560-6.
133. Amann, K.J., B.A. Renley, and J.M. Ervasti, *A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28419-23.
134. Towbin, J.A., *The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(1): p. 131-9.
135. Ehmsen, J., E. Poon, and K. Davies, *The dystrophin-associated protein complex*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 14): p. 2801-3.
136. Amann, K.J., A.W. Guo, and J.M. Ervasti, *Utrophin lacks the rod domain actin binding activity of dystrophin*. J Biol Chem, 1999. **274**(50): p. 35375-80.
137. Clerk, A., et al., *Dystrophin-related protein, utrophin, in normal and dystrophic human fetal skeletal muscle*. Histochem J, 1993. **25**(8): p. 554-61.
138. Gramolini, A.O. and B.J. Jasmin, *Expression of the utrophin gene during myogenic differentiation*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(17): p. 3603-9.
139. Helliwell, T.R., et al., *The dystrophin-related protein, utrophin, is expressed on the sarcolemma of regenerating human skeletal muscle fibres in dystrophies and inflammatory myopathies*. Neuromuscul Disord, 1992. **2**(3): p. 177-84.
140. Sadoulet-Puccio, H.M. and L.M. Kunkel, *Dystrophin and its isoforms*. Brain Pathol, 1996. **6**(1): p. 25-35.
141. Moens, P., P.H. Baatsen, and G. Marechal, *Increased susceptibility of EDL muscles from mdx mice to damage induced by contractions with stretch*. J Muscle Res Cell Motil, 1993. **14**(4): p. 446-51.
142. Petrof, B.J., *The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy*. Mol Cell Biochem, 1998. **179**(1-2): p. 111-23.

143. Poon, E., et al., *Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex*. J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3433-9.
144. Prins, K.W., et al., *Dystrophin is a microtubule-associated protein*. J Cell Biol, 2009. **186**(3): p. 363-9.
145. Percival, J.M. and S.C. Froehner, *Golgi complex organization in skeletal muscle: a role for Golgi-mediated glycosylation in muscular dystrophies?* Traffic, 2007. **8**(3): p. 184-94.
146. Vandebrouck, C., et al., *Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1089-96.
147. Bellinger, A.M., et al., *Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 325-30.
148. Alderton, J.M. and R.A. Steinhardt, *Calcium influx through calcium leak channels is responsible for the elevated levels of calcium-dependent proteolysis in dystrophic myotubes*. J Biol Chem, 2000. **275**(13): p. 9452-60.
149. Spencer, M.J., D.E. Croall, and J.G. Tidball, *Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice*. J Biol Chem, 1995. **270**(18): p. 10909-14.
150. Chen, Y.W., et al., *Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology*. J Cell Biol, 2000. **151**(6): p. 1321-36.
151. Dunn, J.F., I. Tracey, and G.K. Radda, *A 31P-NMR study of muscle exercise metabolism in mdx mice: evidence for abnormal pH regulation*. J Neurol Sci, 1992. **113**(1): p. 108-13.
152. Sander, M., et al., *Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13818-23.
153. Hoffman, E.P., et al., *Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy*. N Engl J Med, 1988. **318**(21): p. 1363-8.
154. Monaco, A.P., et al., *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus*. Genomics, 1988. **2**(1): p. 90-5.
155. Bulfield, G., et al., *X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(4): p. 1189-92.
156. Hoffman, E.P. and J.R. Gorospe, *The animal models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency*, in *Current Topics in Membranes: Ordering the Membrane Cytoskeleton Trilayer*, M.S. Mooseker and J.S. Morrow, Editors. 1991, Acad. Press, Inc., Orlando, FL. p. 113-154.
157. Ferrer, A., et al., *Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins*. Gene Ther, 2004. **11**(11): p. 884-93.
158. Thanh, L.T., et al., *Characterization of revertant muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, using exon-specific monoclonal antibodies against dystrophin*. Am J Hum Genet, 1995. **56**(3): p. 725-31.
159. Wilton, S.D., et al., *Revertant fibres: a possible genetic therapy for Duchenne muscular dystrophy?* Neuromuscul Disord, 1997. **7**(5): p. 329-35.
160. Lu, Q.L., et al., *Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion*. J Cell Biol, 2000. **148**(5): p. 985-96.

161. Hoffman, E.P., et al., *Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo*. J Neurol Sci, 1990. **99**(1): p. 9-25.
162. Torres, L.F. and L.W. Duchen, *The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates*. Brain, 1987. **110 (Pt 2)**: p. 269-99.
163. Gillis, J.M., *Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse*. J Muscle Res Cell Motil, 1999. **20**(7): p. 605-25.
164. Coulton, G.R., et al., *The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1988. **14**(1): p. 53-70.
165. Nonaka, I., *Animal models of muscular dystrophies*. Lab Anim Sci, 1998. **48**(1): p. 8-17.
166. Lefaucheur, J.P., C. Pastoret, and A. Sebille, *Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice*. Anat Rec, 1995. **242**(1): p. 70-6.
167. Bobet, J., R.F. Mooney, and T. Gordon, *Force and stiffness of old dystrophic (mdx) mouse skeletal muscles*. Muscle Nerve, 1998. **21**(4): p. 536-9.
168. Pastoret, C. and A. Sebille, *Further aspects of muscular dystrophy in mdx mice*. Neuromuscul Disord, 1993. **3**(5-6): p. 471-5.
169. Vaillend, C., J.M. Billard, and S. Laroche, *Impaired long-term spatial and recognition memory and enhanced CA1 hippocampal LTP in the dystrophin-deficient Dmd(mdx) mouse*. Neurobiol Dis, 2004. **17**(1): p. 10-20.
170. De la Porte, S., S. Morin, and J. Koenig, *Characteristics of skeletal muscle in mdx mutant mice*. Int Rev Cytol, 1999. **191**: p. 99-148.
171. Mitchell, C.A., J.K. McGeachie, and M.D. Grounds, *Cellular differences in the regeneration of murine skeletal muscle: a quantitative histological study in SJL/J and BALB/c mice*. Cell Tissue Res, 1992. **269**(1): p. 159-66.
172. Louboutin, J.P., et al., *Morphometric analysis of mdx diaphragm muscle fibres. Comparison with hindlimb muscles*. Neuromuscul Disord, 1993. **3**(5-6): p. 463-9.
173. Gorospe, J.R., B.K. Nishikawa, and E.P. Hoffman, *Recruitment of mast cells to muscle after mild damage*. J Neurol Sci, 1996. **135**(1): p. 10-7.
174. Megeney, L.A., et al., *MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle*. Genes Dev, 1996. **10**(10): p. 1173-83.
175. Pastoret, C. and A. Sebille, *mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age*. J Neurol Sci, 1995. **129**(2): p. 97-105.
176. Rando, T.A., M.H. Disatnik, and L.Z. Zhou, *Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5363-8.
177. Bartlett, R.J., et al., *In vivo targeted repair of a point mutation in the canine dystrophin gene by a chimeric RNA/DNA oligonucleotide*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(6): p. 615-22.
178. Acsadi, G., et al., *Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 815-8.
179. Liang, K.W., et al., *Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA*. Gene Ther, 2004. **11**(11): p. 901-8.
180. Romero, N.B., et al., *Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1065-76.

