

## Le Transfert Génétique pour Prévenir ou pour Traiter le Diabète de Type 1

PAR GÉRALD J. PRUD'HOMME, MD, FRCPC

Les organes endocrines sont fréquemment la cible de l'auto-immunité, du fait d'une dégradation de la tolérance immunitaire. Cela se produit, rarement, dans le thymus, du fait de mutations dans le gène régulateur de l'auto-immunité (AIRE) et cela se traduit par une insuffisance d'élimination des thymocytes qui réagissent fortement aux auto-antigènes (insuline et bien d'autres). Les patients dans ce cas vont développer le syndrome auto-immun de polyendocrinopathie, candidose et dystrophie ectodermique (APECED). Toutefois, la plupart des maladies auto-immunes semblent résulter de défauts dans les mécanismes de tolérance périphérique. Cette tolérance dépend de l'expression, par les lymphocytes T, de molécules immuno-inhibitrices (CTLA-4, PD-1, par exemple) et de cytokines régulatrices (suppressives) (comme par exemple, le facteur de croissance transformant bêta [TGF- $\beta$ ] et l'interleukine 10). Les lymphocytes T régulateurs (Treg ou Tr) sont également d'une importance critique. Le gène Fox p3 est essentiel pour la reproduction des lymphocytes Tr et des mutations dans ce gène provoquent quelques unes des perturbations auto-immunes les plus sévères, tels que le syndrome IPEX (dysrégulation immunitaire, polyendocrinopathie, entéropathie lié au chromosome X). Nos études démontrent que le transfert génétique de molécules immuno-régulatrices peut prévenir le diabète de type 1 (T1DM) ainsi que d'autres maladies auto-immunes. La thérapie génique non virale se pratique en injectant des vecteurs plasmidiques dans les tissus (habituellement dans les muscles squelettiques) et en appliquant des courants électriques de faible intensité, afin de créer des pores dans les membranes cellulaires : ce qui permet à l'ADN de pénétrer au sein des cellules (électroporation in vivo [EP]). Une technique similaire est utilisée pour pratiquer une vaccination ADN contre des auto-molécules (antigènes des cellules des îlots de Langerhans, par exemple) et quand elle est associée à des ligands immunitaires appropriés, elle provoque la reproduction des lymphocytes Tr. Une vaccination ADN peut rétablir la tolérance et protéger contre certaines endocrinopathies auto-immunes. In vivo, l'EP peut également être utilisée pour délivrer des hormones peptidiques et de nombreux autres médicaments protéiques cliniquement importants.

Les organes endocrines sont les cibles les plus fréquentes de l'auto-immunité et ceci du fait d'une dégradation de la tolérance immunitaire centrale ou périphérique. Les mécanismes qui régulent la tolérance sont complexes et agissent au niveau de l'immunité aussi bien innée qu'adaptative. Dans cette discussion, nous allons considérer, essentiellement, les mécanismes qui régulent l'immunité d'adaptation chez les lymphocytes T, par exemple, les lymphocytes T auxiliaires (Th1 et Th2), les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) et les lymphocytes T régulateurs (Treg ou Tr).

Dans le cas des lymphocytes T, la tolérance centrale est acquise dans le thymus, où les thymocytes subissent une sélection positive et négative. Quand la sélection négative échoue, il y a libération de lymphocytes T qui sont autoréactifs et qui, très vraisemblablement, sont à l'origine de l'auto-immunité. Il y a peu de maladies auto-immunes pour lesquelles une insuffisance de tolérance centrale a pu être clairement impliquée, mais il en a été observée chez des patients dont le gène AIRE, qui encode pour un facteur de transcription, a subi des mutations. De telles mutations provoquent l'APECED qui se transmet héréditairement sur le mode autosomique récessif<sup>1,2</sup>. Le gène AIRE contrôle l'expression et la présentation de nombreux auto-antigènes (insuline, par exemple), dans les cellules épithéliales médullaires du thymus: il joue un rôle d'une importance critique pour l'élimination des lymphocytes T auto-réactifs. Dans l'APECED, les lymphocytes T auto-réactifs ne sont pas correctement supprimés et l'on observe qu'une auto-immunité et une inflammation affectent de nombreux tissus, dont les îlots de Langerhans (ce qui peut provoquer un T1DM) et d'autres organes endocrines.

Cependant, la plupart des maladies auto-immunes semble résulter d'anomalies dans la tolérance périphérique<sup>3</sup>. Les mécanismes de tolérance extra-thymique sont importants car tous les lymphocytes T auto-réactifs ne sont pas supprimés dans le thymus. En effet, certains lympho-



Leading with Innovation  
Serving with Compassion

**ST. MICHAEL'S HOSPITAL**

*A teaching hospital affiliated with the University of Toronto*



### Membres de la Division d'endocrinologie et du métabolisme à l'Hôpital St. Michael

LAWRENCE LEITER, MD (CHEF)  
RÉDACTEUR, *ENDOCRINOLOGIE*  
CONFÉRENCES SCIENTIFIQUES

GILLIAN BOOTH, MD  
ALICE CHENG, MD  
PHILIP CONNELLY, PHD  
CHRISTINE DERZKO, MD  
RICHARD GILBERT, MD  
JEANNETTE GOGUEN, MD  
LOREN GROSSMAN, MD  
AMIR HANNA, MD  
SOPHIE JAMAL, MD  
DAVID JENKINS, MD, PHD  
ROBERT JOSSE, MD  
MARIA KRAW, MD  
TIM MURRAY, MD  
DOMINIC NG, PHD, MD  
LETICIA RAO, PHD  
JOEL RAY, MD  
WILLIAM SINGER, MD  
VLAD VUKSAN, PHD  
QINGHUA WANG, MD, PHD  
TOM WOLEVER, MD, PHD  
MINNA WOO, MD, PHD  
ROBERT ZEMAN, MD

