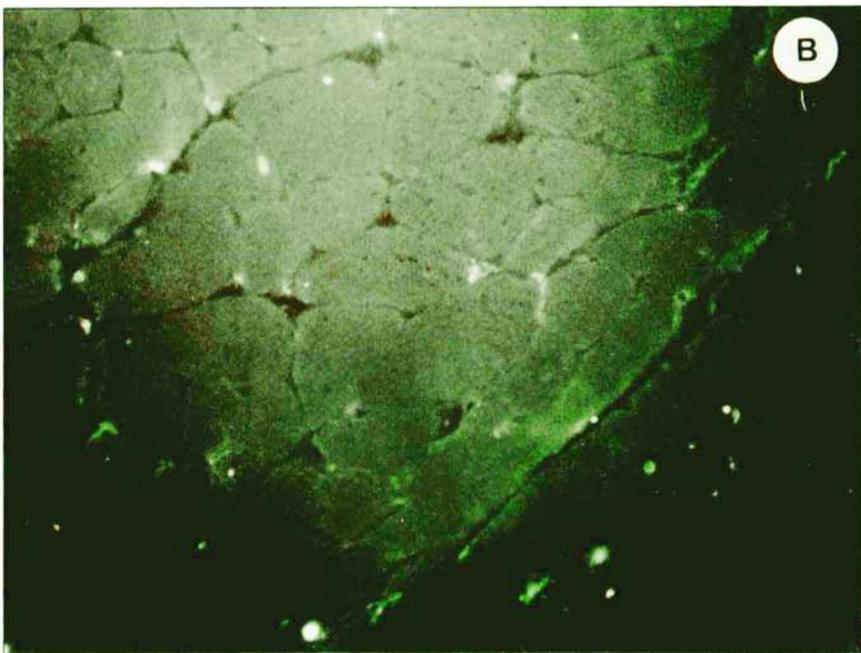
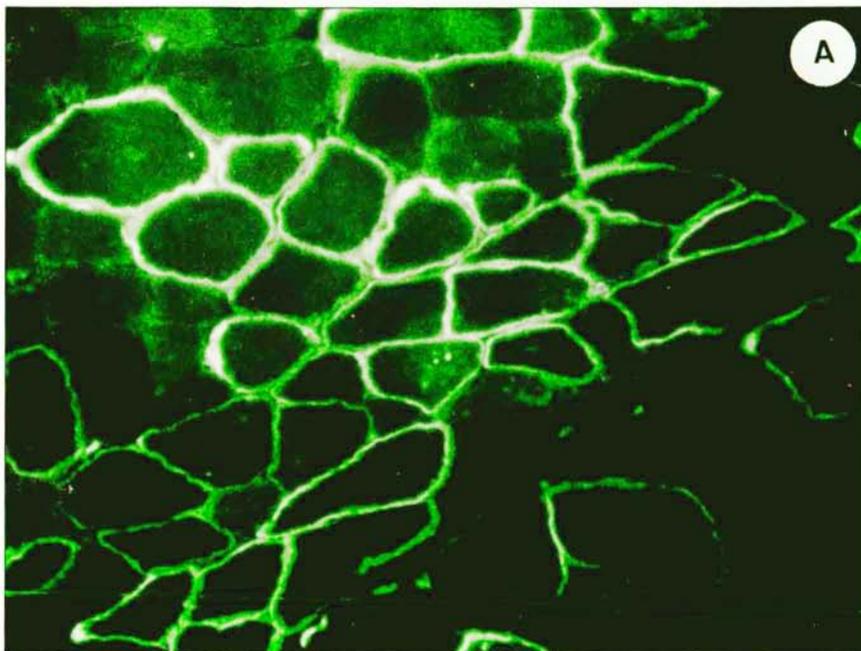


## **T**ransfert à l'aide d'un vecteur adénoviral d'un minigène de dystrophine dans des muscles de souris dystrophiques mdx