181. Gilbert, R., et al., *Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (guttled) adenovirus-encoding murine dystrophin*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(11): p. 1287-99.
182. England, S.B., et al., *Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin*. Nature, 1990. **343**(6254): p. 180-2.
183. Rafael, J.A., et al., *Prevention of dystrophic pathology in mdx mice by a truncated dystrophin isoform*. Hum Mol Genet, 1994. **3**(10): p. 1725-33.
184. Torelli, S. and F. Muntoni, *Alternative splicing of dystrophin exon 4 in normal human muscle*. Hum Genet, 1996. **97**(4): p. 521-3.
185. Blankinship, M.J., P. Gregorevic, and J.S. Chamberlain, *Gene therapy strategies for Duchenne muscular dystrophy utilizing recombinant adeno-associated virus vectors*. Mol Ther, 2006. **13**(2): p. 241-9.
186. Ragot, T., et al., *Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice*. Nature, 1993. **361**(6413): p. 647-50.
187. Wang, B., J. Li, and X. Xiao, *Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13714-9.
188. Fabb, S.A., et al., *Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(7): p. 733-41.
189. Harper, S.Q., et al., *Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 253-61.
190. Chao, D.S., et al., *Selective loss of sarcolemmal nitric oxide synthase in Becker muscular dystrophy*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 609-18.
191. van Deutekom, J.C., et al., *Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(15): p. 1547-54.
192. Aartsma-Rus, A., et al., *Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(8): p. 907-14.
193. Bertoni, C., C. Lau, and T.A. Rando, *Restoration of dystrophin expression in mdx muscle cells by chimeraplast-mediated exon skipping*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(10): p. 1087-99.
194. Mann, C.J., et al., *Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(1): p. 42-7.
195. van Deutekom, J.C., et al., *Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051*. N Engl J Med, 2007. **357**(26): p. 2677-86.
196. Tinsley, J.M., et al., *Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene*. Nature, 1996. **384**(6607): p. 349-53.
197. Tinsley, J., et al., *Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice*. Nat Med, 1998. **4**(12): p. 1441-4.
198. Kleopa, K.A., et al., *Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(10): p. 1623-8.
199. Yue, Y., et al., *Full-length dystrophin expression in half of the heart cells ameliorates beta-isoproterenol-induced cardiomyopathy in mdx mice*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(15): p. 1669-75.
200. Bogdanovich, S., et al., *Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade*. Nature, 2002. **420**(6914): p. 418-21.



201. Haidet, A.M., et al., *Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(11): p. 4318-22.
202. Abmayr, S., et al., *Phenotypic improvement of dystrophic muscles by rAAV/microdystrophin vectors is augmented by Igf1 codelivery*. Mol Ther, 2005. **12**(3): p. 441-50.
203. Xu, R., M. Camboni, and P.T. Martin, *Postnatal overexpression of the CT GalNAc transferase inhibits muscular dystrophy in mdx mice without altering muscle growth or neuromuscular development: evidence for a utrophin-independent mechanism*. Neuromuscul Disord, 2007. **17**(3): p. 209-20.
204. Burkin, D.J., et al., *Enhanced expression of the alpha 7 beta 1 integrin reduces muscular dystrophy and restores viability in dystrophic mice*. J Cell Biol, 2001. **152**(6): p. 1207-18.
205. Moll, J., et al., *An agrin minigene rescues dystrophic symptoms in a mouse model for congenital muscular dystrophy*. Nature, 2001. **413**(6853): p. 302-7.
206. Kronqvist, P., et al., *ADAM12 alleviates the skeletal muscle pathology in mdx dystrophic mice*. Am J Pathol, 2002. **161**(5): p. 1535-40.
207. Watchko, J., et al., *Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(12): p. 1451-60.
208. Liu, M., et al., *Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury*. Mol Ther, 2005. **11**(2): p. 245-56.
209. anon., *Anatomie du muscle strié squelettique*. 2006.
210. Honda, H., H. Kimura, and A. Rostami, *Demonstration and phenotypic characterization of resident macrophages in rat skeletal muscle*. Immunology, 1990. **70**(2): p. 272-7.
211. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 271-96.
212. Holt, P.G., et al., *Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 397-407.
213. Pimorady-Esfahani, A., M.D. Grounds, and P.G. McMenamin, *Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle*. Muscle Nerve, 1997. **20**(2): p. 158-66.
214. Tidball, J.G., *Inflammatory cell response to acute muscle injury*. Med Sci Sports Exerc, 1995. **27**(7): p. 1022-32.
215. Robertson, T.A., et al., *The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis*. Exp Cell Res, 1993. **207**(2): p. 321-31.
216. Orimo, S., et al., *Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis*. Muscle Nerve, 1991. **14**(6): p. 515-20.
217. Rosenberg, N.L. and B.L. Kotzin, *Aberrant expression of class II MHC antigens by skeletal muscle endothelial cells in experimental autoimmune myositis*. J Immunol, 1989. **142**(12): p. 4289-94.
218. Cassatella, M.A., *The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils*. Immunol Today, 1995. **16**(1): p. 21-6.
219. Wiendl, H., R. Hohlfeld, and B.C. Kieseier, *Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment*. Trends Immunol, 2005. **26**(7): p. 373-80.