Hôpital St. Michael

6121-61, rue Queen  
Toronto (Ontario) M5C 2T2  
Fax : (416) 867-3696

Les opinions exprimées dans cette publication ne reflètent pas nécessairement celles de la Division d'Endocrinologie et du Métabolisme, Hôpital St. Michael, l'Université de Toronto, du commanditaire de la subvention à l'éducation ou de l'éditeur, mais sont celles de l'auteur qui se fonde sur la documentation scientifique existante. On a demandé à l'auteur de révéler tout conflit d'intérêt potentiel concernant le contenu de cette publication. La publication d'*Endocrinologie – Conférences scientifiques* est rendue possible grâce à une subvention à l'éducation sans restrictions.

cytes T, potentiellement auto-agressifs, (ayant peut-être une faible affinité pour les auto-antigènes) sont normalement libérés à partir du thymus et doivent être constamment maintenus sous le contrôle de divers mécanismes, dont l'expression de molécules immuno-inhibitrices par des lymphocytes T, telles que les CTLA-4 et les PD-1 et la production de cytokines régulatrices telles que les TGF- $\beta$  et l'interleukine 10 (IL-10), soit par des lymphocytes T soit par d'autres cellules<sup>3</sup>.

L'immunité subit d'autres contrôles de la part de différents types de lymphocytes T<sup>4,7</sup>, que l'on peut, grossièrement diviser en deux sous-groupes:

- les lymphocytes Tr naturels, du phénotype CD4+ CD25+ qui, chez l'homme, représentent 2 % à 3 % des lymphocytes T CD4+,
- les lymphocytes Tr induits par stimulation (ou d'adaptation) que l'on a identifiés dans plusieurs modèles d'inflammation, d'alloréactivité ou d'autoimmunité.

À l'opposé des lymphocytes Tr naturels, les lymphocytes Tr induits se différencient probablement des lymphocytes T CD4+ et CD25+ naïfs et agissent essentiellement en sécrétant des cytokines régulatrices telles que le TGF- $\beta$ 1 (cellules Th3) ou l'IL-10 et le TGF- $\beta$ 1 (cellules Tr1)<sup>8</sup>.

Les lymphocytes Tr CD4+ CD25+ naturels, (libérés à partir du thymus, à l'état de lymphocytes Tr différenciées), jouent un rôle important en limitant l'auto-immunité et semblent agir par un mécanisme cytokine-indépendant, mais contact-dépendant<sup>4</sup>. Le gène Fox p3, codant pour un régulateur de transcription, semble être nécessaire à la différenciation du Tr naturel et d'au moins quelques lymphocytes Tr induits<sup>7</sup>. Une mutation du gène Fox p3 provoque, chez la souris squameuse, en l'absence de ces lymphocytes Tr, une mort précoce provoquée par une maladie inflammatoire multiorganique. Les mutations du gène Fox p3 chez l'homme provoquent un syndrome auto-immunitaire sévère, lié au chromosome X, (appelé « IPEX »)<sup>8</sup>, (Tableau 1), caractérisé, habituellement, par une entéropathie, une polyendocrinopathie, (T1DM, troubles thyroïdiens) et de l'eczéma. Ce syndrome apparaît tôt après la naissance : c'est l'une des maladies auto-immunes les plus sévères. Les patients en question développeront un diabète auto-immun (T1DM), souvent dans les jours qui suivent la naissance. L'issue de l'IPEX est, habituellement, fatale chez le nourrisson et dans la première enfance et le seul traitement efficace est la greffe de moelle, que l'on doit pratiquer très tôt<sup>8-10</sup>.

### Les CTLA-4 (CD 152) et les molécules régulatrices négatives associées

Le régulateur négatif CTLA-4 est la molécule inhibitrice, exprimée par un lymphocyte T, la mieux étudiée et, sans doute la plus puissante<sup>3</sup>. Elle est exprimée par les lymphocytes T après activation et, à l'instar de la molécule co-activante CD28, se lie au B7-1 (CD 80) et au B7-2 (CD 86), sur les membranes des cellules présentant des antigènes (APCs). Elle régule alors négativement la réactivité des lymphocytes T par des mécanismes qui ne sont pas complètement élucidés. Il est à noter que les CTLA-4 délivrent, tout de suite après l'activation des lymphocytes T, un signal qui permet de rendre ces lymphocytes T sensibles au TGF- $\beta$  et qui semble, également, essentiel à l'expression du Fox p3 et à la différenciation des Tr<sup>11-12</sup>. Il semble donc que les CTLA-4, TGF- $\beta$  et Fox p3 sont des molécules qui oeuvrent ensemble à la reproduction des lymphocytes Tr induits. Leur importance est mise en évidence par le fait que l'inactivation