La myopathie de Duchenne, décrite par le physiologiste français qui lui a donné son nom dans les années 1860, a été la première maladie héréditaire dont le gène a été localisé par la méthode du clonage positionnel [1] consistant à identifier le gène muté responsable d'une maladie avant de connaître la protéine pour laquelle il code. Cette maladie, particulièrement pénible et dévastatrice, est relativement fréquente (1 garçon sur 3 500). Elle se caractérise par la perte progressive de la force musculaire vers 4-5 ans, la détérioration des muscles entraînant vers 11-12 ans l'obligation d'utiliser un fauteuil roulant et aboutissant à la mort par insuffisance respiratoire ou cardiaque vers 20 ans. Cette maladie monogénique remplit les critères nécessaires pour que l'on envisage son traitement par thérapie génique. Le gène en cause (s'étendant sur 2,3 millions de paires de bases) a été localisé en Xp21 par plusieurs équipes. L'ADNc et la protéine correspondante, la dystrophine, absente chez la plupart des myopathes de Duchenne, ont été mis en évidence [2-4]. Les organes touchés par la maladie sont connus : les muscles squelettiques, le cœur, les muscles lisses et, probablement impliqué, le système nerveux. Il n'existe pas de traitement efficace connu. De plus, le diagnostic prénatal ne permet pas de prévenir les cas de néomutation, particulièrement fréquents dans cette affection (1/3 des cas). Enfin, l'existence de modèles animaux (souris *mdx* et chien *cxmd*), chez lesquels la protéine équivalente à la protéine humaine est également absente, permet de tester l'efficacité des thérapies proposées.

Des traitements non spécifiques comme l'injection de glucocorticoïdes produisent des effets très réduits. Du fait de la nature de la dystrophine (il s'agit d'une protéine structurale cytoplasmique [5] exprimée à la membrane des fibres musculaires), des



traitements permettant de fournir la protéine absente ne sont pas réalisables. Différentes approches ont donc été tentées pour corriger le défaut génétique directement au niveau de l'ADN, puisque la fonction de la protéine et la physiopathologie de la maladie ne sont pas suffisamment comprises pour envisager d'autres niveaux de traitement qui agiraient sur les conséquences de ce défaut.

La première approche a été la greffe de myoblastes hétérologues provenant de donneurs normaux [6]. Les cellules sont ensuite injectées dans le muscle du patient. Les myoblastes transplantés peuvent fusionner avec les myoblastes du malade et participent à la régénération des fibres musculaires en produisant la dystrophine manquante. Dans les expériences thérapeutiques tentées chez l'homme, le

nombre de fibres pouvant exprimer la dystrophine atteint environ 30 % et on ne constate pas systématiquement d'amélioration de la force musculaire. De plus, les obstacles techniques sont importants : nombre élevé de myoblastes à injecter, amplification des cellules *in vitro*, rejet de greffe impliquant des traitements immunosuppresseurs. Une alternative est étudiée qui consisterait à utiliser des cellules prélevées chez le patient lui-même et traitées *ex vivo* pour leur transférer le gène normal de la dystrophine par différentes techniques [7]. Le problème est de prélever les cellules souches du patient (les cellules satellites) avant qu'elles n'aient perdu leur potentiel de division au cours des cycles de nécrose-régénération qui se produisent chez les myopathes. Les muscles profonds et le cœur ne sont de toute façon pas accessibles par cette stratégie. Un second type de thérapie génique a été tenté chez la souris *mdx* par l'équipe de J.A. Wolff [8]. Elle consiste à introduire le gène de la dystrophine par injection de l'ADN nu dans le muscle. Bien que l'expression persiste plusieurs mois dans les fibres musculaires, le faible pourcentage de transfert obtenu (environ 1 % des fibres) rend cette technique inutilisable pour l'instant.

Les adénovirus possèdent des propriétés extrêmement intéressantes pour le transfert de gènes *in vivo* [9]. Ces virus sont stables et des titres particulièrement élevés peuvent être obtenus. Ils peuvent, contrairement aux rétrovirus, infecter des cellules post-mitotiques telles que les myotubes et peuvent enfin infecter de nombreux