220. Karpati, G., Y. Pouliot, and S. Carpenter, *Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles*. *Ann Neurol*, 1988. **23**(1): p. 64-72.
221. Emslie-Smith, A.M., K. Arahata, and A.G. Engel, *Major histocompatibility complex class I antigen expression, immunolocalization of interferon subtypes, and T cell-mediated cytotoxicity in myopathies*. *Hum Pathol*, 1989. **20**(3): p. 224-31.
222. Wiendl, H., et al., *Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G*. *Ann Neurol*, 2000. **48**(4): p. 679-84.
223. Michaelis, D., N. Goebels, and R. Hohlfeld, *Constitutive and cytokine-induced expression of human leukocyte antigens and cell adhesion molecules by human myotubes*. *Am J Pathol*, 1993. **143**(4): p. 1142-9.
224. Goebels, N., et al., *Human myoblasts as antigen-presenting cells*. *J Immunol*, 1992. **149**(2): p. 661-7.
225. Ferrer, I., et al., *Proteasomal expression, induction of immunoproteasome subunits, and local MHC class I presentation in myofibrillar myopathy and inclusion body myositis*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004. **63**(5): p. 484-98.
226. Hohlfeld, R. and A.G. Engel, *Coculture with autologous myotubes of cytotoxic T cells isolated from muscle in inflammatory myopathies*. *Ann Neurol*, 1991. **29**(5): p. 498-507.
227. Mantegazza, R., et al., *Modulation of MHC class II antigen expression in human myoblasts after treatment with IFN-gamma*. *Neurology*, 1991. **41**(7): p. 1128-32.
228. Inukai, A., et al., *Expression of HLA-DR and its enhancing molecules in muscle fibers in polymyositis*. *Muscle Nerve*, 2000. **23**(3): p. 385-92.
229. Kumamoto, T., et al., *Calpain and cathepsins in the skeletal muscle of inflammatory myopathies*. *Eur Neurol*, 1997. **37**(3): p. 176-81.
230. Gallardo, E., I. de Andres, and I. Illa, *Cathepsins are upregulated by IFN-gamma/STAT1 in human muscle culture: a possible active factor in dermatomyositis*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001. **60**(9): p. 847-55.
231. Wiendl, H., et al., *Antigen processing and presentation in human muscle: cathepsin S is critical for MHC class II expression and upregulated in inflammatory myopathies*. *J Neuroimmunol*, 2003. **138**(1-2): p. 132-43.
232. Carosella, E.D., et al., *HLA-G: a shield against inflammatory aggression*. *Trends Immunol*, 2001. **22**(10): p. 553-5.
233. Figarella-Branger, D., et al., *Cytokines, chemokines, and cell adhesion molecules in inflammatory myopathies*. *Muscle Nerve*, 2003. **28**(6): p. 659-82.
234. Wiendl, H., et al., *Muscle fibres and cultured muscle cells express the B7.1/2-related inducible co-stimulatory molecule, ICOSL: implications for the pathogenesis of inflammatory myopathies*. *Brain*, 2003. **126**(Pt 5): p. 1026-35.
235. Schmidt, J., et al., *Upregulated inducible co-stimulator (ICOS) and ICOS-ligand in inclusion body myositis muscle: significance for CD8+ T cell cytotoxicity*. *Brain*, 2004. **127**(Pt 5): p. 1182-90.
236. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. *Annu Rev Immunol*, 2005. **23**: p. 515-48.
237. Wiendl, H., et al., *Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies*. *Faseb J*, 2003. **17**(13): p. 1892-4.
238. Chen, L., *Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**(5): p. 336-47.

239. Choi, Y.C. and M.C. Dalakas, *Expression of matrix metalloproteinases in the muscle of patients with inflammatory myopathies*. *Neurology*, 2000. **54**(1): p. 65-71.
240. Kieseier, B.C., et al., *Expression of specific matrix metalloproteinases in inflammatory myopathies*. *Brain*, 2001. **124**(Pt 2): p. 341-51.
241. Schreiner, B., et al., *Expression of toll-like receptors by human muscle cells in vitro and in vivo: TLR3 is highly expressed in inflammatory and HIV myopathies, mediates IL-8 release and up-regulation of NKG2D-ligands*. *Faseb J*, 2006. **20**(1): p. 118-20.
242. Chen, Y.W., et al., *Early onset of inflammation and later involvement of TGFbeta in Duchenne muscular dystrophy*. *Neurology*, 2005. **65**(6): p. 826-34.
243. Stan, A.C., et al., *CpG motifs of DNA vaccines induce the expression of chemokines and MHC class II molecules on myocytes*. *Eur J Immunol*, 2001. **31**(1): p. 301-10.
244. Warrens, A.N., et al., *Myoblasts fail to stimulate T cells but induce tolerance*. *Int Immunol*, 1994. **6**(6): p. 847-53.
245. Wolff, J.A., et al., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. *Science*, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-8.
246. Krieg, A.M., *Lymphocyte activation by CpG dinucleotide motifs in prokaryotic DNA*. *Trends Microbiol*, 1996. **4**(2): p. 73-6.
247. Curnow, J., et al., *Presentation by myoblasts of an epitope from endogenous acetylcholine receptor indicates a potential role in the spreading of the immune response*. *J Neuroimmunol*, 2001. **115**(1-2): p. 127-34.
248. Rubenstrunk, A., A. Mahfoudi, and D. Scherman, *Delivery of electric pulses for DNA electrotransfer to mouse muscle does not induce the expression of stress related genes*. *Cell Biol Toxicol*, 2004. **20**(1): p. 25-31.
249. Rizzuto, G., et al., *Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(11): p. 6417-22.
250. Trollet, C., et al., *Generation of high-titer neutralizing antibodies against botulinum toxins A, B, and E by DNA electrotransfer*. *Infect Immun*, 2009. **77**(5): p. 2221-9.
251. Huang, X. and Y. Yang, *Innate immune recognition of viruses and viral vectors*. *Hum Gene Ther*, 2009. **20**(4): p. 293-301.
252. Fu, T.M., et al., *Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes*. *Mol Med*, 1997. **3**(6): p. 362-71.
253. Condon, C., et al., *DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells*. *Nat Med*, 1996. **2**(10): p. 1122-8.
254. Xiao, X., J. Li, and R.J. Samulski, *Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector*. *J Virol*, 1996. **70**(11): p. 8098-108.
255. Jooss, K., et al., *Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers*. *J Virol*, 1998. **72**(5): p. 4212-23.
256. Sun, B., et al., *Correction of glycogen storage disease type II by an adeno-associated virus vector containing a muscle-specific promoter*. *Mol Ther*, 2005. **11**(6): p. 889-98.
257. Wang, L., et al., *Systemic protein delivery by muscle-gene transfer is limited by a local immune response*. *Blood*, 2005. **105**(11): p. 4226-34.
258. Veron, P., et al., *Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2*. *J Virol*, 2007. **81**(10): p. 5385-94.

