

# Électrochimie & Thérapeutique et Santé

Coordinateur : Fethi Bedioui

L'utilisation d'un courant électrique appliqué sous forme d'impulsions de haut voltage (électroporation perméabilisant les bicouches lipidiques) ou en faible intensité (ionophorèse) montre un potentiel certain pour l'administration de médicaments conventionnels ou d'origine biotechnologique. Ainsi, l'électroporation appliquée après une injection locale d'un plasmide (électrotransfert) augmente l'efficacité de transfection et l'ionophorèse augmente la délivrance transdermique de médicaments, y compris des peptides ou oligonucléotides. Aussi, l'électrochimiothérapie (combinaison d'un traitement systémique ou local par un cytostatique non perméant suivi par des impulsions électriques) élimine localement des tumeurs. L'électrotransfert et l'ionophorèse sont donc des alternatives prometteuses pour l'administration de médicaments et de gènes. Ils constituent aussi une application thérapeutique majeure de l'électrochimie.

\* fethi-bedioui@enscp.fr

## Électrotransfert : concept et historique

### Exemples d'application en thérapie génique

Aurore Burgain, Daniel Scherman et Pascal Bigey

#### Résumé

L'électrotransfert est une technique physique de transfert de gènes efficace qui permet d'introduire des acides nucléiques dans les tissus d'organismes vivants (principalement chez de petits mammifères) par application d'impulsions électriques. Cette méthode peut servir tant à des applications dans le domaine thérapeutique (thérapie génique) qu'en tant qu'outil de laboratoire. Après une brève description des concepts, de l'histoire et des paramètres de cette technique, cet article en détaille la réalisation pratique et la possibilité de l'appliquer à certains tissus. Enfin, il décrit certaines applications possibles au niveau du laboratoire dans le domaine de la thérapie génique, particulièrement dans les cas de modèles inflammatoires, de la myopathie de Duchenne, de la vaccination génétique et du cancer.

#### Mots-clés

**Électrotransfert, acide nucléique, applications, thérapie génique.**

#### Abstract

**Electrotransfer: concept, history and examples of applications in gene therapy**

*In vivo* electrotransfer is an efficient physical means of introducing nucleic acids into tissues of living organisms (mostly rodents or other small mammals). It consists in a nucleic acid injection into the target tissue followed by the delivery of a series of electric pulses. This technique can be a powerful laboratory tool, and can also be used in the medical field of gene therapy. This paper gives a short historic overview of electrotransfer, and a description of the main important parameters. The practical approach is detailed: how to perform the experiment, and which are the main target tissues. Then, a few possible therapeutic applications on small animals are illustrated, mainly regarding inflammatory diseases, Duchenne myopathy, genetic vaccination and cancer.

#### Keywords

**Electrotransfer, nucleic acid, applications, gene therapy.**

Dans les domaines de la biologie expérimentale, il est souvent nécessaire d'avoir à transférer un gène (c'est-à-dire une séquence d'acides nucléiques) à l'intérieur de cellules eucaryotes (cellules possédant un noyau, comme celles constituant les organismes vivants multicellulaires). Cette opération est importante tant sur le plan de l'étude fondamentale en laboratoire du rôle de protéines, que sur le plan de la médecine. Dans ce dernier cas, le transfert de gènes est plus connu sous le nom de thérapie génique. Le concept initial associé à la notion de thérapie génique était la compensation de gènes dont l'altération est responsable de maladies. Puis

cette notion a été étendue à toute utilisation d'acides nucléiques comme nouveau type de médicament, que ce soit des séquences de type acide désoxyribonucléique (ADN) ou de type acide ribonucléique (ARN). Dès lors, elle a rapidement débouché sur des indications débordant largement le cas des maladies génétiques puisqu'un gène médicament peut, entre autres, remplacer n'importe quelle protéine dont il commandera la synthèse et la production même. De multiples applications sont alors envisageables : remplacer un gène déficient, inhiber le fonctionnement d'un gène muté, corriger une mutation ponctuelle, provoquer la mort cellulaire... [1].

Cependant, cette étape particulièrement importante de transfert de gène est ardue sur le plan technique : les acides nucléiques sont des polymères anioniques qui ne traversent pas spontanément la membrane cellulaire hydrophobe, elle-même anionique en surface. Le problème a été résolu de façon suffisamment satisfaisante pour les cellules en culture (*in vitro*) par l'utilisation de composés, comme par exemple des lipides cationiques, qui sont capables de complexer les acides nucléiques et de leur faciliter l'entrée dans les cellules. Dans le cas d'un organisme vivant entier (*in vivo*), ces composés se sont avérés inefficaces, voire toxiques, et différentes stratégies alternatives ont été étudiées [2]. Certaines font appel à des virus défectifs utilisés comme vecteurs, d'autres à des techniques physiques ou chimiques (alors appelées non virales), chacune ayant des avantages et des inconvénients. Nous allons décrire l'une des techniques non virales les plus prometteuses à l'heure actuelle : l'électrotransfert.