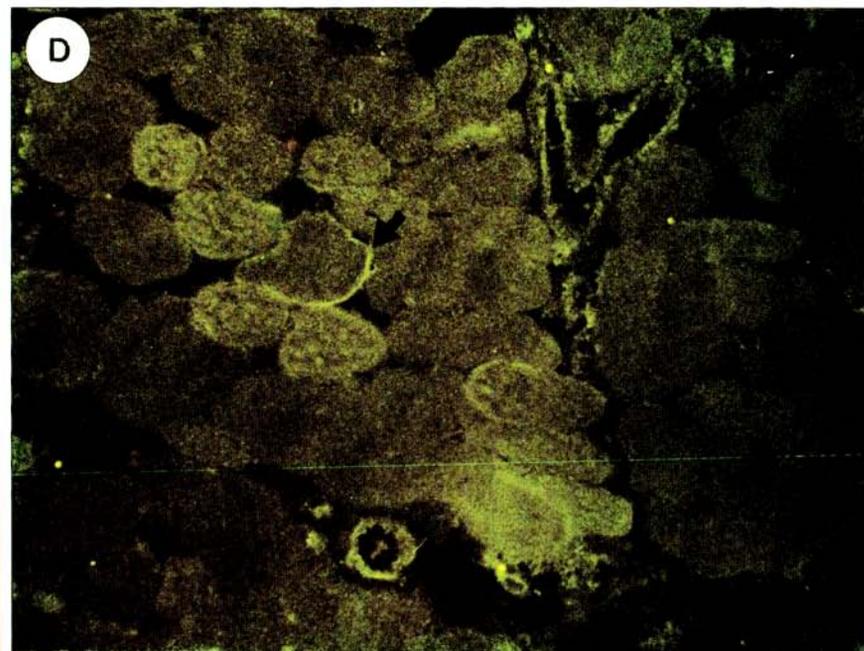
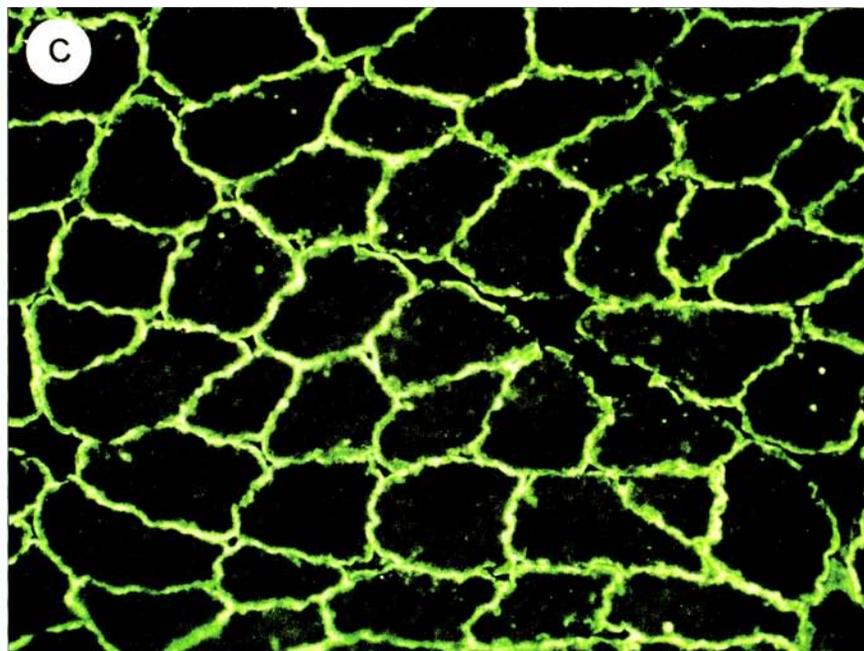


Figure 1. **A. Détection par immunofluorescence de la minidystrophine dans un muscle de souris mdx, trois mois après l'injection d'une suspension d'adénovirus recombinants contenant l'ADNc de la minidystrophine sous contrôle du LTR du virus du sarcome de Rous. B. Réaction obtenue sur le même muscle, avec un anticorps dirigé contre le domaine central de la dystrophine, absent dans la minidystrophine. C. Muscle de souris normale, D. Muscle non injecté de souris mdx. Noter la présence d'une fibre révertante (flèche).**

organes, dont les muscles et le cœur [10], et autoriser un mode de délivrance systémique. Ce point est particulièrement important dans le cas de la maladie de Duchenne qui affecte tous les muscles, puisque l'issue de cette maladie dépend surtout de l'atteinte des muscles respiratoires et cardiaque qui ne sont pas accessibles par injection locale. Des adénovirus recombinants non réplicatifs ont été utilisés pour transférer plusieurs gènes avec succès chez l'animal dans un but de vaccination ou de thérapie génique [11-13]. Aucun effet secondaire n'a été détecté à cette occasion. Bien que le génome de ces vecteurs adénoviraux non réplicatifs semble persister majoritairement sous forme extrachromosomique, il a été démontré que l'expression des gènes ainsi transférés pouvait être observée pendant de longues périodes dans le foie et les muscles squelettiques [10, 11, 14].

