

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR
STRASBOURG-I

Année 2003

Thèse N°

THESE

Présentée en vue de l'obtention du

Doctorat en Sciences

Domaines : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Soutenue publiquement le 18 décembre 2003 par

Anne-Sophie ARNOLD

**Vers une thérapie génique des amyotrophies spinales progressives :
Expression de la protéine SMN dans des cellules musculaires malades.**

Membres du Jury :

M. Philippe POINDRON,	Professeur à l'Université Louis Pasteur	Co-Directeur
M. Jean-Pierre GIES,	Professeur à l'Université Louis Pasteur	Co-Directeur
M. Edouard HIRSCH,	Professeur à l'Université Louis Pasteur	Rapporteur Interne
M. Serge BRAUN,	Directeur de la Recherche à Transgene S.A.	Rapporteur Externe
M. Jean-Luc BUEB,	Professeur à l'Université de Luxembourg	Rapporteur Externe

A ma p'tite Mamounette, pour ton soutien de tous les instants et pour l'exemple que tu as si souvent été pour moi dans les moments plus difficiles. Pour ta fierté si peu objective à mon égard mais qui m'a si souvent permis de tenir le coup.

A Papa, un des seuls de la famille capable de réellement comprendre le contenu de ce mémoire. Tu m'as demandé un jour de faire mes preuves, j'espère y être arrivé aujourd'hui.

A Isabelle, la seule personne autorisée à m'appeler Pignouf sans que ce soit une insulte! Au mérite que tu as eu à toujours t'intéresser à mes travaux si lointains de ton domaine juridique! A notre complicité incorruptible, au réconfort que tu m'as toujours apporté.

A tous nos souvenirs d'hier et de demain.

A Vincent, à ton enthousiasme et tes encouragements si sincères, à tout ce que tu m'apportes chaque jour, rien n'aurait été possible sans ton soutien.

A Mamy et Dady, témoins d'une époque passée, à votre complicité et votre tendresse qui nous rassurent et nous attendrissent.

REMERCIEMENTS

A Monsieur Poindron, l'Homme de Sciences dans ce que ce mot a de plus universel. Petite fille, le terme de Professeur désignait pour moi une personne qui sait "tout sur tout" ou presque. Vous avez confirmé la véracité de ma définition! Malheureusement, cette définition est de moins en moins valable! Ce qui vous caractérise avant tout, c'est la confiance que vous accordez spontanément aux personnes que vous rencontrez et dont j'ai moi-même bénéficié. C'est aussi cette faculté que vous avez à transformer le résultat le plus désastreux en une avancée EXTRAORDINAIRE pour la science. A ce sujet, une de vos phrase favorite ("On est bon, qu'est-ce qu'on est bon!!!") en dit long sur votre optimisme si communicatif, qui nous pousse à aller toujours plus loin pour être digne de ces encouragements. Il est grand temps pour moi de vous dire MERCI pour m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, MERCI pour m'avoir transmis le flambeau d'un sujet si passionnant, MERCI pour m'avoir permis de découvrir ma voie (pas uniquement professionnelle), et surtout et enfin MERCI pour avoir pris de votre temps si précieux pour la correction de ce mémoire. Recevez ici le témoignage de ma profonde gratitude.

La rigueur, l'autonomie, l'opiniâtreté sont des vertus propres aux bons chercheurs. C'est grâce à toi, Jean-Pierre que je pense avoir acquis une partie de ces qualités, et je t'en remercie. MERCI surtout pour m'avoir poussée à écrire ces publications qui m'ont terriblement facilité la tâche pour la rédaction de ce mémoire, et qui me permettent de bien étoffer mon CV. Tu avais raison, c'est tellement mieux de faire ce genre de choses pendant la thèse et pas après, MERCI pour tes bons conseils. Ca n'a pas été de tout repos, mais on est quand même arrivé au bout de cette thèse!!! Permits-moi de te souhaiter bonne chance pour toutes tes futures entreprises et bon vent au nouveau projet du laboratoire.