## Les barrières au transfert de gènes

L'acide nucléique doit franchir de nombreuses barrières biologiques (extra- et intracellulaires) pour atteindre le noyau des cellules cibles d'un organisme vivant. Brièvement, il doit passer la peau, première barrière biologique, puis être véhiculé jusqu'au tissu cible, passer la barrière vasculaire et les tissus conjonctifs, pour enfin arriver aux cellules cibles. Il doit alors traverser la membrane plasmique délimitant la cellule, traverser le cytosol (en évitant les nucléases) et enfin franchir l'enveloppe nucléaire. C'est donc un parcours semé d'embûches, ce qui explique la difficulté de la réalisation pratique. La membrane cellulaire est une barrière semi-perméable qui contrôle les échanges de molécules entre le cytoplasme et le milieu extérieur. Seul un nombre limité de molécules hydrophobes peut pénétrer dans le cytoplasme en traversant la bicouche lipidique, d'autres peuvent pénétrer par l'intermédiaire de systèmes de transport spécifiques. Mais la plupart des macromolécules hydrophiles, dont les acides nucléiques de type polymère (ADN, ARN), en sont incapables. Dans ce contexte, l'un des problèmes posés aux biologistes était de pouvoir faire traverser cette barrière naturelle par diverses macromolécules afin de les faire entrer dans la cellule.

## L'apparition de l'électrotransfert

En 1982, Eberhard Neumann démontra pour la première fois que de l'ADN pouvait être introduit *in vitro* dans des cellules de souris en suspension grâce à des impulsions électriques [3]. Depuis, cette technologie, nommée électroporation ou électropeméabilisation, a été développée pour être utilisée en routine *in vitro* sur des cellules procaryotes (cellules sans noyau, par exemple les bactéries) et eucaryotes, dans des applications de biologie cellulaire ou de pharmacologie. Très schématiquement, cette technique a pour effet de rendre les membranes cellulaires perméables temporairement par l'application d'impulsions électriques brèves. Ces impulsions induisent une différence de potentiel transmembranaire qui, au-delà d'un certain seuil, induit l'apparition de « pores » au niveau de la membrane plasmique des cellules.

L'optimisation des paramètres électriques permet de rendre cette perméabilisation transitoire et d'obtenir ainsi un bon taux de survie cellulaire.

Ce n'est qu'au début des années 90 que les premières études d'électroporation *in vivo* apparaissent. Elles concernent tout d'abord le transfert de molécules chimiques et non d'ADN. La première réelle démonstration de l'électropeméabilisation sur des cellules d'un tissu *in vivo* a été réalisée sur des tumeurs après injection de l'agent anticancéreux bléomycine [4-5] et application d'impulsions électriques. L'efficacité de la bléomycine dépend de sa concentration intracellulaire mais cette drogue pénètre mal dans les cellules. Il a donc été observé une meilleure pénétration de la bléomycine après application d'impulsions électriques aux tumeurs, conduisant à une plus forte cytotoxicité. Depuis, cette technique a été développée sous le nom d'électrochimiothérapie.

À la fin des années 90, l'électrotransfert *in vivo* voit le jour en parallèle de l'électrochimiothérapie. Cette technique consiste à injecter une solution d'ADN dans le tissu cible et à appliquer une série d'impulsions électriques sur ce même tissu afin de permettre la pénétration cellulaire. Les études mécanistiques de l'électrotransfert d'ADN *in vivo*, primordiales sur le plan de la sécurité et de la toxicité, ne seront pas présentées ici.

## Réalisation pratique

D'un point de vue pratique, l'électrotransfert est une technique particulièrement aisée à mettre en œuvre : une solution aqueuse d'ADN plasmidique (c'est-à-dire un acide nucléique sous forme de molécule circulaire) est injectée dans le tissu cible et des impulsions électriques sont ensuite appliquées grâce à deux électrodes (principalement aiguilles ou plaques) placées de part et d'autre du site d'injection et connectées à un générateur. Ceci permet un transfert de gène localisé à l'endroit choisi. Cette technique est particulièrement efficace dans le muscle squelettique (figure 1), mais est applicable à un grand nombre d'autres tissus (tableau 1). Elle peut également être utilisée quel que soit le modèle animal, et l'on trouve dans la littérature des applications chez de nombreux mammifères, y compris les bovins et les ovins, et même chez les poissons [6].

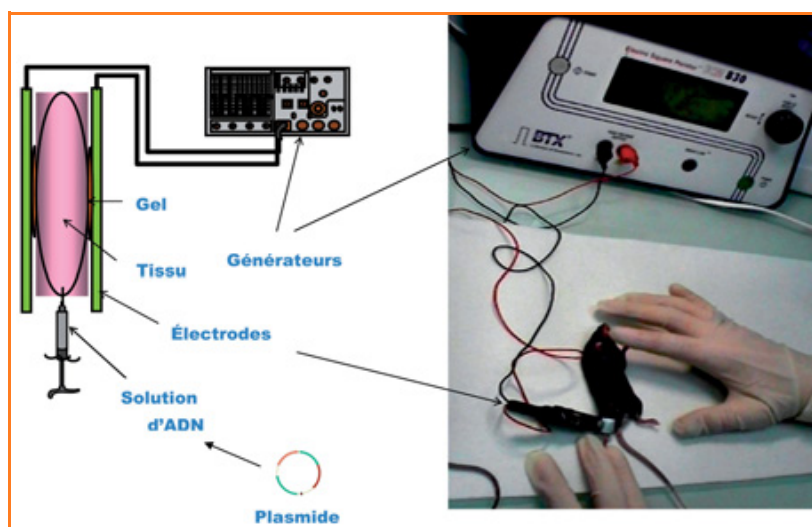


Figure 1 - Illustration de la réalisation pratique de la technique d'électrotransfert dans le muscle squelettique de la souris.