Dans un article récemment publié dans *Nature*, Ragot *et al.*, dans le cadre d'un travail coopératif entre les laboratoires de Michel Perricaudet (CNRS, IGR, Villejuif, France), Axel Kahn, Jean-Claude Kaplan et Pascale Briand (INSERM et Assistante publique, ICGM, Paris, France), et J. Cartaud (CNRS, Institut Jacques-Monod, Paris, France), ont démontré qu'un vecteur adénoviral permettait aussi de transférer un gène codant pour une dystrophine dans des muscles de souris *mdx* déficients en cette protéine [15]. Ils ont utilisé un ADNc de 6,3 kpb codant pour une mini-dystrophine, cloné chez un malade âgé de 61 ans qui était atteint d'une forme extrêmement atténuée de myopathie de Becker [16]. La bénignité des symptômes observés chez ce malade suggère que la minidystrophine synthétisée dans ce cas conserve une part de la fonction de la protéine entière. L'ADNc codant pour cette mini-dystrophine est un matériel intéressant car, compte tenu de sa taille (14 kb), l'ADNc complet de la dystrophine ne peut être intégré dans les vecteurs existants. Cet ADNc a été cloné sous le contrôle du promoteur présent dans le LTR (*long terminal repeat*) du virus du sarcome de Rous dans un vecteur viral basé sur l'adénovirus

humain de type 5. Il est possible de substituer 7,5 kpb d'ADN exogène dans le génome viral du fait de la présence de délétions au niveau de la région E1 et une partie de la région E3. Le virus recombinant portant le gène codant pour la minidystrophine (Ad-RSVmDys) a été obtenu par recombinaison *in vivo*. Ce virus est défectueux pour la réplication dans les cellules humaines (qui sont les cellules normalement permissives pour la réplication) et doit donc être préparé sur une lignée particulière de cellules humaines, les cellules 293 qui complètent pour la région E1 virale.

Ce virus recombinant a d'abord été testé *in vitro* sur les cellules 293 et sur une lignée de myoblastes de souris, la lignée C2. Ces dernières peuvent être infectées par le virus au stade myoblaste ou après fusion cellulaire lorsque les myoblastes ont fusionné pour donner des myotubes. Après une infection de 48 heures, une protéine de poids moléculaire attendu (200 kDa) est observée par immunotransfert dans les extraits cellulaires, confirmant l'intégrité de la minidystrophine recombinante obtenue.

Le virus recombinant a alors été utilisé pour transférer et exprimer cette protéine dans les muscles de la souris *mdx*. Cette souche de souris possède une mutation ponctuelle qui engendre un codon stop dans le gène de la dystrophine, empêchant la synthèse de cette protéine. Il peut cependant se produire des mutations somatiques conduisant à l'expression de la dystrophine dans certaines fibres, mais ce taux de réversion n'excède jamais 1 %. Des souriceaux de 5 et 9 jours ont été injectés dans le muscle de l'une des pattes arrière avec des doses d'adénovirus comprises entre 2 et 5 × 10<sup>9</sup> u.f.p. (unité formant plaque). De plus, un adénovirus recombinant exprimant le gène rapporteur codant pour la  $\beta$ -galactosidase a été injecté dans les deux pattes (avec Ad-RSVmDys dans la patte traitée et seul dans la patte controlatérale). Les animaux ont été sacrifiés deux semaines à six mois après l'injection et les muscles traités ont été prélevés et coupés. L'expression du transcrite de la minidystrophine a été vérifiée par PCR avec ou sans étape de trans-

cription inverse (pour s'assurer que les échantillons d'ARN ne sont pas contaminés par de l'ADN). Si un signal est effectivement détecté dans la patte traitée, en revanche, aucun signal n'est visible dans la patte témoin qui peut donc être utilisée comme témoin interne.