Dès mon arrivée au laboratoire, j'ai entendu parler de tes travaux, Serge, et de tout ce que tu as apporté à ce sujet. Ta place était donc toute désignée au sein de ce jury, et

j'espère avoir été à la hauteur de l'héritage que tu as laissé. MERCI pour m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche privée chez Transgene et de côtoyer tes fidèles collaborateurs, à qui tu as su transmettre ta passion. Trouve ici l'expression de ma reconnaissance et de ma vive admiration.

A Messieurs les Professeurs Hirsch et Bueb qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail. Recevez l'expression de mon profond respect.

Je remercie également tous les membres du LPCCNM :

MERCI Rachel pour avoir été la première à me soutenir, MERCI pour tes encouragements professionnels et personnels si nombreux. MERCI enfin de m'avoir fait connaître MGBE!!!...

MERCI Gilliane pour tes conseils si précieux, et pour ta sensibilité.

MERCI Serge pour nous avoir fait partager toutes tes passions (tes enfants, le vélo, la plongée, la spéléo, la biologie cellulaire, l'enseignement, Mac..., la liste est longue) ce qui nous a permis de ne jamais nous ennuyer pendant les pauses-déjeuner. Je te souhaite bonne chance dans ton nouveau labo.

MERCI Yves pour avoir souvent détendu l'atmosphère avec tes blagues comprises uniquement par un petit cercle d'initiés chanceux. Surtout ne change pas, le labo ne serait plus le même.

MERCI Myriam. La colocation du bureau a été très agréable en ta compagnie et je garde un très bon souvenir de nos conversations si enrichissantes. Au bout du compte ni l'une ni l'autre n'a changé d'avis, mais sinon, ce ne serait pas drôle!

MERCI Valérie, pour ton dévouement et ta bonne humeur. Ton travail rend le nôtre possible, sois assurée de ma sincère reconnaissance.

Je vous souhaite bonne route Mor, Nada et Audrey, que les années qui viennent soient sources de bons moments et de bonheurs pour vous.

MERCI à vous, les nombreux stagiaires qui avez partagé un bout de chemin avec moi et qui avez laissé des boîtes dans les frigos : Antoine, Ayse, Mélanie,...

Un MERCI tout particulier pour vous, Séverine et Isabelle, qui m'avez permis de me sentir tout de suite à l'aise au sein du laboratoire. Vous m'avez donné envie de faire une thèse et en tant qu'amie, je ne vous souhaite que du bonheur auprès d'Emeline, Anthony et la petite Analena.

MERCI aussi et bien sûr à toi Constant pour les interminables conversations dans la salle blanche. Le courage dont tu as fait preuve dans les épreuves que tu as traversées me donne une leçon de vie et je suis très fière de te compter parmi mes amis. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites auprès de ta famille.

MERCI Stéphane Vasseur de la Banque de Tissus pour la recherche de l'AFM pour votre dévouement. Nos contacts n'ont toujours été que téléphoniques, mais je vous remercie pour avoir passé tant de temps à courir après les biopsies mises entre les mains de transporteurs pas assez conscients de l'importance et de la fragilité de ces petits colis si précieux! Si rien ne s'est jamais perdu, c'est uniquement grâce à vous.

MERCI à Jean-François, Nathalie & Co, tous les membres de l'équipe animalerie. Vos compétences ont souvent forcé mon admiration, tant sur le plan logistique qu'animalier. MERCI pour avoir su gérer toutes les situations ingérables!

MERCI à Madame le Docteur Laurence Kessler pour m'avoir permis d'utiliser sa salle de culture de la Faculté de Médecine pour quelques semaines au départ qui se sont transformées en plus d'1 an!

MERCI à toute l'équipe des institutrices de l'Ecole St Etienne de Strasbourg, particulièrement Geneviève Hebrard, pour m'avoir fait découvrir ce monde si fascinant de l'Ecole Primaire. Je garde d'excellents souvenirs des heures passées en compagnie des enfants.