**Tableau 1 : Maladies inflammatoires pluriorganiques – associée à une insuffisance d'induction de tolérance**

Protéine déficiente (espèces)	Nom de la maladie	Tissus cible de l'auto-immunité	Défaut de tolérance
AIRE (h, m)	APECED	multi-organe (polyendocrinopathies)	central, thymus délétion clonale réduite
TGF- $\beta$ 1 (m)	gène KO	multi-organe (mort précoce)	Périphérique (Tr et autres cellules)
CTLA-4 (m)	gène KO	multi-organe (mort précoce)	Périphérique (lymphocytes T hyperactifs)
Foxp3 (h, m)	IPEX	multi-organe (mort précoce) T1DM très précoce	Périphérique (manque de lymphocytes T)

m = souris ; h = humain ;

AIRE = régulateur auto-immun (facteur de transcription) ;

APECED = syndrome de polyendocrinopathie - candidose-dystrophie ectodermique ; CTLA-4 = antigène 4 des lymphocytes T cytotoxiques (appelés également CD152) ; IPEX = syndrome lié au chromosome X d'immunodysrégulation, polyendocrinopathie, entéropathie ; Foxp3 = case p3 tête de fourche, (facteur de transcription) ; T1DM = diabète de type 1

de ces trois gènes, chez la souris, entraîne une mort précoce (à l'âge de 3 ou 4 semaines) due à une maladie inflammatoire multiorganique (Tableau 1)<sup>3</sup>.

La molécule CTLA-4 est sous exprimée chez la souris prédisposée au diabète auto-immun, diabétique non obèse (NOD). Chez l'homme, certains polymorphismes du gène qui modifient les taux ou la fonction du CTLA-4, augmentent la susceptibilité au T1DM et aux autres maladies auto-immunes<sup>3</sup>.

### La thérapie génique pour les maladies auto-immunes

Au cours des dernières années, le développement d'approches fondées sur la thérapie génique pour traiter les maladies endocriniennes a suscité un intérêt immense. Le succès de la thérapie génique dépend de l'efficacité de l'insertion des gènes dans les bonnes cellules cibles, sans que cela ne provoque de lésions à la cellule, de mutations oncogènes ou d'inflammation. Il faudrait, également, pouvoir réadministrer le vecteur à plusieurs reprises, en particulier dans le traitement des maladies chroniques. Peu de technologies des vecteurs satisfont à toutes ces exigences. Bien que la majorité des études sur les thérapies géniques aient été réalisées avec des vecteurs viraux, ces derniers sont sérieusement limités au plan de l'immunogénicité et de la pathogénicité. La thérapie génique non virale (essentiellement fondée sur l'utilisation de plasmides) soulève moins de problèmes de sécurité et n'est pas gênée par l'immunogénicité du vecteur, ce qui permet de réadministrer de ces vecteurs. En revanche, sa faible efficacité, en matière de transfection, constitue une limite importante pour la thérapie génique non virale, mais ceci peut être suffisamment amélioré par rapport aux vecteurs viraux, ses rivaux, dans de nombreuses applications. L'une des méthodes les plus efficaces, aux possibilités multiples, pour renforcer le transfert de gènes, consiste à impulser un champ électrique après injection d'acides nucléiques (ADN, ARN, et/ou oligonucléotides) dans les tissus<sup>13</sup>. Cette méthode est fréquemment désignée l'électroporation (EP) *in vivo*. Elle provoque une augmentation transitoire de la perméabilité de la membrane, due, probablement à la formation

de pores intra membranaires, et ce qui permet l'entrée directe des macromolécules.

### Les vecteurs de la thérapie génique non virale

Presque tous les vecteurs non viraux, utilisés jusqu'à présent, sont des plasmides d'expression, que l'on a conçus pour leur forte expression dans les cellules des muscles striés ou dans d'autres cellules<sup>13</sup>. L'élaboration de ces vecteurs est très simple et pratique. Les meilleurs plasmides transportent un puissant promoteur (le plus souvent, le stimulateur-promoteur immédiat-précoce [IE-EP] du cytomégalo virus humain [CMV]), un intron (tel que l'intron A du CMV), un site de clonage multiple pour l'insertion du gène qui nous intéresse et un segment approprié terminateur de transcription. Le CMV IE-EP peut être remplacé par un promoteur endogène spécifique d'un tissu (un promoteur spécifique du muscle, par exemple)<sup>13</sup>. Ceci présente l'avantage de réduire l'expression du vecteur pour un tissu spécifique. De plus, les promoteurs viraux sont sensibles aux cytokines et peuvent être rapidement désactivés en présence d'une inflammation, alors que les promoteurs spécifiques d'un tissu sont habituellement insensibles à l'inflammation et peuvent être exprimés pendant des mois, voire des années.

Le transfert de gène peut se faire dans presque tous les tissus par EP, mais le muscle reste toutefois, et de loin, la cible favorite<sup>13-16</sup>. En effet, l'insertion d'un plasmide dans un muscle (habituellement par injection à l'aide d'une aiguille), en conjonction avec une EP, permet d'utiliser le muscle comme un bio réacteur, pour la production durable, sur le long terme, et pour la sécrétion de protéines dans le torrent circulatoire. L'EP peut s'appliquer par l'intermédiaire d'électrodes implantées dans le muscle (ou parfois contre la peau), à l'endroit où l'ADN est injecté. Suite à la pénétration au sein de la cellule, une fraction des vecteurs plasmidiques injectés atteint le noyau, où la transcription, conduite par le vecteur, va se dérouler.