259. Ferrer, A., K.E. Wells, and D.J. Wells, *Immune responses to dystropin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy*. *Gene Ther*, 2000. **7**(17): p. 1439-46.
260. Tripathy, S.K., et al., *Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors*. *Nat Med*, 1996. **2**(5): p. 545-50.
261. Qin, L., et al., *Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression*. *Hum Gene Ther*, 1997. **8**(17): p. 2019-29.
262. McDouall, R.M., M.J. Dunn, and V. Dubowitz, *Expression of class I and class II MHC antigens in neuromuscular diseases*. *J Neurol Sci*, 1989. **89**(2-3): p. 213-26.
263. Hartigan-O'Connor, D., et al., *Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle*. *Mol Ther*, 2001. **4**(6): p. 525-33.
264. Arruda, V.R., et al., *Posttranslational modifications of recombinant myotube-synthesized human factor IX*. *Blood*, 2001. **97**(1): p. 130-8.
265. Herzog, R.W., et al., *Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(11): p. 5804-9.
266. Song, S., et al., *Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(24): p. 14384-8.
267. Rols, M.P. and J. Teissie, *Flow cytometry quantification of electroporation*. *Methods Mol Biol*, 1998. **91**: p. 141-7.
268. Mir, L.M., et al., *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4262-7.
269. Mathiesen, I., *Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo*. *Gene Ther*, 1999. **6**(4): p. 508-14.
270. Mir, L.M., et al., *Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle*. *C R Acad Sci III*, 1998. **321**(11): p. 893-9.
271. Aihara, H. and J. Miyazaki, *Gene transfer into muscle by electroporation in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(9): p. 867-70.
272. Golzio, M., J. Teissie, and M.P. Rols, *Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(3): p. 1292-7.
273. Satkauskas, S., et al., *Slow accumulation of plasmid in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis*. *Mol Ther*, 2001. **4**(4): p. 317-23.
274. Cappelletti, M., et al., *Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA*. *J Gene Med*, 2003. **5**(4): p. 324-32.
275. Bureau, M.F., et al., *Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1676**(2): p. 138-48.
276. Saidenberg-Kermanac'h, N., et al., *Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis*. *J Gene Med*, 2003. **5**(2): p. 164-71.
277. Kim, J.M., et al., *Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein*. *Gene Ther*, 2003. **10**(15): p. 1216-24.
278. Kreiss, P., et al., *Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer*. *J Gene Med*, 1999. **1**(4): p. 245-50.

279. Rodino-Klapac, L.R., et al., *A translational approach for limb vascular delivery of the micro-dystrophin gene without high volume or high pressure for treatment of Duchenne muscular dystrophy*. J Transl Med, 2007. **5**: p. 45.
280. Weitzman, M.D. and P.A. Thistlethwaite, *Breaking the barriers to global gene delivery*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 305-6.
281. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.
282. Pennica, D., et al., *Cloning and expression in Escherichia coli of the cDNA for murine tumor necrosis factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(18): p. 6060-4.
283. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
284. Clark, I.A., *How TNF was recognized as a key mechanism of disease*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(3-4): p. 335-43.
285. Nedwin, G.E., et al., *Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization*. Nucleic Acids Res, 1985. **13**(17): p. 6361-73.
286. Eck, M.J. and S.R. Sprang, *The structure of tumor necrosis factor-alpha at 2.6 A resolution. Implications for receptor binding*. J Biol Chem, 1989. **264**(29): p. 17595-605.
287. Bodmer, J.L., P. Schneider, and J. Tschopp, *The molecular architecture of the TNF superfamily*. Trends Biochem Sci, 2002. **27**(1): p. 19-26.
288. Jones, E.Y., D.I. Stuart, and N.P. Walker, *Structure of tumour necrosis factor*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 225-8.
289. Baeyens, K.J., et al., *The structure of mouse tumour-necrosis factor at 1.4 A resolution: towards modulation of its selectivity and trimerization*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1999. **55**(Pt 4): p. 772-8.
290. Eck, M.J., et al., *The structure of human lymphotoxin (tumor necrosis factor-beta) at 1.9-A resolution*. J Biol Chem, 1992. **267**(4): p. 2119-22.
291. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 184-95.
292. Bazzoni, F. and B. Beutler, *The tumor necrosis factor ligand and receptor families*. N Engl J Med, 1996. **334**(26): p. 1717-25.
293. Makhatadze, N.J., *Tumor necrosis factor locus: genetic organisation and biological implications*. Hum Immunol, 1998. **59**(9): p. 571-9.
294. Strassmann, G., et al., *Evidence for the involvement of interleukin 10 in the differential deactivation of murine peritoneal macrophages by prostaglandin E2*. J Exp Med, 1994. **180**(6): p. 2365-70.
295. Han, J., T. Brown, and B. Beutler, *Endotoxin-responsive sequences control cachectin/tumor necrosis factor biosynthesis at the translational level*. J Exp Med, 1990. **171**(2): p. 465-75.
296. Anderson, P., *Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor alpha production*. Ann Rheum Dis, 2000. **59 Suppl 1**: p. i3-5.
297. Winzen, R., et al., *The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism*. Embo J, 1999. **18**(18): p. 4969-80.
298. Nguyen-Chi, M. and D. Morello, *[Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation]*. Med Sci (Paris), 2008. **24**(3): p. 290-6.
299. Gearing, A.J., et al., *Matrix metalloproteinases and processing of pro-TNF-alpha*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(5): p. 774-7.