MERCI aussi à vous, mes Docteurs préférés, Mena, Joelle et Lise pour avoir toujours été là pour me soutenir. Nous avons réussi à ne pas nous perdre de vue malgré la voie différente que j'ai dû prendre, et je vous en remercie. C'est tellement bien de se dire qu'on pourra se faire soigner par ses meilleures amies!

MERCI à Jérôme et Clo pour avoir organisé tous les breaks au ski pendant ces dernières années, et à bientôt dans les Rocheuses!

MERCI à Manu et Mag, nos amis parisiens, votre point de vue non scientifique et vos questions de non initiés m'ont permis de prendre du recul par rapport au sujet et de sortir un peu de son cadre microscopique!

MERCI à Nico et Mag, bon courage à tous les 2 pour la fin de vos thèses.

MERCI aussi à Ginie, ma confidente, souvent source de réconfort. J'espère avoir été à la hauteur dans les moments difficiles que tu as traversés.

Table des matières.

Table des abréviations.	1
Avant-propos.	4
1-Introduction.	5
11-Les amyotrophies spinales progressives.	6
111-Généralités.	6
1111-La maladie.	6
1112-Aspects cliniques.	6
(1) Type I.	7
(2) Type II.	7
(3) Type III.	8
(4) Type IV.	8
1113-Traitements actuels de l'amyotrophie spinale progressive.	8
112-Gènes responsables de l'amyotrophie spinale progressive.	9
1121-Le gène <i>SMN</i> .	10
(1) Localisation et séquence.	10
(2) Régulation transcriptionnelle.	13
(3) Mutations retrouvées dans le gène <i>SMN1</i> des patients SMA.	14
(4) Le gène <i>SMN</i> et les autres maladies.	15
1122-Le gène <i>NAIP</i> .	17
1123-Le gène <i>p44</i> .	18
1124-Le DNA mitochondrial.	18
113-La protéine SMN.	19
1131-Séquence et structure.	19
1132-Localisation.	20
(1) Localisation cellulaire.	20
(2) Localisation tissulaire.	21

1133-Rôle de la protéine SMN : le complexe SMN.	22
(1) La maturation des RNA pré-messagers : la réaction d'excision-épissage.	22
(2) Les protéines constitutives du complexe SMN.	25
(3) Les substrats du complexe SMN.	29
(4) En résumé.	30
1134-SMN et apoptose.	32
114-Modèles animaux des amyotrophies spinales progressives.	34
1141-Modèles ciblant le nerf.	35
1142-Modèles ciblant le muscle.	36
115-Essais de thérapie génique.	38
1151-Modification de l'épissage du gène <i>SMN</i> .	38
1152-Introduction de la forme normale du gène <i>SMN</i> .	40
1153-Administration de vecteurs de gènes exprimant des facteurs neurotrophes.	40
12-Le développement de la jonction neuromusculaire : aspect moléculaire.	41
121-Molécules impliquées dans le développement de la jonction neuromusculaire.	41
1211-Etablissement du contact entre le nerf et le muscle.	41
1212-L'agrine et sa cascade de réactions.	44
(1) L'agrine joue un rôle central dans la formation de la jonction neuromusculaire.	44
(2) Le récepteur de l'agrine.	45
(3) La rapsyne.	46
(4) La neuréguline.	48
(5) Autres molécules intermédiaires intervenant dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine induite par l'agrine.	48
1213-Voie d'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine non dépendante	