Les études d'immunofluorescence réalisées ont montré que la minidystrophine était correctement exprimée au niveau du sarcolemme des fibres musculaires. Suivant les animaux et les stocks viraux utilisés, des résultats compris entre 5 et 50 % de fibres positives ont été obtenus dans le muscle traité contre moins de 1 % dans la patte controlatérale (*figure 1*). Les auteurs ont vérifié, avec un anticorps reconnaissant la région absente dans la minidystrophine, que l'expression dans la patte traitée était bien le résultat de l'expression de la minidystrophine. Moins de 1 % de fibres sont marquées par cet anticorps aussi bien dans la patte traitée que dans la patte controlatérale, ce qui correspond à l'expression résultant de réversions somatiques. Dans certaines expériences, le muscle (3 à 4 mm de long) a été sectionné en totalité et les différentes sections examinées montrent que la même proportion de fibres positives est observée sur toute la longueur du muscle, du fait de la diffusion du virus sur une certaine distance. L'expression du gène transféré est parfaitement stable au moins pendant six mois. Les animaux ont été injectés avant le début de la période de nécrose-régénération qui débute vers le 15<sup>e</sup> jour après la naissance et se poursuit tout au long de la vie de la souris *mdx*. Les noyaux des fibres musculaires en régénération ont une localisation majoritairement centrocyclaire alors que celle des fibres normales est périphérique. Chez les souris sacrifiées trois et six mois après l'injection, une majorité de fibres possèdent des noyaux périphériques dans le muscle de la patte injectée alors que, dans la patte controlatérale, on observe l'aspect de fibres en régénération. De plus, la présence de  $\beta$ -galactosidase n'est observée que dans le muscle traité, indiquant probablement une protection vis-à-vis du processus de nécrose-régénération des fibres exprimant le gène thérapeutique.

En conclusion, ce travail démontre qu'il est possible de transférer et de faire exprimer un gène codant pour une minidystrophine fonctionnelle dans une proportion importante des fibres du muscle injecté. Il reste à démontrer la possibilité d'obtenir le même résultat par une injection systématique du vecteur adénoviral. Par ailleurs, il faudra ensuite passer au modèle canin — le chien *cmd* qui, contrairement à la souris, est très affecté par l'absence de dystrophine et qui présente un modèle de la maladie très proche de la myopathie humaine — afin de vérifier l'efficacité thérapeutique d'une telle approche.

De nombreux problèmes devront cependant être résolus avant d'envisager de traiter des malades par une telle méthode. Les obstacles sont dus soit au transgène lui-même, soit au vecteur. Quelles sont les conséquences de l'expression ectopique de la dystrophine ? Le système immunitaire répondra-t-il contre les cellules exprimant la dystrophine chez des malades où celle-ci était complètement absente avant la thérapie ? Différents problèmes portent également sur les aspects de sécurité du vecteur adénoviral. Il faut ainsi évaluer les risques liés à la présence du génome viral dans les cellules de l'organisme ciblé par le virus (effet de l'expression éventuelle de protéines virales s'exprimant malgré tout avec le transgène, possibilité de rares événements d'intégration du génome viral). Peut-il y avoir une répllication virale par exemple par surinfection des cellules traitées avec un virus recombinant ? Quelle sera la réponse immunitaire si des injections répétées de virus sont utilisées ? Enfin, le vecteur adénoviral utilisé ici ne peut accepter que 7,5 kpb d'ADN exogène. Clairement, si une thérapie génique est proposée, il faudra utiliser le gène codant pour la protéine complète, en tous points comparable à la protéine normale. Pour cela, il faudra disposer d'un vecteur adénoviral pouvant accepter environ 12 kpb. Il est en principe possible de déléter complètement tous les gènes viraux et de libérer une place correspondant à 30 kpb. Mais, en contre-partie, le vecteur devra être amplifié sur une lignée cellulaire complétant les

produits des gènes viraux ou être cultivé en présence d'un virus auxiliaire codant pour les gènes viraux absents. Cette méthodologie pose à son tour de nombreux problèmes. Les réponses à ces problèmes et leurs parades éventuelles sont étudiées. Néanmoins, les résultats obtenus ouvrent l'espoir que des maladies totalement incurables actuellement soient un jour traitées par une thérapie génique utilisant des vecteurs viraux présentant un niveau maximum de sécurité pour les malades.

**Thierry Ragot,  
Nathalie Vincent  
Hélène Gilgenkrantz**

**L'Association des Anciens Élèves de l'Institut Pasteur communique**

A une époque où, avec le Sida, les maladies infectieuses retiennent à nouveau l'attention, peut être convient-il de méditer les leçons sur « La naissance, la vie et la mort des maladies infectieuses » que Charles NICOLLE, grand Pasteurien, fondateur et longtemps directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, Prix Nobel de Médecine en 1928, donna au Collège de France. Plusieurs fois publiés, ces cours, qui conurent un grand retentissement, restent d'actualité mais sont devenus introuvables en librairie.