Des articles de revues récentes traitent des aspects techniques de la thérapie génique non virale, renforcée par l'EP<sup>13-18</sup>. Après l'électrotransfert *in vivo* du gène dans le muscle squelettique, l'expression du gène peut durer de plusieurs semaines à largement plus d'un an, selon la construction et l'espèce. Plus de 300 études recourant à l'injection intramusculaire (i.m.) de plasmides, suivie par une EP, fournissent la preuve que l'on peut obtenir des niveaux adéquats de protéines sécrétées (et dans certains cas, intracellulaires) en utilisant des plasmides de façon simple, sûre et efficace, avec un potentiel significatif de transfert de gène et de vaccination pour un grand nombre d'animaux et d'humains.

### Les risques potentiels

La sécurité de l'ADN administré par injection dans le muscle, a été évaluée sur l'homme et sur plusieurs espèces animales<sup>13</sup>. Tous les résultats montrent que l'ADN plasmidique est généralement bien toléré et qu'il n'y a pas d'effets secondaires sérieux qui soient associés soit aux « squelette » plasmidiques, soit aux différentes « cassettes » d'expressions actives. A noter, toutefois, quelques effets secondaires, dont une contraction du muscle, au moment même de l'application et une douleur locale, habituellement peu sévère.

Historiquement, on avait craint qu'après l'injection, l'ADN s'intégrerait dans les chromosomes de l'hôte receveur et entraînerait une mutagenèse et, potentiellement, une carcinogénèse d'insertion. Des études menées sur l'animal et comportant des injections d'ADN plasmidique, ont montré

que les mutations, à partir d'un événement potentiel d'intégration, étaient extrêmement rares, près de 3000 fois moins que le taux de mutation spontanée que l'on observe pour les génomes des mammifères<sup>13</sup>. Cependant, en cas de vaccination ADN contre des antigènes étrangers, on peut craindre que les cellules musculaires transfectées puissent être attaquées et lésées par le système immunitaire, et ceci a déjà été signalé<sup>13-15</sup>. Une crainte liée réside dans la production d'anticorps anti ADN pathogènes, pouvant être induits par l'ADN plasmidique et ses séquences immunostimulantes (ISS), mais ce risque semble relativement faible. Les ISS consistent en séquences de CpG non méthylé contenant de l'ADN bactérien, qui se lient au récepteur « Toll-like » 9 (ou récepteur TLR 9) des cellules lymphoïdes et activent des réponses immunitaires innées<sup>19-20</sup>. Les lymphocytes B possèdent des mécanismes qui empêchent la production d'anticorps, en réponse à la stimulation CpG, bien que cette tolérance puisse être annihilée. Chez la souris prédisposée au lupus, les taux d'anticorps anti dsADN (à double brin) sont augmentés par l'administration d'ADN plasmidique. Il y a eu, cependant, des rapports contradictoires concernant les effets sur la maladie. En effet, certains auteurs ont signalé que l'injection d'ADN bactérien (porteur de CpG ISS), chez la souris prédisposée au lupus, réduisait la sévérité de la maladie, alors que d'autres rapportaient des effets nuisibles<sup>13</sup>. A l'évidence, les effets des motifs CpG sur le lupus devraient être analysés plus à fond et l'on devrait prendre des précautions spéciales en administrant des plasmides porteurs de CpG à des patients atteints de maladies auto-immunes.

### Les utilisations thérapeutiques de l'électroporation (EP) *in vivo* dans les maladies endocriniennes

#### *Les inhibiteurs des cytokines dans le diabète auto-immun*

Le transfert de cADN codant pour les inhibiteurs des cytokines protège contre de nombreuses maladies auto-immunes sévères<sup>14-15</sup>. L'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  sont habituellement nuisibles, dans les cas de maladies auto-immunes et, de ce fait, leur neutralisation procurera, vraisemblablement, une protection. Ces deux cytokines sont fonctionnellement liées, puisque l'IL-12 induit la production de l'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T et par les cellules NK, tandis que l'IFN- $\gamma$  régule ou augmente plusieurs des effets initiés par l'IL-12. Pour neutraliser l'IFN- $\gamma$ , nous avons construit un vecteur plasmidique qui code pour un récepteur soluble, IgG1-protéine de fusion Fc, de l'IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  R/IgG1-Fc)<sup>21-22</sup>. *In vivo*, l'administration de notre vecteur IFN- $\gamma$  R/IgG1-Fc a bloqué presque complètement l'activité de l'IFN- $\gamma$ . De plus, ce plasmide a agi comme un protecteur dans les modèles de diabète auto-immun, aussi bien naturel qu'induit par des médicaments<sup>21,22</sup>, ce qui est en accord avec le rôle pathogénique présumé de l'IFN- $\gamma$ . Dans tous les cas, cette thérapeutique a réduit la sévérité de l'insulite lymphocytaire et de la fréquence du diabète.