de l'agrine.	49
1214-Agrégation des récepteurs de l'acétylcholine en absence de motoneurones.	49
122-La maturation post-synaptique.	50
1221-Stabilisation des agrégats de récepteurs de l'acétylcholine.	50
1222-Maturation de la jonction neuromusculaire après la naissance.	51
123-Jonction neuromusculaire et amyotrophie spinale progressive.	52
13-Vecteurs non-viraux ou synthétiques de transfert de gène.	54
131-La thérapie génique.	54
132-Les vecteurs non-viraux de transfert de gènes.	56
1321-Les lipides cationiques.	56
(1) Dérivés aliphatiques.	59
(2) Dérivés du cholestérol.	59
(3) Lipoplexes chargés négativement couplés à l'albumine sérique humaine.	60
(4) La glycérophosphoéthanolamine couplée au fluor comme lipide auxiliaire.	61
(5) Transfections stables avec étape de sélection à la G418 et phase d'enrichissement par trieur de cellules.	61
1322-Les polymères cationiques ou polycations.	62
(1) Amélioration du polyéthylèneimine.	62
(2) Libération de gènes faisant appel à des polymères biodégradables.	63
(3) Les co-polymères protecteurs.	64
(4) Utilisation de signaux de ciblage nucléaire.	65
(5) Expression de gènes ciblant un type cellulaire déterminé.	66
(6) Le terplexe de DNA.	67
(7) Le LPD1.	68
1323-Les dérivés amphiphiles de l'acide lipoïque.	69

1324-Les agents lysosomotropiques.	70
1325-Les agents mitochondriotropiques.	71
133-Conclusion.	71
14-Données antérieures obtenues au laboratoire : l'hypothèse musculaire de l'amyotrophie spinale progressive.	72
141-Apport des cocultures nerf-muscle à la compréhension de la maladie.	72
1411-Comportement des cocultures.	72
1412-Causes de la dégénérescence.	73
1413-Etude de l'expression du mRNA de la protéine SMN.	74
1414-Etude de l'apoptose des cellules constitutives des cocultures.	74
142-Etude préliminaire sur les RACHs dans les cellules musculaires.	74
15-Objectifs de cette étude.	75
2-Matériels et méthodes.	76
21-Culture cellulaire.	77
211-Culture primaire de cellules musculaires satellites humaines	77
2111-Obtention des biopsies.	77
2112-Traitement de la biopsie et inclusion dans un coagulum.	77
2113-Explantation.	78
2114-Subculture de cellules musculaires.	78
2115-Congélation et décongélation.	79
2116-Marquage immunocytochimique de la desmine.	80
212-Cocultures nerf-muscle.	81
2121-Coculture classique : myotubes humains et explants de moelle épinière de Rat.	81

2122-Coculture myotubes humains/motoneurones de Rat purifiés.	82
22-Augmentation de l'expression de la protéine SMN dans des cellules musculaires satellites humaines de primo-explantation.	83
221-Construction du plasmide pEGFP-C3/SMN.	83
2211-Le plasmide pEGFP-C3.	83
2212-Isolement de l'insert.	85
2213-Déphosphorylation du vecteur.	87
2214-Ligation du cDNA du gène <i>SMN</i> avec pEGFP-C3.	87
2215-Orientation de l'insert dans le vecteur.	88
2216-Maxi-préparation du plasmide pEGFP-C3/SMN.	89
2217-Microscopie de fluorescence et confocale.	90
222-Choix de l'agent de transfection.	91
2221-Formation des complexes de transfection.	91
(1) FuGENE 6.	91
(2) Effectene.	92
(3) ExGen 500.	92
2222-Estimation de la taille des complexes formés.	95
(1) Diffusion quasi-élastique de la lumière.	95
(2) Microscopie électronique.	95
2223-Estimation de l'efficacité de transfection par FACS.	95
2224-Estimation de la cytotoxicité des complexes par la méthode au XTT.	96
2225-Effet du serum sur la transfection.	97
2226-Sélection des cellules transfectées au moyen du G418.	98
23-Effet de l'augmentation d'expression de SMN dans les cellules musculaires.	99
231-Observation de la dégénérescence des cocultures.	99
232-Etude de l'apoptose.	99