Tableau I - Exemples d'électrotransfert dans différents organes de différentes espèces.

Tissu cible	Espèce
Artère carotide	Lapin
Cartilage	Rat, souris
Cerveau	Souris, poulet, xénope, abeille
Cordon médullaire	Rat
Cornée	Rat, souris
Embryon	Souris, poulet
Foie	Rat, souris
Muscle	Voir <i>tableau II</i>
Ovaire	Souris
Peau	Rat, souris
Poumon	Souris
Rate	Souris
Rein	Rat
Rétine	Rat, souris
Testicule	Souris
Tumeur	Rat, souris
Vessie	Rat

## Détermination des paramètres

L'efficacité du transfert de gènes dépend du tissu visé, du matériel employé et des paramètres utilisés. Il s'agit, au sein de chaque tissu, de pouvoir délivrer des impulsions électriques capables de provoquer la perméabilisation de la membrane des cellules et le transfert d'ADN, tout en restant en deçà du seuil toxique car il s'ensuivrait alors une mort cellulaire locale par nécrose des cellules traitées et une régénération du tissu, ce qui annulerait le bénéfice du traitement (mais ne présenterait pas de toxicité au niveau de l'organisme entier). Les conditions optimales de l'électrotransfert d'ADN dans un tissu donné résultent donc d'un compromis entre l'efficacité du transfert d'ADN et une toxicité minimale au niveau cellulaire.

Le premier choix à faire concerne le type d'électrodes. Ce choix dépend du tissu cible et de la taille de l'animal traité, mais dans tous les cas, il est d'une importance critique et doit être mûrement réfléchi. Lors d'un électrotransfert sur un petit animal, dans un tissu tel que le muscle squelettique, une tumeur ou le foie, la majorité des expérimentateurs utilisent des électrodes composées de deux plaques attachées à une pince (*figure 2*). En effet, ce type d'électrode peut être facilement appliqué en externe de chaque côté du tissu d'intérêt. Pour des animaux de plus grosse taille, les électrodes aiguilles (*figure 2*) sont plus souvent utilisées, car les électrodes plaques nécessiteraient un voltage trop fort du fait de l'écart important entre elles : en effet, c'est le champ

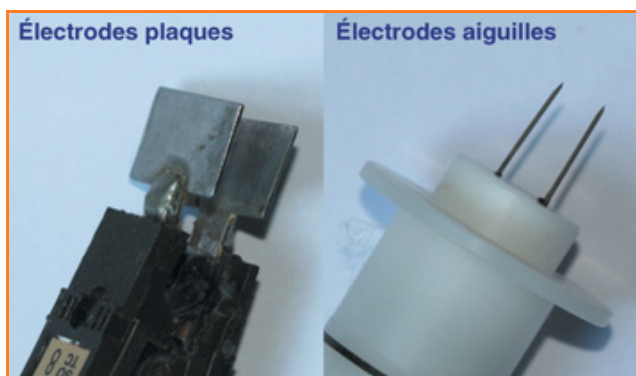


Figure 2 - Exemples d'électrodes plaques à usage externe et d'électrodes aiguilles à usage interne.

électrique qui détermine l'efficacité de l'électrotransfert, et il dépend grossièrement du quotient du voltage appliqué divisé par la distance entre les électrodes. Avec les électrodes choisies, il convient ensuite de déterminer de façon expérimentale le meilleur champ électrique possible, ainsi que les impulsions à appliquer. De nombreux protocoles sont disponibles à ce sujet dans la littérature [1].

## Principaux tissus cibles

### Le muscle squelettique

L'électrotransfert d'ADN dans le muscle squelettique a été découvert de façon indépendante par trois équipes [7-9]. Cet organe est le tissu cible le plus largement utilisé car il offre de nombreux avantages :

- il constitue un large volume du corps facilement accessible ;
- il est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires, qui sont des cellules très allongées parallèles entre elles : de nombreuses fibres auront ainsi une orientation optimale par rapport au champ et pourront être transfectées sur toute la longueur ;
- contrairement aux autres cellules de l'organisme, les cellules musculaires possèdent plusieurs noyaux plaqués contre la membrane cellulaire ce qui facilite le transfert de gène et son expression ;
- les fibres musculaires ont une longue durée de vie car elles ne se divisent pas : cela permet une expression du gène à long terme, en l'absence toutefois de régénération due à une blessure ou une réponse immunitaire cytotoxique ;
- enfin, un avantage majeur du muscle squelettique est sa capacité à produire et sécréter des protéines biologiquement actives dans la circulation sanguine, ce qui permet d'obtenir des effets sur des cibles lointaines et/ou multiples. Ceci est rendu possible par le fait qu'outre les fibres musculaires et le tissu conjonctif qui le constituent, le muscle est parcouru par de nombreux vaisseaux sanguins [10].

Pour toutes ces raisons, le muscle squelettique est une cible de choix pour le transfert de gène. Pour illustrer l'efficacité de ce transfert, nous avons par exemple injecté et électrotransféré de l'ADN plasmidique codant des protéines fluorescentes dans le muscle tibial cranial d'une souris et visualisé, plusieurs jours après l'injection, l'expression de ces protéines sur le plan macroscopique et microscopique (*figure 3*). Des exemples d'électrotransfert dans les muscles squelettiques de différents mammifères sont donnés dans le *tableau II*.