#### *Les applications de la vaccination ADN.*

La vaccination ADN a été étudiée, de manière intensive, comme un moyen de créer une immunité contre les antigènes des agents infectieux et des tumeurs<sup>23-27</sup>: ceci du fait de la simplicité, de la polyvalence et de la sécurité de la méthode. Dans la grande majorité des cas, l'ADN a été administré sous la forme d'un plasmide d'expression, soit nu, soit complexé à d'autres molécules, bien que d'autres types de vecteurs puissent être utilisés. Les plasmides peuvent être

administrés, soit en injections intra-musculaires (i.m.), intradermiques (i.d.)/épidermiques ou sous-cutanées, soit par voie orale (avec vecteur bactérien, par exemple) soit par voie pulmonaire (aérosols) soit par d'autres voies (vaginale par exemple). L'antigène codé par un plasmide est présenté par les APCs provenant de la moelle osseuse qui sont le plus vraisemblablement des cellules dendritiques (DCs).

Comparé à d'autres méthodes, l'avantage présenté par la vaccination ADN réside dans le fait qu'avec elle, la délivrance du gène antigène peut être facilement couplée avec la délivrance de n'importe lequel des nombreux gènes qui modifient la réponse immunitaire. De plus, la présentation de l'antigène se produit à travers, à la fois, la voie CMH classe I ou la voie restreinte CMH II et toutes les armes de la réponse immunitaire sont activées, c'est à dire les lymphocytes Th, les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs) ainsi que l'immunité humorale.

La vaccination ADN s'est montrée efficace chez les rongeurs, mais ses résultats ont été moins impressionnants sur les grands animaux et chez l'homme. On a donc étudié de nombreuses méthodes permettant d'améliorer ces vaccins<sup>25</sup> et il s'est avéré que l'une des plus efficaces a été l'EP *in vivo*. En effet, l'application de l'EP, quel que soit le site d'injection, favoriserait la transfection d'une plus grande variété de cellules, dont les APCs. Comme mécanisme additionnel, des lésions des tissus mous, pouvant être induites par l'EP, pourraient provoquer un afflux d'APCs, induire des signaux de danger (médiateurs de l'inflammation et chimiokines, par exemple) et renforcer la libération d'antigènes par les cellules lésées, augmentant, de ce fait, la présentation d'antigènes.

### La vaccination ADN contre le T1DM

Bien que les vaccins ADN soient habituellement immunostimulants et induisent une immunité contre des antigènes étrangers ou même contre des auto-antigènes (particulièrement ceux des tumeurs), ils protègent soit contre l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) et le T1DM, soit contre d'autres formes d'auto-immunité<sup>23,24</sup>. Toutefois, des effets à la fois bénéfiques et nuisibles se sont produits pour des raisons que l'on a pas élucidées. La souris NOD a spontanément développé un T1DM, dont on sait clairement qu'il s'agit d'une maladie auto-immune, dépendante des lymphocytes T<sup>28</sup>. La réponse auto-immunitaire est dirigée contre plusieurs antigènes exprimés par les cellules bêta du pancréas, parmi lesquels, cependant, seuls l'insuline (et ses peptides précurseurs) et l'acide glutamique décarboxylase 65 (GAD 65) sont les mieux étudiés. Nous, comme d'autres, avons réalisé des études afin de déterminer si la vaccination ADN contre ces antigènes des cellules insulaires pouvait être protectrice<sup>13,23,24</sup>. Nous avons trouvé que la vaccination ADN contre l'insuline ou contre le GAD 65, améliorait la maladie, particulièrement dans le cas où la molécule régulatrice négative CTLA-4 était engagée au moment de la vaccination. En effet, cette procédure a induit des lymphocytes protecteurs Tr qui suppriment l'auto-immunité, au moins en partie, en produisant du TGF- $\beta$ . En effet, cette cytokine a des effets immunosuppresseurs très larges et puissants<sup>3</sup>.

### La thérapie génique appliquée à l'insuline et autres

La transplantation de cellules génétiquement modifiées, capables de produire de l'insuline pour le traitement du diabète insulino-dépendant, ou alors, l'utilisation de la thérapie génique somatique pour fournir de l'insuline, ont suscité un intérêt considérable. Malheureusement, il n'a pas été possible de préparer des cellules non endocriniennes répondant physiologiquement au glucose. Toutefois, une production continue, de faible niveau (niveau de base) d'insuline pourrait être bénéfique pour les patients souffrant de diabète de type 1 ou 2, à condition qu'une hypoglycémie ne soit pas induite. Nous avons étudié une approche de thérapie génique basée sur les muscles pour atteindre cet objectif chez la souris<sup>29</sup>. Cela a nécessité la préparation d'une proinsuline qui puisse être traitée par les cellules non endocriniennes. Le processus de maturation de l'insuline nécessite l'action de deux endopeptidases, proprotéine convertase (PC). La PC2 et la PC1 ou 3 (PC 1/3) sont spécifiquement exprimées dans les cellules bêta des îlots de Langerhans et dans certaines cellules neuro-endocriniennes. Dans les cellules non endocriniennes, un traitement semblable peut être pratiqué en ajoutant des sites de clivage furique, que nous avons ajouté à notre construction.