2321-Coloration des noyaux par le colorant de Hœchst 33.258.	99
2322-Marquage des fragments de DNA par la méthode du <i>TdT-mediated dUTP nick end labelling</i> .	100
(1) Principe.	100
(2) Protocole.	101
2323-Marquage par la méthode à l'annexine V.	101
(1) Principe.	101
(2) Mode opératoire (Guettier-Sigrist <i>et al.</i> , 2002).	102
24-Défauts fonctionnels des cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA et des myotubes formés par fusion de ces dernières.	103
241-Fusion des cellules musculaires satellites humaines.	103
242-Induction de l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine par l'agrine.	104
243-Liaison spécifique de l'α-bungarotoxine aux récepteurs de l'acétylcholine des myotubes humains.	104
3-Résultats et discussions.	106
31-Construction du plasmide pEGFP-C3/SMN.	107
311-Etapes de la construction du plasmide.	107
3111-Séquençage du cDNA du gène <i>SMN</i> .	107
3112-Orientation de l'insert dans le vecteur.	107
3113-Spectre d'absorption du plasmide.	108
312-Validation de la construction.	109
3121-Microscopie à fluorescence.	109
3122-Microscopie confocale.	110
313-Discussion.	112

32-Choix de l'agent de transfection.	113
321-Optimisation des conditions de transfection.	113
322-Taille des complexes formés.	115
323-Cytotoxicité des complexes pour les cellules musculaires satellites humaines.	118
324-Effet du sérum sur l'efficacité de transfection.	120
325-Discussion.	121
33-Effet de l'augmentation d'expression de la protéine SMN dans les cellules musculaires provenant de patients atteints d'amyotrophie spinale progressive de type I.	125
331-L'expression de SMN empêche-t-elle la dégénérescence des myotubes innervés ?	125
332-Apoptose.	126
3321-Cocultures de myotubes et de motoneurons purifiés de Rat.	126
3322-Cocultures de myotubes innervés par des explants de moelle épinière de Rat.	128
333-Discussion.	131
34-Défauts fonctionnels des cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA et des myotubes formés par fusion de ces dernières.	132
341-Indices de fusion.	132

342-Induction de l'agrégation des récepteurs nicotiques par l'agrine.	134
343-Quantification des récepteurs de l'acétylcholine exprimés par les myotubes humains.	135
344-Discussion.	137
4-Conclusion et perspectives.	140
5-Bibliographie.	145
6-Annexes	172

Table des abréviations.

α -Bgtx	: α -bungarotoxine.
AA	: acide aminé.
ACh	: acétylcholine.
AgT	: antigène tumoral.
ALS	: sclérose latérale amyotrophique [pour <i>amyotrophic lateral sclerosis</i>].
ARIA	: <i>ACh-receptor inducing activity</i> .
BDGF	: <i>brain-derived growth factor</i> .
b-FGF	: basic-fibroblast growth factor.
BGDA	: Bis-guanidium-diacétylène.
BIR	: <i>Baculovirus inhibitor of apoptosis repeat</i> .
BP	: boîte de Petri.
BSA	: albumine sérique de bœuf [pour <i>bovine serum albumine</i>].
CB	: <i>coiled body</i> .
CIAP	: <i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> .
CMV	: cytomegalovirus.
cpm	: coups par minute.
CT-1	: cardiotrophine 1.
DC-Chol	: 3b [N-(N',N'-diméthylaminoéthane) carbomoyl] cholestérol.
DMD	: Myopathie de Duchenne [pour <i>Duchenne muscular dystrophy</i>].
DMR	: diméthyl arginine.
DMSO	: diméthyl sulphoxyde.
DO	: densité optique.
DODAC	: chlorure de N,N-dioléyl-N,N-diméthylammonium.
DOGS	: dioctadécylamidoglycylspermine.
DOPE	: dioléylphosphatidyléthanolamine.
DOSPA	: 2,3-dioléyloxy-N-3-(sperminecarboxyamido)éthyl-N,N-diméthyl-1 propanammonium.
DOTAP	: 1,2-dioléol-3,triméthylammonium propane.
DOTMA	: chlorure de N-(2,3-dioléyloxypropyl)-N,N,N-triméthylammonium.
D/UGC	: <i>dystrophin/utrophin glycoprotein complex</i> .
EBNA	: <i>Epstein-Barr nuclear antigen 2</i> .
EGF	: <i>epidermal growth factor</i> .
EGFP	: <i>enhanced green fluorescent protein</i> .
ESE	: <i>exonic splicing enhancer</i> .
ESS	: <i>exonic splicing silencer</i> .
FACS	: <i>fluorescence activated cell sorter</i> .
FGF	: <i>fibroblast growth factor</i> .
F-PE	: glycérolphosphoéthanolamine partiellement couplé au fluor.
Gems	: <i>gemini of coiled bodies</i> .