Figure 3 - Exemples d'expression de protéines fluorescentes rouge (DsRed) et verte (GFP) après électrotransfert de l'ADN plasmidique correspondant dans le muscle squelettique de souris de souche C57Bl6. Conditions électriques : 8 impulsions carrées de 20 ms, 200 V/cm, 2 Hz.

### La peau

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

- ce tissu est facilement accessible et une large surface de tissu peut être traitée ;

- les kératinocytes, cellules de l'épiderme, sont capables de synthétiser et de sécréter des protéines thérapeutiques qui atteignent la circulation sanguine ;
- de par sa fonction naturelle de barrière biologique, elle contient des cellules qui présentent des antigènes et est donc un organe de choix pour des applications de vaccination par ADN ;
- les cellules de l'épiderme ont une courte durée de vie, ce qui peut être utile pour des traitements nécessitant une durée d'expression brève.

Cependant, ayant pour fonction principale de protéger l'organisme contre des agressions externes, elle possède une structure élaborée qui ne facilite pas le transfert de gène. En particulier, la couche supérieure (*stratum corneum* ou couche cornée) constitue une importante barrière. L'électrotransfert permet néanmoins d'obtenir un niveau d'expression élevé dans la peau, comme l'illustre la *figure 4* dans le cas d'une protéine fluorescente.

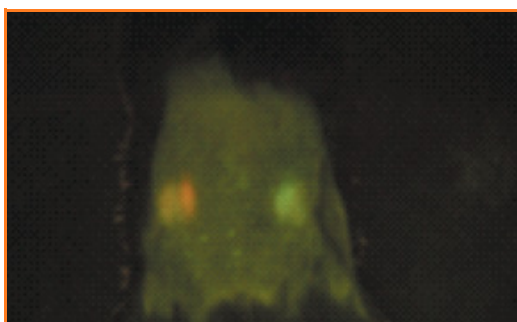


Figure 4 - Exemple d'expression de protéine fluorescente rouge DsRed et verte GFP après électrotransfert dans la peau d'une souris.

40 µg/injection, observation à huit jours après excitation à 540 nm.  
Conditions électriques : 8 impulsions carrées de 20 ms, 200 V/cm, 2 Hz.

D'autres exemples de tissus dans lesquels l'électrotransfert a été décrit sont reportés dans le *tableau I*.

## Applications thérapeutiques

L'électrotransfert n'est pas utilisé actuellement en clinique humaine. En effet, cette technique très récente n'est pas encore suffisamment maîtrisée pour avoir franchi avec succès toutes les étapes d'un développement clinique, et ceci d'autant plus que la thérapie génique suscite actuellement

une certaine méfiance. En conséquence, seuls des essais cliniques sont en cours, concernant exclusivement le domaine du cancer. Les applications dites « thérapeutiques » rapportées dans la littérature portent toutes sur des modèles animaux de pathologies humaines. Les principales applications thérapeutiques envisageables concernent les domaines du cancer, des maladies cardiovasculaires, auto-immunes, monogénétiques, spécifiques d'un organe, et de la vaccination.

### Production de protéines thérapeutiques par le muscle squelettique

L'une des applications les plus importantes de l'électrotransfert est la sécrétion de protéine par le muscle squelettique : il s'agit de transférer dans un des muscles de l'animal un plasmide codant une protéine à usage thérapeutique. Cette protéine sera alors produite par les cellules musculaires, diffusera dans le système vasculaire, et circulera dans tout l'organisme. Les exemples rapportés dans le *tableau III* ont tous montré une amélioration des symptômes de la pathologie concernée.

Nous pouvons illustrer l'intérêt de l'électrotransfert par un exemple concret : le traitement d'une arthrite expérimentale induite au collagène chez la souris [11]. Cette arthrite est considérée comme un bon modèle de la polyarthrite rhumatoïde humaine, le plus fréquent des rhumatismes inflammatoires chroniques, qui aboutit à une destruction articulaire. Elle affecte 0,3 % de la population adulte, majoritairement les femmes (80 %), et sa cause initiale reste inconnue. Elle peut survenir à n'importe quel âge mais débute le plus souvent entre 35 et 55 ans, et représente un véritable problème de santé publique car elle est très invalidante : 50 % des malades ont arrêté leur activité professionnelle moins de cinq ans après le début de la maladie et leur durée de vie est réduite en moyenne de cinq à dix ans. Dans cette pathologie inflammatoire, une cytokine, le TNF- $\alpha$ , joue un rôle prépondérant. Les traitements les plus efficaces à l'heure actuelle consistent en des injections périodiques d'inhibiteurs du TNF- $\alpha$ , qui sont des protéines recombinantes (protéines produites par les techniques industrielles de génie génétique, par exemple l'éta nercept). La *figure 5* montre une comparaison des effets obtenus sur l'arthrite au collagène par traitement soit avec l'éta nercept, soit par électrotransfert d'un plasmide codant un inhibiteur du TNF- $\alpha$  (soit un équivalent de l'éta nercept). Le score clinique indiqué en ordonnée est une

Tableau II - Exemples d'électrotransfert dans le muscle squelettique de différentes espèces de mammifères.