Nous avons appliqué notre traitement à des souris atteintes de diabète induit par la streptozotocine (STZ)<sup>29</sup>. Cela a nécessité la co-délivrance de 2 plasmides, l'un codant pour une insuline furine clivable, et l'autre codant pour la furine. L'insuline a subi de nouvelles mutations visant à accroître son activité, et une EP a été utilisée *in vivo* dans le but d'amplifier le transfert de gène. Par cette approche, nous avons été en mesure de montrer comment transformer la proinsuline en forme mature et de libérer suffisamment d'insuline active pour prévenir une hyperglycémie. Notre thérapie a permis de protéger contre l'hyperglycémie et d'augmenter significativement les taux plasmatiques de proinsuline, d'insuline mature et de peptide C libre.

Néanmoins, l'objectif ultime d'une production régulée d'insuline sera très difficile à atteindre. Toutefois, une approche alternative pour le futur, pourrait consister à appliquer une thérapie génique permettant de favoriser la prolifération ou la régénération des cellules insulaires, et/ou de protéger ces cellules insulaires des lésions ou de l'apoptose. Certaines hormones incrélines, telles que le peptide 1 similaire du glucagon (GLP-1), sont adaptées pour ce projet, comme nous avons pu le constater dans nos dernières études (M. Kumar et coll. manuscrit transmis).

### La thérapie génique appliquée à la leptine dans des modèles d'obésité et de diabète

Le développement de la thérapie génique appliquée à la leptine pour contrôler l'obésité a suscité un intérêt considérable. Elle peut être réalisée avec des vecteurs viraux, mais également par transfert du gène de la leptine dans le muscle, en utilisant des méthodes renforcées par l'EP<sup>13</sup>. Sur les souris traitées par EP, des concentrations sériques élevées (jusqu'à 90 ng/ml) de leptine ont été enregistrées (soit une augmentation > à 200 fois par rapport aux souris témoins). En effet, le transfert par électrodes a provoqué une hyperleptinémie, une

**Tableau 2 : Application de la thérapie génique renforcée par l'électroporation (EP) a**

- Maladies auto-immunes (cytokines et récepteurs de cytokines/anti cytokines, vaccination ADN)
- Thérapie anticancéreuse ((intra-tumorale ou délivrance systémique de vecteurs codant pour des cytokines, des gènes suicide etc...))
- Traitement hormonal (GHRH, leptine, insuline, GLP-1, autres)
- Facteurs hématopoïétiques (érythropoïétine, GM-CSF, ligand FTL3, par exemple)
- Traitement anti hémophilie (Facteur VIII ou IX)
- Anticorps
- Vaccination ADN contre des agents anti-infectieux ou des antigènes cancéreux (fortement stimulée par l'électroporation)

Pour des revues détaillées, consulter les références 13 à 18 et 25 à 27.

diminution du nombre de prises de nourriture et une baisse du poids corporel. De plus, la production d'insuline a diminué chez les souris traitées, mais leur glycémie est restée normale.

### *La thérapie génique pour favoriser la cicatrisation des blessures*

L'une des principales applications de la thérapie génique basée sur l'EP pourrait résider dans le traitement de lésions cutanées qui surviennent dans de nombreuses situations cliniques et qui sont particulièrement difficiles à soigner chez les patients diabétiques. Le coût engendré par un traitement des blessures du pied ayant du mal à cicatriser, aux Etats Unis, a été estimé à plus d'1 milliard de dollars par an. Le transfert par électrodes, au niveau même de la blessure, d'ADN codant soit pour le facteur de croissance des kératinocytes, soit pour le TGF- $\beta$ <sup>30,31</sup>, a entraîné des effets bénéfiques sur les souris diabétiques. Il est, notamment, apparu que le TGF- $\beta$ , et l'EP agissent en synergie pour favoriser la cicatrisation. Puisque l'on a utilisé l'EP sur des patients, dans d'autres intentions, on pourrait probablement l'utiliser pour favoriser la cicatrisation des blessures et cela constituera, à n'en pas douter, un champ de recherche clinique pour le futur.

### *Les thérapies géniques utilisant d'autres plasmides codant pour des hormones*

Certains auteurs ont testé un plasmide exprimant le GHRH et exprimé dans un muscle squelettique, à la suite d'une injection intramusculaire renforcée par EP<sup>13,16,32,33</sup>. Le GHRH est libéré dans la circulation systémique et stimule, ectopiquement, la production et la libération d'hormones de croissance par l'hypophyse de l'animal. De jeunes porcs, à qui l'on a directement injecté un maximum de 0,1 mg d'un plasmide exprimant le GHRH, ont vu leur poids augmenter plus significativement que celui des porcs témoins, et ont connu une augmentation significative de leur masse corporelle maigre et une diminution de leur masse corporelle grasse. La portée des truies (250 à 400 kg) à qui l'on a injecté en i.m. et soumises à une électroporation, au 85<sup>ème</sup> jour de leur gestation, 1-5 mg d'un plasmide exprimant le GHRH, a optimisé ses caractéristiques de croissance, en augmentant son poids intra-utérin et en

améliorant les performances de la lactation maternelle<sup>13,32,33</sup>. Ainsi, les porcelets, nés des truies traitées, étaient plus gros à la naissance et au moment du sevrage, par rapport aux porcs témoins, et ont connu une morbidité et une mortalité significativement plus faibles. Une analyse portant sur > 300 animaux traités a révélé que l'expression était maintenue pendant au moins 1 an, et que les effets bénéfiques sur la portée persistaient au cours de trois grossesses consécutives chez les animaux traités, après une administration unique de plasmides.