GFP	: <i>green fluorescent protein</i> .
HBSS	: solution saline équilibrée de Hanks [pour] <i>Hanks balanced salt solution</i> .
HEDA	: hydroxyéthylènediacétylène.
hnRNA	: <i>heterogenous nuclear RNA</i> .
IAP	: <i>inhibitor of apoptosis</i> .
IGF	: <i>insulin-like growth factor</i> .
JNM	: jonction neuromusculaire.
kb	: kilobase.
K-Chol	: L-lysanamide-cholesterol.
kD	: kilodalton.
kpb	: kilopaire de base.
LB	: Luria-Bertani.
LDL	: <i>low density lipoprotein</i> .
LPS	: lipopolysaccharide.
MASC	: <i>muscle accessory specific component</i> .
MEM	: <i>minimal essential medium</i> .
MM	: masse moléculaire.
MSH	: <i>melanocyte stimulating hormone</i> .
MTT	: <i>myoblast transfer therapy</i> .
MuSK	: <i>muscle-specific receptor tyrosine kinase</i> .
NAIP	: <i>neuronal apoptosis inhibitory protein</i> .
NCAM	: <i>neural cell adhesion molecule</i> .
NGF	: <i>nerve growth factor</i> .
NLS	: <i>nuclear localization signal</i> .
NO	: monoxyde d'azote.
NSE	: <i>neuron specific enolase</i> .
O-Chol	: L-orthinamide-cholesterol.
PAGA	: acide poly [a-(4-aminobutyl)]-L-glycolique.
PBS	: <i>phosphate buffered saline</i> .
PCR	: <i>polymersase chain reaction</i> .
PEI	: polyéthylènimine.
PFA	: paraformaldéhyde.
PFN	: profiline.
PLL	: poly-L-lysine.
PMS	: phenazine méthosulfate.
Pol II	: RNA polymérase II.
pOrn	: poly-L-ornithine.
PROCOP	: <i>protective copolymer</i> .
PS	: phosphatidyl sérine.
PVP	: polyvinylpyrrolidone.
QUELS	: <i>quasi-elastic light scattering</i> .
RACH	: récepteur de l'acétylcholine.
SIP-1	: <i>SMN interacting protein 1</i> .
SMA	: amyotrophie spinale progressive [pour <i>spinal muscular atrophy</i>].

SMA I	: SMA de type I.
SMA II	: SMA de type II.
SMA III	: SMA de type III.
SMA IV	: SMA de type IV.
SMN	: <i>survival motor neuron</i> .
snRNA	: <i>small nuclear RNA</i> .
snRNP	: <i>small nuclear ribonucleoprotein</i> .
snoRNP	: <i>small ribonucleolar ribonucleoprotein</i> .
SVF	: Sérum foetal de veau.
TdT	: <i>Terminal desoxynucleotidyl transferase</i> .
TUNEL	: <i>TdT-mediated dUTP nick end labelling</i> .
XTT	: 2,3-bis (2-methoxy-4 nitro-5-sulfophenyl) 2H-tetrazolium-5-carboxyanilide.