300. Hachicha, M., et al., *Production of monocyte chemotactic protein-1 in human type B synoviocytes. Synergistic effect of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma.* Arthritis Rheum, 1993. **36**(1): p. 26-34.
301. Iademarco, M.F., J.L. Barks, and D.C. Dean, *Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells.* J Clin Invest, 1995. **95**(1): p. 264-71.
302. Weller, A., S. Isenmann, and D. Vestweber, *Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha.* J Biol Chem, 1992. **267**(21): p. 15176-83.
303. Sakurai, H., et al., *Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides.* J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2357-63.
304. Peschon, J.J., et al., *TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation.* J Immunol, 1998. **160**(2): p. 943-52.
305. Wellmer, A., et al., *Effect of deficiency of tumor necrosis factor alpha or both of its receptors on Streptococcus pneumoniae central nervous system infection and peritonitis.* Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 6881-6.
306. Trevejo, J.M., et al., *TNF-alpha -dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(21): p. 12162-7.
307. Kasahara, S., et al., *Lack of tumor necrosis factor alpha induces impaired proliferation of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes.* J Virol, 2003. **77**(4): p. 2469-76.
308. Pasparakis, M., et al., *Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response.* J Exp Med, 1996. **184**(4): p. 1397-411.
309. Taniguchi, T., et al., *Failure of germinal center formation and impairment of response to endotoxin in tumor necrosis factor alpha-deficient mice.* Lab Invest, 1997. **77**(6): p. 647-58.
310. Jacobsen, F.W., et al., *Role of the 75-kDa tumor necrosis factor receptor: inhibition of early hematopoiesis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(22): p. 10695-9.
311. Zhang, Y., et al., *Tumor necrosis factor (TNF) is a physiologic regulator of hematopoietic progenitor cells: increase of early hematopoietic progenitor cells in TNF receptor p55-deficient mice in vivo and potent inhibition of progenitor cell proliferation by TNF alpha in vitro.* Blood, 1995. **86**(8): p. 2930-7.
312. Dybedal, I., et al., *Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells.* Blood, 2001. **98**(6): p. 1782-91.
313. Sajjadi, F.G., et al., *Inhibition of TNF-alpha expression by adenosine: role of A3 adenosine receptors.* J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3435-42.
314. Iyer, S., et al., *Inhibition of tumor necrosis factor mRNA translation by a rationally designed immunomodulatory peptide.* J Biol Chem, 2000. **275**(22): p. 17051-7.
315. Newton, R.C., et al., *Biology of TACE inhibition.* Ann Rheum Dis, 2001. **60 Suppl 3**: p. iii25-32.
316. Watanabe, M., et al., *Anti-cytokine autoantibodies are ubiquitous in healthy individuals.* FEBS Lett, 2007. **581**(10): p. 2017-21.
317. Elliott, M.J., et al., *Randomised double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis.* Lancet, 1994. **344**(8930): p. 1105-10.

318. Scallon, B.J., et al., *Chimeric anti-TNF-alpha monoclonal antibody cA2 binds recombinant transmembrane TNF-alpha and activates immune effector functions.* Cytokine, 1995. **7**(3): p. 251-9.
319. Olsen, N.J. and C.M. Stein, *New drugs for rheumatoid arthritis.* N Engl J Med, 2004. **350**(21): p. 2167-79.
320. Sandborn, W.J., et al., *Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's disease.* N Engl J Med, 2007. **357**(3): p. 228-38.
321. Wolff, A.V., et al., *Passive mechanical properties of maturing extensor digitorum longus are not affected by lack of dystrophin.* Muscle Nerve, 2006. **34**(3): p. 304-12.
322. Grange, R.W., et al., *Fast-twitch skeletal muscles of dystrophic mouse pups are resistant to injury from acute mechanical stress.* Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(4): p. C1090-101.
323. McArdle, A., R.H. Edwards, and M.J. Jackson, *Time course of changes in plasma membrane permeability in the dystrophin-deficient mdx mouse.* Muscle Nerve, 1994. **17**(12): p. 1378-84.
324. Rando, T.A., *The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies.* Muscle Nerve, 2001. **24**(12): p. 1575-94.
325. Madhavan, R., L.R. Massom, and H.W. Jarrett, *Calmodulin specifically binds three proteins of the dystrophin-glycoprotein complex.* Biochem Biophys Res Commun, 1992. **185**(2): p. 753-9.
326. Madhavan, R. and H.W. Jarrett, *Phosphorylation of dystrophin and alpha-syntrophin by Ca(2+)-calmodulin dependent protein kinase II.* Biochim Biophys Acta, 1999. **1434**(2): p. 260-74.
327. Jarrett, H.W. and J.L. Foster, *Alternate binding of actin and calmodulin to multiple sites on dystrophin.* J Biol Chem, 1995. **270**(10): p. 5578-86.
328. Winder, S.J. and J. Kendrick-Jones, *Calcium/calmodulin-dependent regulation of the NH2-terminal F-actin binding domain of utrophin.* FEBS Lett, 1995. **357**(2): p. 125-8.
329. Niebroj-Dobosz, I., et al., *Elevated calmodulin levels and reduced calmodulin-stimulated calcium-ATPase in Duchenne progressive muscular dystrophy.* Neurology, 1989. **39**(12): p. 1610-4.
330. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts.* Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
331. Franklin, R.A. and J.A. McCubrey, *Kinases: positive and negative regulators of apoptosis.* Leukemia, 2000. **14**(12): p. 2019-34.
332. Yang, B., et al., *SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2.* J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 11711-4.
333. Chardin, P., et al., *The Grb2 adaptor.* FEBS Lett, 1995. **369**(1): p. 47-51.
334. Lowenstein, E.J., et al., *The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling.* Cell, 1992. **70**(3): p. 431-42.
335. Cary, L.A., D.C. Han, and J.L. Guan, *Integrin-mediated signal transduction pathways.* Histol Histopathol, 1999. **14**(3): p. 1001-9.
336. Guan, J.L., *Focal adhesion kinase in integrin signaling.* Matrix Biol, 1997. **16**(4): p. 195-200.
337. Schlaepfer, D.D., C.R. Hauck, and D.J. Sieg, *Signaling through focal adhesion kinase.* Prog Biophys Mol Biol, 1999. **71**(3-4): p. 435-78.
338. Evans, N.P., et al., *Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy.* Am J Phys Med Rehabil, 2009. **88**(6): p. 502-22.