Espèce	Électrodes	Conditions électriques			
		Voltage	Impulsions	Durée	Fréquence
Souris	Plaques	200 V/cm	8	20 ms	1-2 Hz
	Aiguilles	90 V/cm	1 000, bipolaires	1 s	10 trains
Rat	Aiguilles	200 V/cm	8	50 ms	1 Hz
Lapin	6 aiguilles	200 V/cm	6	50 ms	1 Hz
Cochon d'Inde	6 aiguilles	200 V/cm	6	50 ms	1 Hz
Cochon	Plaques	200 V/cm	6	60 ms	1 Hz
	Aiguilles	200 V/cm	6, bipolaires	20 ms	5 Hz
Mouton	Aiguilles	150-200 V/cm	1 000	200 µs	10 trains, 1 s
Chèvre	Aiguilles	150-200 V/cm	1 000	200 µs	5-10 trains, 1-2 s
Vache	Aiguilles	150-200 V/cm	1 000	200 µs	5-10 trains, 1-2 s
Macaque	6 aiguilles	200 V/cm	6 impulsions	50 ms	1 Hz

Tableau III - Exemples de protéines produites par le muscle squelettique après électrotransfert d'ADN dans les principaux domaines d'application thérapeutique envisageables.

Domaine thérapeutique	Protéine codée
Cancer	Cytokines : IL-12, IFN- $\alpha$ Peptide ligand de FGF-2 Inhibiteur de métalloprotéase Fragment du plasminogène Endostatine
Maladies cardiovasculaires	IL-10, IL-18, PAF acétyl hydrolase (athérosclérose) IL-10, IL-18, VEGFB; FGF1 (ischémie) IL-10, IL1-Ra (infarctus)
Maladies génétiques	Facteur VIII, facteur IX (hémophilie) EPO (bêta-thalassémie) Follistatine, dystrophine, lamini $\alpha$ 2 (myopathies)
Maladies auto-immunes ou désordres métaboliques	Récepteur au TNF- $\alpha$ , IL-1Ra, POMC (arthrite rhumatoïde) EPO (anémies) Insuline, pro-insuline, IGF-1, IL-4 (diabète)
Maladies spécifiques d'un organe	Récepteur au TNF- $\alpha$ , plasminogène (maladies oculaires) BMP-2, BMP-4 (régénération de l'os) HGF (régénération du foie) IGF-1 (régénération du muscle)
Vaccination et production d'anticorps	Antigène HbsAg du virus de l'hépatite B Glycoprotéine de l'enveloppe du virus de l'hépatite C Hémagglutinine du virus de la grippe Fragment de toxines botuliques ou tétaniques Protéines du parasite <i>Plasmodium yoelii</i>

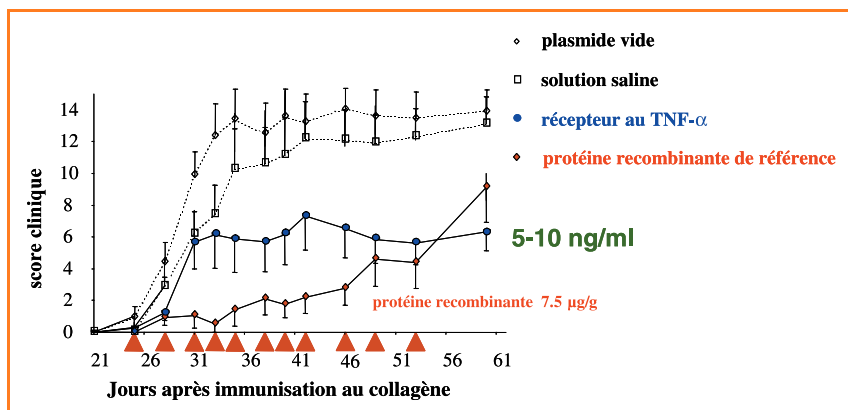


Figure 5 - Exemple de l'effet thérapeutique obtenu dans le cas d'une arthrite au collagène expérimentale chez la souris après traitement par électrotransfert d'un plasmide codant un récepteur au TNF- $\alpha$ .

Un seul traitement a eu lieu au jour 23. Les flèches rouges indiquent des traitements répétés par injection de la protéine recombinante de référence (étanercept) utilisée en clinique. Le score clinique représente l'état de la pathologie : plus il est élevé, plus la pathologie est sévère.

observation visuelle subjective de l'état de la maladie : elle correspond à l'état inflammatoire des articulations (gonflement, rougeurs...). Plus ce score est élevé, plus l'articulation est atteinte. On constate que le traitement par électrotransfert intramusculaire conduit à une stabilisation de la maladie à long terme, comparable au résultat obtenu avec l'étanercept. Cependant, ce résultat est obtenu avec un seul traitement par électrotransfert, alors qu'il faut administrer l'étanercept tous les deux à trois jours pour garder la pathologie sous contrôle. D'autre part, la concentration sanguine de protéine est beaucoup plus faible dans le cas de l'électrotransfert, ce qui limite les risques d'effets secondaires

éventuels, propres à toute utilisation de médicament à forte dose, et donne tout son intérêt à la technique.

Le même principe d'électrotransfert d'ADN codant une protéine destinée à la circulation générale a permis d'obtenir des résultats prometteurs dans des modèles d'anémie ou de  $\beta$ -thalassémie (malformation des globules rouges) avec l'érythropoïétine, d'hémophilie A ou B (facteur de coagulation VIII ou IX), d'inflammation (cytokines IL-4, IL-10, ou inhibiteur du TNF- $\alpha$ ) ou de diabète (insuline ou pro-insuline) (voir [1] pour des références).