Les résultats positifs obtenus avec le GHRH basé sur un plasmide, chez des animaux de ferme, prouvent qu'en combinant, de manière adéquate, l'élaboration du plasmide avec la méthode d'EP, on peut obtenir des niveaux physiologiques d'un produit transgénique, même sur un animal pesant 500 kg : ce qui permet d'espérer que cette utilisation et d'autres applications, pourront se transformer, bientôt, en applications chez l'homme.

### *Le transfert de gène non viral chez l'homme*

L'électroporation a été utilisée avec succès pour délivrer, par voie intra tumorale, certains médicaments de chimiothérapie, tels que la bléomycine<sup>13-17</sup>. Des essais cliniques portant sur une thérapie génique de tumeurs, renforcée par l'EP, sont en cours, mais peu de résultats ont été publiés. La plupart des études chez l'homme, de transfert de gène non viraux, ont été effectuées dans le domaine de la vaccination ADN, bien que l'on n'ait pas eu recours à l'EP. Ainsi, des réponses immunitaires peuvent être obtenues, en particulier, contre des antigènes du paludisme, par la vaccination i.m. ADN et de récentes études s'orientent vers des stratégies d'immunisation génétique séquentielle plasmide/virus (sensibilisation – renforcement) comme méthodes efficaces pour créer une immunité<sup>25</sup>. Le transfert d'ADN non viral chez l'homme dont le profil de sécurité est remarquable, est celui qui attire le plus l'attention.

### *Les perspectives d'avenir*

Le transfert de gène, utilisant l'EP, peut-être appliqué efficacement à la fois sur les petits et sur les grands animaux et ses applications potentielles sont nombreuses (Tableau 2). Cette approche a été utilisée avec succès dans les maladies auto-immunes ou inflammatoires au stade préclinique, pour délivrer soit des cytokines et des médicaments anti inflammatoires soit des molécules co-stimulantes, ayant subi des mutations. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de la délivrance intra tumorale de vecteurs thérapeutiques et, ce qui est très important, on a constaté que le fait de renforcer la vaccination ADN contre toute une série d'antigènes ayant trait aux infections, au cancer ou à l'immunité, s'est avéré très efficace. Toutefois, la délivrance systémique de médicaments de nature protéique (hormones, facteurs hématopoïétiques, anticorps, enzymes ou autres, par exemple) constitue l'une des applications les plus prometteuses.

L'utilisation des acides nucléiques non viraux en traitement expérimental se développe constamment. Toutefois, le nouveau développement le plus remarquable consiste en l'introduction d'agents thérapeutiques basés sur un petit ARN inhibiteur (siARN). En effet, les siARNs synthétiques, ou délivrés par le biais

d'un vecteur, constituant de nouveaux outils puissants pour rendre un gène silencieux et leurs applications thérapeutiques potentielles sont nombreuses. Il est toutefois difficile de cibler la délivrance *in vivo* de ces molécules à un tissu spécifique et les méthodes non virales, renforcées par l'EP, de transfert d'acide nucléique présentent des avantages en matière de simplicité, d'efficacité et de sécurité.

**Remerciements :** Nos études ont été financées par la Fondation Krembil (Toronto, Canada), la Fondation Internationale pour la Recherche sur le Diabète Juvenil, l'Association Canadienne sur le Diabète, l'Institut National Canadien du Cancer, les Instituts Canadiens de Recherche sur la Santé, la Fondation de l'Hôpital Saint Michael (Toronto, Canada) et le Réseau de Recherche sur le Cancer dans l'Ontario.