339. Brenman, J.E., et al., *Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains*. Cell, 1996. **84**(5): p. 757-67.
340. Brenman, J.E., et al., *Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy*. Cell, 1995. **82**(5): p. 743-52.
341. Chang, W.J., et al., *Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(17): p. 9142-7.
342. Denninger, J.W. and M.A. Marletta, *Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1411**(2-3): p. 334-50.
343. Grozdanovic, Z. and H.G. Baumgarten, *Nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: a signaling component of the dystrophin-glycoprotein complex*. Histol Histopathol, 1999. **14**(1): p. 243-56.
344. Thomas, G.D., et al., *Impaired metabolic modulation of alpha-adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(25): p. 15090-5.
345. Chao, D.S., F. Silvagno, and D.S. Bredt, *Muscular dystrophy in mdx mice despite lack of neuronal nitric oxide synthase*. J Neurochem, 1998. **71**(2): p. 784-9.
346. Crosbie, R.H., et al., *mdx muscle pathology is independent of nNOS perturbation*. Hum Mol Genet, 1998. **7**(5): p. 823-9.
347. Rando, T.A., *Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis*. Microsc Res Tech, 2001. **55**(4): p. 223-35.
348. Kumar, A., et al., *Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers*. Faseb J, 2004. **18**(1): p. 102-13.
349. Kumar, A. and A.M. Boriek, *Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy*. Faseb J, 2003. **17**(3): p. 386-96.
350. Pescatori, M., et al., *Gene expression profiling in the early phases of DMD: a constant molecular signature characterizes DMD muscle from early postnatal life throughout disease progression*. Faseb J, 2007. **21**(4): p. 1210-26.
351. Porter, J.D., et al., *Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(15): p. 1813-21.
352. Porter, J.D., et al., *Persistent over-expression of specific CC class chemokines correlates with macrophage and T-cell recruitment in mdx skeletal muscle*. Neuromuscul Disord, 2003. **13**(3): p. 223-35.
353. Porter, J.D., et al., *A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient mdx mice*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(3): p. 263-72.
354. Ortega-Perez, I., et al., *c-Jun N-terminal kinase (JNK) positively regulates NFATc2 transactivation through phosphorylation within the N-terminal regulatory domain*. J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20867-78.
355. Crabtree, G.R., *Calcium, calcineurin, and the control of transcription*. J Biol Chem, 2001. **276**(4): p. 2313-6.
356. Chakkalakal, J.V., et al., *Expression of utrophin A mRNA correlates with the oxidative capacity of skeletal muscle fiber types and is regulated by calcineurin/NFAT signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(13): p. 7791-6.
357. Chin, E.R., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type*. Genes Dev, 1998. **12**(16): p. 2499-509.



358. Davis, R.J., *Transcriptional regulation by MAP kinases*. Mol Reprod Dev, 1995. **42**(4): p. 459-67.
359. Ramji, D.P. and P. Foka, *CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation*. Biochem J, 2002. **365**(Pt 3): p. 561-75.
360. Karin, M. and Y. Ben-Neriah, *Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 621-63.
361. Benayoun, B., et al., *NF-kappaB-dependent expression of the antiapoptotic factor c-FLIP is regulated by calpain 3, the protein involved in limb-girdle muscular dystrophy type 2A*. Faseb J, 2008. **22**(5): p. 1521-9.
362. Messina, S., et al., *Nuclear factor kappa-B blockade reduces skeletal muscle degeneration and enhances muscle function in Mdx mice*. Exp Neurol, 2006. **198**(1): p. 234-41.
363. Guttridge, D.C., et al., *NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia*. Science, 2000. **289**(5488): p. 2363-6.
364. Peter, A.K. and R.H. Crosbie, *Hypertrophic response of Duchenne and limb-girdle muscular dystrophies is associated with activation of Akt pathway*. Exp Cell Res, 2006. **312**(13): p. 2580-91.
365. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. Nat Immunol, 2002. **3**(3): p. 221-7.
366. Monici, M.C., et al., *Activation of nuclear factor-kappaB in inflammatory myopathies and Duchenne muscular dystrophy*. Neurology, 2003. **60**(6): p. 993-7.
367. Whitehead, N.P., E.W. Yeung, and D.G. Allen, *Muscle damage in mdx (dystrophic) mice: role of calcium and reactive oxygen species*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(7): p. 657-62.
368. Dudley, R.W., et al., *Dynamic responses of the glutathione system to acute oxidative stress in dystrophic mouse (mdx) muscles*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **291**(3): p. R704-10.
369. Tidball, J.G. and M. Wehling-Henricks, *The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy*. J Appl Physiol, 2007. **102**(4): p. 1677-86.
370. Dogra, C., et al., *Regulation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in dystrophin-deficient skeletal muscle in response to mechanical stretch*. J Cell Physiol, 2006. **208**(3): p. 575-85.
371. Spencer, M.J. and J.G. Tidball, *Do immune cells promote the pathology of dystrophin-deficient myopathies?* Neuromuscul Disord, 2001. **11**(6-7): p. 556-64.
372. Arahata, K. and A.G. Engel, *Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. I: Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells*. Ann Neurol, 1984. **16**(2): p. 193-208.
373. Spencer, M.J., et al., *Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle*. Clin Immunol, 2001. **98**(2): p. 235-43.
374. Mendell, J.R., et al., *Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy*. N Engl J Med, 1989. **320**(24): p. 1592-7.
375. Biggar, W.D., et al., *Long-term benefits of deflazacort treatment for boys with Duchenne muscular dystrophy in their second decade*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(4): p. 249-55.
376. Balaban, B., et al., *Corticosteroid treatment and functional improvement in Duchenne muscular dystrophy: long-term effect*. Am J Phys Med Rehabil, 2005. **84**(11): p. 843-50.

377. De Bosscher, K., et al., *Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems*. Eur J Pharmacol, 2008. **583**(2-3): p. 290-302.
378. Barnes, P.J., *Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms*. Clin Sci (Lond), 1998. **94**(6): p. 557-72.
379. Auphan, N., et al., *Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis*. Science, 1995. **270**(5234): p. 286-90.
380. Karin, M. and L. Chang, *AP-1--glucocorticoid receptor crosstalk taken to a higher level*. J Endocrinol, 2001. **169**(3): p. 447-51.
381. St-Pierre, S.J., et al., *Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway*. Faseb J, 2004. **18**(15): p. 1937-9.
382. Angelini, C., *The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal*. Muscle Nerve, 2007. **36**(4): p. 424-35.
383. Carlson, C.G., A. Samadi, and A. Siegel, *Chronic treatment with agents that stabilize cytosolic I kappa B-alpha enhances survival and improves resting membrane potential in MDX muscle fibers subjected to chronic passive stretch*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(3): p. 719-30.
384. Yuasa, K., et al., *Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product*. Gene Ther, 2002. **9**(23): p. 1576-88.
385. Granchelli, J.A., et al., *Cromolyn increases strength in exercised mdx mice*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, 1996. **91**(3): p. 287-96.
386. Grounds, M.D. and J. Torrisi, *Anti-TNFalpha (Remicade) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis*. Faseb J, 2004. **18**(6): p. 676-82.
387. Hodgetts, S., et al., *Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice*. Neuromuscul Disord, 2006. **16**(9-10): p. 591-602.
388. Radley, H.G., M.J. Davies, and M.D. Grounds, *Reduced muscle necrosis and long-term benefits in dystrophic mdx mice after cVIq (blockade of TNF) treatment*. Neuromuscul Disord, 2008. **18**(3): p. 227-38.
389. Spencer, M.J., M.W. Marino, and W.M. Winckler, *Altered pathological progression of diaphragm and quadriceps muscle in TNF-deficient, dystrophin-deficient mice*. Neuromuscul Disord, 2000. **10**(8): p. 612-9.
390. Smith, C.A., et al., *A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins*. Science, 1990. **248**(4958): p. 1019-23.
391. Schall, T.J., et al., *Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 361-70.
392. Loetscher, H., et al., *Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 351-9.
393. Tartaglia, L.A., et al., *A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death*. Cell, 1993. **74**(5): p. 845-53.
394. Armitage, R.J., *Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands*. Curr Opin Immunol, 1994. **6**(3): p. 407-13.
395. Grell, M., et al., *The type I receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(2): p. 570-5.
396. Chen, G. and D.V. Goeddel, *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway*. Science, 2002. **296**(5573): p. 1634-5.