Un autre exemple est celui de la myopathie de Duchenne, maladie musculaire génétique dans laquelle les fibres musculaires sont fragiles, dégénèrent et meurent (par absence d'une protéine appelée dystrophine). Il a été montré que l'électrotransfert d'un ADN codant la follistatine, une protéine qui favorise la croissance du muscle, permettait d'obtenir des fibres musculaires de plus gros diamètre, donc plus résistantes. Ceci est illustré sur la figure 6, représentant des coupes transversales de muscle squelettique de souris mdx dystrophiques (qui sont un modèle admis de la myopathie humaine) traitées soit par un ADN non codant (A), soit par un ADN codant la follistatine (B). La figure montre en vert les membranes des cellules musculaires. Comme ce sont des cylindres en coupe transversale, on observe directement le diamètre de ces cellules, qui est en moyenne beaucoup plus important en B. Bien que la pathologie ne soit pas soignée par ce traitement, la follistatine n'en étant pas la cause, ces résultats montrent que l'électrotransfert d'ADN dans le muscle squelettique permet d'obtenir des effets physiologiques importants.

### Vaccination ou production d'anticorps par immunisation génétique

La possibilité d'obtenir une immunisation par injection d'un ADN a été démontrée pour la première fois il y a une dizaine d'années [12]. Cela consiste à injecter directement dans le muscle squelettique ou la peau les gènes codant les protéines immunogènes. L'organisme produit ensuite lui-même ces antigènes qui vont induire la réaction immunitaire. Il est maintenant bien établi que

l'immunisation par ADN induit une réponse durable à la fois cellulaire et humorale [13-14], bien que le mécanisme conduisant à cette réponse ne soit pas entièrement élucidé. Ce type d'immunisation est souvent développé dans un but vaccinal (protection antivirale ou antibactérienne), mais on peut également l'utiliser pour provoquer chez l'animal la production d'anticorps contre l'antigène choisi. Une bien meilleure efficacité de transfert de gène étant obtenue en utilisant la technique physique d'électrotransfert, ceci permet d'améliorer l'expression des protéines de plusieurs ordres de grandeur, et en conséquence le titre en anticorps et la qualité de la réponse.

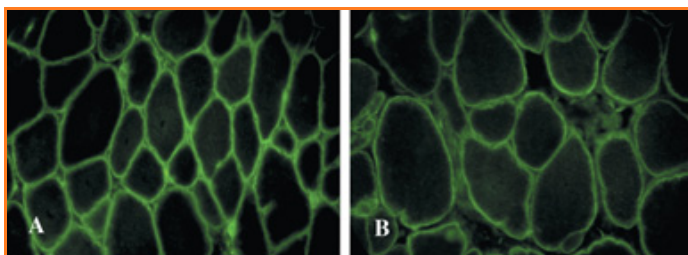


Figure 6 - Coupes transversales de muscles squelettiques de souris dystrophique de souche mdx. A : souris traitée par un ADN non codant (contrôle); B : souris traitée par un ADN codant la follistatine (électrotransfert).

Le marquage vert correspond à la membrane des fibres musculaires.

Plusieurs études récentes montrent l'intérêt de la technique d'électrotransfert lors de l'immunisation par ADN. On trouvera quelques exemples dans le *tableau III*. Le titre en anticorps produits augmente d'un facteur 100 chez la souris après électrotransfert d'un plasmide codant un antigène de surface du virus HBV (hépatite B) [15]. Des titres élevés en anticorps ont également été obtenus chez la souris et le lapin après électrotransfert intramusculaire d'un plasmide codant une glycoprotéine de l'enveloppe du virus de l'hépatite C [16], et chez la souris après électrotransfert d'un plasmide codant une protéine du bacille de la tuberculose [17]. L'électrotransfert d'un plasmide codant l'hémagglutinine de la grippe induisait une meilleure réponse immunitaire chez la souris qu'une simple injection intramusculaire [18]. Ces quelques exemples montrent qu'il est possible d'obtenir des anticorps neutralisants chez l'animal par électrotransfert d'ADN.

L'immunisation génétique est un concept totalement novateur en vaccination. Cette méthode simple et peu coûteuse présente plusieurs avantages : l'antigène est produit généralement sous sa forme native et de façon prolongée par les cellules de l'organisme, ce qui peut permettre d'éviter le recours aux rappels pour certains vaccins, et cette stratégie ne présente aucun risque d'infection post-vaccinale. Comme cette technique est également applicable à des animaux plus gros tels que la chèvre ou les bovins, après anesthésie locale [19], on peut envisager de produire ainsi des antisérum à usage clinique. Il faut cependant noter qu'à l'heure actuelle, ce type de vaccination n'est pas encore aussi efficace que la vaccination classique par protéine recombinante ou micro-organismes entiers atténués.

## Cancer

Le cancer représente le principal domaine d'application de la thérapie génique et l'électrotransfert y est également utilisé [20]. On peut globalement regrouper en quatre grands concepts les différentes stratégies envisageables contre le cancer en thérapie génique :

- stimulation de la réponse immunitaire contre une tumeur selon le principe de la vaccination,
- utilisation de gènes suicides,
- réparation des défauts du cycle cellulaire causés par la perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'activation inappropriée d'oncogènes,
- inhibition de l'angiogenèse (croissance des vaisseaux sanguins) tumorale.