#### Références

- Rizzi M, Ferrera F, Filici G, Indiveri F. Disruption of immunological tolerance: role of AIRE gene in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2006;5:145-147.
- Villasenor J, Benoist C, Mathis D. AIRE and APECED: molecular insights into an autoimmune disease. *Immunol Rev* 2005;204:156-164.
- Prud'homme GJ. Altering immune tolerance therapeutically: the power of negative thinking. *J Leukoc Biol* 2004;75:586-599.
- Piccirillo CA, Shevach EM. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol* 2004;16:81-88.
- Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-352.
- Taams LS, Palmer DB, Akbar AN, Robinson DS, Brown Z, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology* 2006;118:1-9.
- Ziegler SF. FOXP3: Of Mice and Men. *Ann Rev Immunol* 2006;24:209-226.
- Veldman C, Nagel A, Hertl M. Type 1 regulatory T cells in autoimmunity and inflammatory diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 2006;140:174-183.
- Nieves DS, Phipps RP, Pollock SJ, et al. Dermatologic and immunologic findings in the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome. *Arch Dermatol* 2004;140:466-472.
- Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol* 2003;15:430-435.
- Zheng SG, Wang JH, Stohl W, Kim KS, Gray JD, Horwitz DA. TGF-beta requires CTLA-4 early after T cell activation to induce FoxP3 and generate adaptive CD4+CD25+ regulatory cells. *J Immunol* 2006;176:3321-3329.
- Wohlfert EA, Gorelik L, Mittler R, Flavell RA, Clark RB. Cutting edge: deficiency in the E3 ubiquitin ligase Cbl-b results in a multifunctional defect in T cell TGF-beta sensitivity in vitro and in vivo. *J Immunol* 2006;176:1316-1320.
- Prud'homme GJ, Glinka Y, Khan AS, Draghia-Akli R. Electroporation-enhanced nonviral gene transfer for the prevention or treatment of immunological, endocrine and neoplastic diseases. *Curr Gene Ther* 2006;6:243-273.
- Prud'homme GJ, Lawson BR, Chang Y, Theofilopoulos AN. Immunotherapeutic gene transfer into muscle. *Trends Immunol* 2001;22:149-155.
- Picirillo CA, Theofilopoulos AN, Prud'homme GJ. Immunogene therapy with nonviral vectors. In: Prud'homme GJ, ed. *Gene Therapy of Autoimmune Diseases*. New York: Landes Bioscience and Kluwer/Plenum Publishers; 2005:43-70.
- Khan AS, Pope MA, Draghia-Akli R. Highly efficient constant-current electroporation increases in vivo plasmid expression. *DNA Cell Biol* 2005;24:810-818.
- Andre F, Mir LM. DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther* 2004;11(Suppl 1):S33-42.
- Ratanamart J, Shaw JA. Plasmid-mediated muscle-targeted gene therapy for circulating therapeutic protein replacement: a tale of the tortoise and the hare? *Curr Gene Ther* 2006;6:93-110.
- Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Ann Rev Immunol* 2002;20:709-760.
- Klinman DM. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 2004;4:249-258.
- Prud'homme GJ, Chang Y. Prevention of autoimmune diabetes by intramuscular gene therapy with a nonviral vector encoding an interferon-gamma receptor/IgG1 fusion protein. *Gene Ther* 1999;6:771-777.
- Chang Y, Prud'homme GJ. Intramuscular administration of expression plasmids encoding interferon-gamma receptor/IgG1 or IL-4/ IgG1 chimeric proteins protects from autoimmunity. *J Gene Med* 1999;1:415-423.
- Prud'homme GJ. Prevention of autoimmune diabetes by DNA vaccination. *Expert Rev Vaccines* 2003;2:533-540.
- Prud'homme GJ, Glinka Y, Chang Y, Li X. DNA vaccination against autoimmune diseases. In: Prud'homme GJ, ed. *Gene Therapy of Autoimmune Diseases*. New York: Landes Bioscience and Kluwer/ Plenum Publisher, 2005:112-136.
- Prud'homme GJ. DNA vaccination against tumors. *J Gene Med* 2005;7:3-17.
- Stevenson FK, Ottensmeier CH, Johnson P, et al. DNA vaccines to attack cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(Suppl 2):14646-14652.
- van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk SL, Babiuk LA. Strategies for improved formulation and delivery of DNA vaccines to veterinary target species. *Immunol Rev* 2004;199:113-125.
- Anderson MS, Bluestone JA. The NOD mouse: a model of immune dysregulation. *Ann Rev Immunol* 2005;23:447-485.
- Croze F, Prud'homme GJ. Gene therapy of streptozotocin-induced diabetes by intramuscular delivery of modified preproinsulin genes. *J Gene Med* 2003;5:425-437.
- Marti G, Ferguson M, Wang J, et al. Electroporative transfection with KGF-1 DNA improves wound healing in a diabetic mouse model. *Gene Ther* 2004;11(24):1780-1785.
- Lee PY, Chesnoy S, Huang L. Electroporative delivery of TGF-beta1 gene works synergistically with electric therapy to enhance diabetic wound healing in db/db mice. *J Invest Dermatol* 2004;123(4):791-8.
- Khan AS, Brown PA, Draghia-Akli R. Plasmid-based growth hormone-releasing hormone supplementation and its applications. *Curr Opin Mol Ther* 2005;7:306-316.
- Draghia-Akli R, Fiorotto ML. A new plasmid-mediated approach to supplement somatotropin production in pigs. *J Anim Sci* 2004;82(E-Suppl):E264-269.

#### Réunions scientifiques à venir

18 au 21 juin 2006

#### 22<sup>e</sup> réunion annuelle de la European Society of Human Reproduction and Embryology

Prague, République tchèque

Renseignements : Courriel : karen.maris@eshre.com

24 au 27 juin 2006

#### Endocrine Society – ENDO 2006

Boston, Massachusetts

Renseignements : www.endo-society.org

18 au 21 octobre 2006

#### 10<sup>th</sup> Annual CDA/SCEM Professional Conference and Annual Meetings

Metro Toronto Convention Centre

Toronto, Ontario

Renseignements : www.diabetes.ca

Gérald Prud'homme déclare qu'il n'a aucune divulgation à faire en association avec le contenu de cette publication.

Les avis de changement d'adresse et les demandes d'abonnement *Endocrinologie – Conférences scientifiques* doivent être envoyés par la poste à l'adresse B.P. 310, Station H, Montréal (Québec) H3G 2K8 ou par fax au (514) 932-5114 ou par courrier électronique à l'adresse info@snellmedical.com. Veuillez vous référer au bulletin *Endocrinologie – Conférences scientifiques* dans votre correspondance. Les envois non distribuables doivent être envoyés à l'adresse ci-dessus. Poste-publications #40032303

La version française a été révisée par le Dr Gérald Prud'homme, Toronto.

Fourni à titre de service à la médecine grâce à une subvention à l'éducation de

sanofi-aventis