397. Micheau, O., [To die or not to die? Towards the understanding of TNF-R1 signaling dichotomy]. *Med Sci (Paris)*, 2004. **20**(2): p. 153-5.
398. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. *Trends Cell Biol*, 2001. **11**(9): p. 372-7.
399. Hsu, H., J. Xiong, and D.V. Goeddel, *The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation*. *Cell*, 1995. **81**(4): p. 495-504.
400. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. *Cell*, 1996. **84**(2): p. 299-308.
401. Li, M. and A.A. Beg, *Induction of necrotic-like cell death by tumor necrosis factor alpha and caspase inhibitors: novel mechanism for killing virus-infected cells*. *J Virol*, 2000. **74**(16): p. 7470-7.
402. Wajant, H., F. Henkler, and P. Scheurich, *The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators*. *Cell Signal*, 2001. **13**(6): p. 389-400.
403. Wang, C.Y., et al., *NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation*. *Science*, 1998. **281**(5383): p. 1680-3.
404. Legler, D.F., et al., *Recruitment of TNF receptor 1 to lipid rafts is essential for TNFalpha-mediated NF-kappaB activation*. *Immunity*, 2003. **18**(5): p. 655-64.
405. Schneider-Brachert, W., et al., *Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptors as death signaling vesicles*. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 415-28.
406. Rothe, M., et al., *TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40*. *Science*, 1995. **269**(5229): p. 1424-7.
407. Grell, M., et al., *Induction of cell death by tumour necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF*. *Embo J*, 1999. **18**(11): p. 3034-43.
408. Fotin-Mleczek, M., et al., *Apoptotic crosstalk of TNF receptors: TNF-R2-induces depletion of TRAF2 and IAP proteins and accelerates TNF-R1-dependent activation of caspase-8*. *J Cell Sci*, 2002. **115**(Pt 13): p. 2757-70.
409. Cope, A.P., et al., *Increased levels of soluble tumor necrosis factor receptors in the sera and synovial fluid of patients with rheumatic diseases*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(10): p. 1160-9.
410. Aderka, D., et al., *Stabilization of the bioactivity of tumor necrosis factor by its soluble receptors*. *J Exp Med*, 1992. **175**(2): p. 323-9.
411. Van Zee, K.J., et al., *Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(11): p. 4845-9.
412. Toussiot, E. and D. Wendling, *The use of TNF-alpha blocking agents in rheumatoid arthritis: an overview*. *Expert Opin Pharmacother*, 2004. **5**(3): p. 581-94.
413. Rutgeerts, P., et al., *Onercept for moderate-to-severe Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2006. **4**(7): p. 888-93.
414. Loetscher, H., et al., *Recombinant 55-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Stoichiometry of binding to TNF alpha and TNF beta and inhibition of TNF activity*. *J Biol Chem*, 1991. **266**(27): p. 18324-9.
415. Haak-Frendscho, M., et al., *Inhibition of TNF by a TNF receptor immunoadhesin. Comparison to an anti-TNF monoclonal antibody*. *J Immunol*, 1994. **152**(3): p. 1347-53.

416. Trinchard-Lugan, I., et al., *Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human tumour necrosis factor-binding protein-1 (Onercept) injected by intravenous, intramuscular and subcutaneous routes into healthy volunteers*. Eur Cytokine Netw, 2001. **12**(3): p. 391-8.
417. Rutgeerts, P., et al., *Treatment of active Crohn's disease with onercept (recombinant human soluble p55 tumour necrosis factor receptor): results of a randomized, open-label, pilot study*. Aliment Pharmacol Ther, 2003. **17**(2): p. 185-92.
418. Peppel, K., D. Crawford, and B. Beutler, *A tumor necrosis factor (TNF) receptor-IgG heavy chain chimeric protein as a bivalent antagonist of TNF activity*. J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1483-9.
419. Soubrier, F., et al., *pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy*. Gene Ther, 1999. **6**(8): p. 1482-8.
420. Bloquel, C., et al., *Gene therapy of collagen-induced arthritis by electrotransfer of human tumor necrosis factor-alpha soluble receptor I variants*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(2): p. 189-201.
421. Breous, E., et al., *Hepatic regulatory T cells and Kupffer cells are crucial mediators of systemic T cell tolerance to antigens targeting murine liver*. Hepatology, 2009. **50**(2): p. 612-21.
422. Lewis, M., et al., *Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(7): p. 2830-4.
423. Kuru, S., et al., *Expression of tumor necrosis factor-alpha in regenerating muscle fibers in inflammatory and non-inflammatory myopathies*. Acta Neuropathol, 2003. **105**(3): p. 217-24.
424. Pierno, S., et al., *Role of tumour necrosis factor alpha, but not of cyclo-oxygenase-2-derived eicosanoids, on functional and morphological indices of dystrophic progression in mdx mice: a pharmacological approach*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2007. **33**(3): p. 344-59.
425. Porreca, E., et al., *Haemostatic abnormalities, cardiac involvement and serum tumor necrosis factor levels in X-linked dystrophic patients*. Thromb Haemost, 1999. **81**(4): p. 543-6.
426. Shimizu, T., et al., *Elevation of serum soluble tumour necrosis factor receptors in patients with polymyositis and dermatomyositis*. Clin Rheumatol, 2000. **19**(5): p. 352-9.
427. Bloquel, C., et al., *Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis*. Faseb J, 2006. **20**(2): p. 389-91.
428. Papadimitriou, J.M., et al., *The process of new plasmalemma formation in focally injured skeletal muscle fibers*. J Struct Biol, 1990. **103**(2): p. 124-34.
429. Bansal, D., et al., *Defective membrane repair in dysferlin-deficient muscular dystrophy*. Nature, 2003. **423**(6936): p. 168-72.
430. Hamer, P.W., et al., *Evans Blue Dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability*. J Anat, 2002. **200**(Pt 1): p. 69-79.
431. Gosselin, L.E. and D.A. Martinez, *Impact of TNF-alpha blockade on TGF-beta1 and type I collagen mRNA expression in dystrophic muscle*. Muscle Nerve, 2004. **30**(2): p. 244-6.
432. Li, Y.P., et al., *TNF-alpha acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle*. Faseb J, 2005. **19**(3): p. 362-70.