Actuellement, la voie la plus avancée est la stimulation de la réponse immunitaire, ou vaccination contre le cancer. Le

principe est d'électrotransférer dans le muscle un ADN plasmidique codant un antigène associé au type de tumeur concerné. L'organisme produit alors cet antigène et, comme dans le cas de la vaccination décrite précédemment, réagit par une réponse immunitaire appropriée éliminant le transgène. Comme les cellules tumorales expriment également cet antigène, elles sont aussi reconnues et éliminées. Le premier essai clinique chez l'Homme selon ce principe est en cours aux États-Unis par la société Inovio, dans le cas d'un mélanome (cancer de la peau).

La *figure 7* montre que l'électrotransfert dans le tissu tumoral est également possible. Dans cette expérience, un plasmide empêchant l'expression de la protéine MBD2 (dont il sera ici admis qu'elle est une cible intéressante contre certains cancers) est électrotransféré directement dans la tumeur. Un ARN antisens est un ARN complémentaire d'un ARN messager. Le principe est une hybridation à l'ARN messager de la protéine visée, ce qui va résulter en une inhibition de l'expression de cette protéine. Dans le cas présent, cette stratégie nous a permis de montrer que l'inhibition de la protéine MBD2 provoque un retard de croissance important de tumeurs implantées sur des souris. Ce résultat permet de valider le fait que MBD2 est une cible intéressante dans le cas de la lutte contre le cancer.

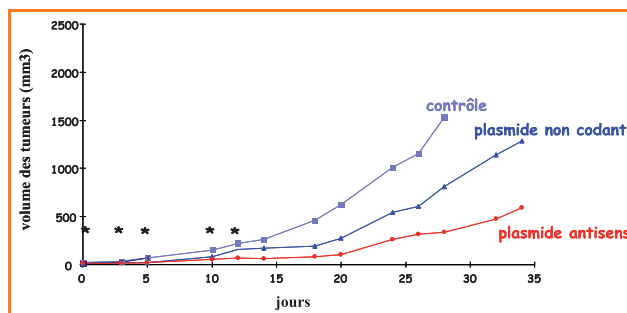


Figure 7 - Effet antitumoral obtenu après électrotransfert intratumoral d'un plasmide codant un ARN antisens de l'ARN messager de la protéine MBD2.

Les astérisques indiquent les traitements par électrotransfert de tumeurs implantées dans les flancs de souris.

## Conclusion

L'électrotransfert est une technique physique de transfert de gènes (ou d'acides nucléiques en général) dans les tissus d'un organisme vivant. Elle est raisonnablement efficace et très simple à mettre en œuvre, sous réserve de disposer d'un générateur électrique. Depuis la découverte de son efficacité dans le muscle squelettique à la fin des années 90, l'électrotransfert est devenu un outil de laboratoire particulièrement utile et très répandu dans les domaines de la thérapie génique ou de l'étude fonctionnelle de gènes. Les études des paramètres expérimentaux, ainsi que les développements apportés au matériel (générateur, électrodes) ont permis d'étendre son application à de nombreux animaux ; et même si le muscle reste le tissu le plus utilisé, il est maintenant possible d'électrotransférer presque tous les organes.

Par ailleurs, de très nombreuses études ont montré que l'on peut envisager d'utiliser cette technique dans des buts thérapeutiques. Cependant, l'état actuel des connaissances, encore trop superficiel en ce qui concerne certains domaines (notamment la toxicité, la durée d'expression des gènes, ou tout simplement l'impossibilité de stopper cette expression

en cas de problème) rend prématuré son utilisation chez l'Homme. Il est fort probable que les premières applications thérapeutiques verront le jour dans le domaine vétérinaire, avant le passage à l'Homme. Néanmoins, celui-ci peut se justifier dans le cas de pathologies particulièrement graves, où le pronostic vital à très court terme est engagé. C'est le but des essais cliniques de vaccination antitumorale actuellement en cours. Leurs résultats donneront d'importantes informations sur les possibles développements cliniques de cette technique.

## Références

- [1] Trollet C., Bloquel C., Scherman D., Bigey P., Electrotransfer into skeletal muscle for protein expression, *Current Gene Ther.*, **2006**, 6(5), p. 561.
- [2] Trollet C., Transfert de gènes *in vivo* : étude, régulation et applications de l'électrotransfert, *Thèse de doctorat*, Université Paris 6, **2005**.
- [3] Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H., Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields, *Embo J.*, **1982**, 1, p. 841.
- [4] Belehradek J., Orlowski J.S., Ramirez L.H., Pron G., Poddevin B., Mir L.M., Electroporation of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin, *Biochim Biophys Acta*, **1994**, 1190, p. 155.
- [5] Mir L.M. *et al.*, Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy, *Br. J. Cancer*, **1998**, 77(12), p. 2336.
- [6] Rambabu K.M., Rao S.H., Rao N.M., Efficient expression of transgenes in adult zebrafish by electroporation, *BMC Biotechnol.*, **2005**, 13(5), p. 29.
- [7] Mir L., Bureau M., Gehl J., Rangara R., Rouy D., Caillaud J., Delaere P., Branellec D., Schwartz B., Scherman D., High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, *Proc. Natl. Aca. Sci. USA*, **1999**, 96, p. 4262.
- [8] Aihara H., Miyazaki J., Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*, *Nat. Biotechnol.*, **1998**, 16(9), p. 867.
- [9] Mathiesen I., Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*, *Gene Ther.*, **1999**, 6, p. 508.
- [10] Goldspink G., Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol Metab.*, **2003**, 17, p. 211.
- [11] Bloquel C., Bessis N., Boissier M.-C., Scherman D., Bigey P., Gene therapy of collagen-induced arthritis by electrotransfer of hTNF- $\alpha$  soluble receptor I variants, **2004**, *Hum. Gene Ther.*, 15(2), p. 189.
- [12] Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dworki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., DeWitt C.M., Friedman A., Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein, *Science*, **1993**, 259, p. 1745.
- [13] Gurunathan S., Klinman D.M., Seder R.A., DNA vaccines: immunology, application, and optimization, *Annu. Rev. Immuno.*, **2000**, 18, p. 927.
- [14] Quinn A., Jiang W., Velaz-Faircloth M., Cobb A.J., Henry S.C., Frothingham R., *In vivo* protein expression and immune responses