A l'intention de tous ceux qui souhaitent les découvrir ou les posséder dans leur bibliothèque pour s'y référer, l'Association des Anciens Élèves de l'Institut Pasteur compte les rééditer, sous une présentation soignée et propose une offre de souscription dans les conditions suivantes :

- Jusqu'au 31 mars 1993 :
- Le montant de la souscription pour un exemplaire est de 135 F, majoré de 30 F pour les frais d'envoi (France et étranger). Le chèque accompagnant le bulletin de souscription sera débité à partir du 1<sup>er</sup> avril.
- Passé le 31 mars 1993 :
- Le prix de cession de l'ouvrage sera de 180 F, majoré de 30 F pour les frais d'envoi (France et étranger).

**BULLETIN DE SOUSCRIPTION POUR « DESTIN DES MALADIES INFECTIEUSES » DE CHARLES NICOLLE**  
A adresser avant le 31 mars 1993 au Secrétaire de l'Association des Anciens Élèves de l'Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15. Tél. (1) 45.68.81.65 ou (1) 43.27.72.37

NOM ..... PRÉNOM .....

ADRESSE .....

- Souscription pour ..... exemplaire(s) du « Destin des maladies infectieuses » de Charles NICOLLE au prix de 135 F l'unité plus frais de port (30 F).
- Ci-joint le chèque correspondant à cette souscription, libellé à l'ordre de l'ASSOCIATION DES ANCIENS ÉLÈVES DE L'INSTITUT PASTEUR.

Date : ..... Signature : .....

1. Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt S. Specific cloning fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985 ; 82 : 4778-82.
2. Chelly J, Kaplan JC. La myopathie de Duchenne : du gène DMD à la dystrophine. *médecine/sciences* 1988 ; 4 : 141-50.
3. Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM. Dystrophin : the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 1987 ; 51 : 919-28.
4. Koenig M, Monaco AP, Kunkel LM. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 1988 ; 53 : 219-28.
5. Léger JJ, Augier N, Léger J, Mornet D, Pons F. La ou les dystrophine(s), trois années après leur découverte. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 805-19.
6. Labrecque C, Bouchard JP, Malouin F, Roy R, Huard J, Tremblay JP. Approche thérapeutique de la myopathie de Duchenne par transplantation de myoblastes. *médecine/sciences* 1991 ; 7 : 821-9.
7. Dunckley MG, Love DR, Davies KE, Walsh FS, Morris GE, Dickson G. Retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigen into *mdx* mouse myoblasts *in vitro*. *FEBS Lett* 1992 ; 296 : 128-34.
8. Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusingham A, Wolff JA, Davies KE. Human dystrophin expression in *mdx* mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991 ; 352 : 815-8.
9. Chasse JF, Levrero M, Kamoun P, Minet M, Briand P, Perricaudet M. L'adénovirus, vecteur de thérapie génique ? *médecine/sciences* 1989 ; 5 : 331-7.
10. Stratford-Perricaudet LD, Makeh J, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 1992 ; 90 : 626-30.
11. Stratford-Perricaudet L, Levrero M, Chasse JF, Briand P. Evaluation of the transfer and expression in mice of an enzyme-encoding gene using a human adenovirus vector. *Hum Gene Ther* 1990 ; 1 : 241-56.
12. Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, Yoneyama K, Fukayama M, Stier LE, Paako PK, Gilardi P, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Jallat S, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha-1 antitrypsin gene to the lung epithelium *in vivo*. *Science* 1991 ; 252 : 431-4.
13. Rosenfeld MA, Yoshimura K, Trapnell BC, Yoneyama K, Fukayama M, Rosenthal ER, Bargon J, Stier LE, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Zettlin PL, Guggino KB, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG. *In vivo* transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to the airway epithelium. *Cell* 1992 ; 68 : 143-55.
14. Quantin B, Perricaudet LD, Tajbakhsh S, Mandel JL. Adenovirus as an expression vector in muscle cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 2581-4.
15. Ragot T, Vincent N, Chafey P, Vigne E, Gilgenkrantz H, Couton D, Cartaud J, Briand P, Kaplan JC, Perricaudet M, Kahn A. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of *mdx* mice. *Nature* 1993 ; (sous presse).
16. England SB, Nicholson LVB, Johnson MA, Forrest SM, Love DR, Zubrzycka-GaaRN EE, Bulman DE, Harris B, Davies KE. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46 % of dystrophin. *Nature* 1990 ; 343 : 180-2.