433. Deleuze, V., D. Scherman, and M.F. Bureau, *Interleukin-10 expression after intramuscular DNA electrotransfer: kinetic studies*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **299**(1): p. 29-34.
434. Silvestre, J.S., et al., *Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb*. Circ Res, 2000. **87**(6): p. 448-52.
435. Miura, P. and B.J. Jasmin, *Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we?* Trends Mol Med, 2006. **12**(3): p. 122-9.
436. Voisin, V., et al., *L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice*. Neurobiol Dis, 2005. **20**(1): p. 123-30.
437. Squire, S., et al., *Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system*. Hum Mol Genet, 2002. **11**(26): p. 3333-44.
438. Denti, M.A., et al., *Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(10): p. 3758-63.
439. Welch, E.M., et al., *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations*. Nature, 2007. **447**(7140): p. 87-91.
440. Bloquel, C., *Thérapie génique non virale de variants du gène du récepteur soluble de type I du TNF-alpha humain. Application à différents modèles de pathologies inflammatoires*. 2005.

## PUBLICATIONS

Ce travail de thèse a donné lieu à l'écriture de deux articles (un publié et un soumis) :

- **G. Moulay**, C. Masurier, P. Bigey, D. Scherman, A. Kichler. Soluble TNF-alpha receptor secretion from healthy or dystrophic mice after AAV6-mediated muscle gene transfer. *Gene Therapy*. 2010 Jul 1 ; PMID: 20596058.
- **G. Moulay**, S. Boutin, C. Masurier, D. Scherman, A. Kichler. Pre-injection of polymers allows for an increased in vivo transduction efficiency of adeno-associated virus type 2. *Soumis*.

Parallèlement j'ai participé durant ma thèse à l'écriture de 3 articles publiés sur les propriétés antibiotiques et transfectrices de peptides dans le cadre d'une collaboration initiée avant ce travail de thèse :

- A. J. Mason, C. Leborgne, **G. Moulay**, A. Martinez, O. Danos, B. Bechinger, A. Kichler. Optimising histidine rich peptides for efficient DNA delivery in the presence of serum. *J Control Release*. 2007 Mar 12;118(1):95-104.
- A. J. Mason, P. Bertani, **G. Moulay**, A. Marquette, B. Perrone, A. F. Drake, A. Kichler, B. Bechinger. Membrane interaction of chrysophsin-1, a histidine-rich antimicrobial peptide from red sea bream. *Biochemistry*. 2007 Dec 25;46(51):15175-87.
- A. J. Mason, W. Moussaoui, T. Abdelrahman, A. Boukhari, P. Bertani, A. Marquette, P. Shooshtarizaheh, **G. Moulay**, N. Boehm, B. Guerold, R. J. Sawers, A. Kichler, Metz-Boutigue MH, Candolfi E, Prévost G, Bechinger B. Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine-rich amphipathic cationic peptides. *J Biol Chem*. 2009 Jan 2;284(1):119-33.

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### Posters :

- **G. Moulay**, A. J. Mason, B. Bechinger, A. Kichler. Évaluation de peptides cationiques amphipatiques pour la vectorisation d'ADN en présence de sérum. Société Française de Thérapie Cellulaire et Génique (SFTCG), 24-26 juin 2007, Presqu'île de Giens, France.
- **G. Moulay**, C. Masurier, P. Bigey, D. Scherman, A. Kichler. A comparison of adeno-associated virus mediated gene transfer into healthy and dystrophin-deficient skeletal muscle. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), 20-25 novembre 2009, Hanovre, Allemagne.
- **G. Moulay**, S. Boutin, C. Masurier, D. Scherman, A. Kichler. Pre-injection of polymers can increase the *in vivo* transduction efficiency of adeno-associated virus type 2. American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT), 17-22 Mai 2010, Washington, DC, USA.
- **G. Moulay**, C. Masurier, P. Bigey, D. Scherman, A. Kichler. A comparison of adeno-associated virus mediated gene transfer into healthy and dystrophin-deficient skeletal muscles. American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT), 17-22 Mai 2010, Washington, DC, USA.

### Communication orale :

- G. Moulay**, S. Boutin, C. Masurier, D. Scherman, A. Kichler. Pre-injection of polymers can increase the *in vivo* transduction efficiency of adeno-associated virus type 2. European Society of Gene and Cell Therapy (ESGCT), 20-25 novembre 2009, Hanovre, Allemagne.

---

## RÉSUMÉ

La thérapie génique de myopathies telles que la dystrophie musculaire de Duchenne nécessite une approche systémique afin de traiter l'ensemble de la musculature. Le vecteur AAV est actuellement le plus efficace pour transduire le muscle. Nous montrons que la biodistribution du vecteur AAV administré par voie veineuse peut être modifiée en utilisant diverses stratégies adjuvantes chez la souris saine. La pré-injection de polymères permet ainsi d'améliorer la transduction des muscles par le vecteur AAV, ou encore de baisser la réponse immune neutralisante induite par l'injection intraveineuse du vecteur. Nous abordons également l'impact de facteurs modulateurs exogènes ou endogènes – tels que la procédure d'administration ou certains facteurs sanguins – sur la transduction systémique de l'AAV.

Dans une seconde approche, nous avons évalué le transfert de gènes dans le muscle dystrophique afin de sécréter dans la circulation sanguine une protéine transgénique fusionnant le récepteur soluble I du TNF- $\alpha$  avec le fragment constant d'une immunoglobuline (TNFR-Is/mIgG1). La comparaison des cinétiques de sécrétion obtenu après le transfert de gène dans le muscle de souris saines ou de souris dystrophiques *mdx* indique que le contexte inflammatoire du muscle dystrophique favorise une réponse immune contre le transgène. Nous montrons que l'expression et la sécrétion d'un variant murin peu immunogène du TNFR-Is/mIgG1 améliore la fonction musculaire de la souris *mdx* sans toutefois conférer un avantage sélectif aux fibres musculaires dystrophiques qui continuent leur cycle de nécrose et de régénération.

---

### MOTS-CLÉS

Thérapie génique, virus adéno-associé, muscle dystrophique, récepteur du TNF- $\alpha$ , poly-L-lysine