generated by DNA vaccines expressing mycobacterial antigens fused with a reporter protein, *Vaccine*, **2002**, 20, p. 3187.

- [15] Widera G., Austin M., Rabussay D., Goldbeck C., Barnett S.W., Chen M., Leung L., Otten G.R., Thudium K., Selby M.J., Ulmer J.B., Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation *in vivo*, *J. Immunol.*, **2000**, 164, p. 4635.
- [16] Zucchelli S., Capone S., Fattori E., Folgori A., Di Marco A., Casimiro D., Simon A.J., Laufer R., La Monica N., Cortese R., Nicosia A., Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer, *J. Virol.*, **2000**, 74, p. 11598.
- [17] Tollefsen S., Tjelle T., Schneider J., Harboe M., Wiker H., Hewinson G., Huygen K., Mathiesen I., Improved cellular and humoral immune responses against Mycobacterium tuberculosis antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation, *Vaccine*, **2002**, 20, p. 3370.
- [18] Bachy M., Boudet F., Bureau M., Girerd-Chambaz Y., Wils P., Scherman D., Méric C., Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse, *Vaccine*, **2001**, 19, p. 1688.
- [19] Tollefsen S., Vordermeier M., Olsen I., Storset A.K., Reitan L.J., Clifford D., Lowrie D.B., Wiker H.G., Huygen K., Hewinson G., Mathiesen I., Tjelle T.E., DNA injection in combination with electroporation: a novel method for vaccination of farmed ruminants, *Scand. J. Immunol.*, **2003**, 57, p. 229.
- [20] Tamura T., Sakata T., Application of *in vivo* electroporation to cancer gene therapy, *Curr Gene Ther.*, **2003**, 3, p. 59.



A. Burgain



D. Scherman



P. Bigey

**Aurore Burgain** est doctorante, **Daniel Scherman** est directeur de recherche et **Pascal Bigey** (auteur correspondant) est maître de conférences au Laboratoire de Pharmacologie chimique et génétique, Paris\*.

\* Laboratoire de Pharmacologie chimique et génétique [Inserm (U640)/CNRS (UMR 8151)/ENSCP/Université Paris 5], ENSCP, 11 rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris.  
Courriels : aurore.burgain@parisdescartes.fr, daniel.scherman@parisdescartes.fr, pascal.bigey@parisdescartes.fr

[Le CNRS](#) | [Annuaire](#) | [Mots-Clefs CNRS](#) | [Autres sites](#)

## CNRS Formation Entreprises

du 25 au 29 mai 2009 à PARIS (75) **Modélisation et Chimométrie (Nouveau)**

du 27 au 29 mai 2009 à MELLE (79) **Micropolluants organiques : optimisation de l'analyse HPLC (Nouveau)**

du 8 au 12 juin 2009 à VILLEURBANNE (69) **Catalyse et environnement : mise en œuvre des matériaux catalytiques**

du 22 au 24 juin 2009 à GIF SUR YVETTE (91) **Le risque chimique : connaissance et prévention niveau II**

du 15 au 19 juin 2009 à MONTPELLIER (34) **Synthèse, caractérisation et purification de chimiothèques**

du 16 au 19 juin 2009 à PARIS (75) **Outils de caractérisation de particules colloïdales en suspension**

du 22 au 24 juin 2009 à LE MANS (72) **Introduction à la rhéologie et à la rhéométrie : module viscoélasticité linéaire**

du 22 au 26 juin 2009 à PARIS (75) **Perfectionnement en spectrométrie de masse : méthodes d'ionisation, désorption, spectrométrie de masse en tandem : applications analytiques (Nouveau)**

**Centre de ressources en formation**  
Un problème de formation particulier ?  
N'hésitez pas à nous consulter :  
- par mail à [ressources@cf.cnrs-gif.fr](mailto:ressources@cf.cnrs-gif.fr)  
- par téléphone au 01.69.82.44.96

**Catalogue, programmes et inscriptions : CNRS Formation Entreprises** Avenue de la Terrasse Bât. 31 91198 Gif-sur-Yvette Cedex  
Tél. : 01 69 82 44 55 - Fax : 01 69 82 44 89 <http://cnrsformation.cnrs-gif.fr>