Ne sont pas incluses dans ce tableau (a) **les abréviations internationales utilisées pour désigner les acides aminés** (nomenclature à 3 lettres ou à une lettre), ni (b) **les abréviations internationales des unités de mesure** (ml, mg, s, h, etc.) ni (c) **celles de certains composants de la substance vivante** (ATP, RNA, DNA, mRNA, etc.) pour lesquels on a gardé l'abréviation internationalement acceptée. Pour certaines substances (cytokines, facteurs de croissance, etc.), on a retenu l'abréviation anglaise internationalement utilisée (NGF, BDNF, M-CSF, etc.)

Les substantifs de forme latine, passés dans la langue courante, ne prennent pas le pluriel latinisé [exemple : un stimulus, des stimulus]. Ceux qui ne sont pas passés dans la langue courante le prennent [exemple : une fimbria, des fimbriae] et figurent alors en italiques. Les locutions anglaises figurent également en italiques.

La définition d'une abréviation est toujours placée entre []. Les abréviations sont considérées comme invariables [exemple : une DNF, des DNF]. Une abréviation n'est jamais utilisée ou définie dans le titre d'un chapitre, d'une section, d'un paragraphe, d'une Figure ou d'un Tableau. Quand une abréviation est utilisée pour la première fois dans un tableau, sa définition est donnée dans les notes figurant en bas du Tableau. Les mots Figure et Tableau prennent toujours une majuscule.

Avant-propos.

Les amyotrophies spinales progressives sont les maladies génétiques les plus graves du nouveau-né et du jeune enfant puisqu'elles constituent l'une des causes de mortalité infantile la plus fréquente. Elles sont dues à la mutation d'un gène exprimé de manière ubiquiste, appelé *SMN*. On ne dispose à l'heure actuelle que de traitements palliatifs pour traiter ces enfants. La thérapie génique pourrait être une solution alternative aux traitements symptomatiques si décevants. Considérée pendant longtemps comme une maladie purement motoneuronale, cette maladie s'est vue revisitée il y a quelques années ; l'idée que le muscle pouvait être impliqué dans sa pathogénie s'est fait jour, notamment en raison des travaux de notre laboratoire. Cette hypothèse a été confortée par de nombreuses observations que nous exposerons dans le CHAPITRE 1 de ce mémoire.

La première SECTION du CHAPITRE 1 est consacrée aux amyotrophies spinales progressives. Elle est suivie d'une étude de l'installation de la jonction neuromusculaire et notamment d'un examen critique des fonctions de molécules récemment identifiées et qui interviennent dans ce phénomène. Enfin, on présente dans la troisième SECTION les dernières avancées en matière de thérapie génique non-virale.

Les expériences dont les résultats sont exposés dans le CHAPITRE 3 ont eu d'abord pour but de déterminer l'effet de l'introduction dans des cellules musculaires provenant de sujets atteints d'amyotrophies spinales progressives d'un plasmide codant la protéine *SMN*. Elles montrent aussi que, dans ces cellules, la jonction neuromusculaire ne se forme probablement pas convenablement. Ce CHAPITRE est divisé en 4 SECTIONS. Dans la première, est exposée la construction du plasmide pEGFP-C3/*SMN* portant le gène d'intérêt cloné dans un système d'expression eucaryote. Dans la deuxième, on compare l'efficacité de transfection de différents vecteurs synthétiques afin de choisir le plus approprié aux buts de ce travail. Dans la troisième, nous étudions l'effet de la transfection des cellules musculaires de malades par le plasmide pEGFP-C3/*SMN*. Enfin, dans la dernière, nous étudions l'une des étapes les plus précoces de l'installation de la jonction neuromusculaire, l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine, et nous montrons que, dans le cas des cellules musculaires provenant de malades, ce phénomène se déroule anormalement.

1-INTRODUCTION.

11-Les amyotrophies spinales progressives.

111-Généralités.

1111-La maladie.

Les amyotrophies spinales progressives ou *spinal muscular atrophies* [SMA] constituent un groupe de maladies neuromusculaires à transmission autosomique récessive. Elles sont caractérisées par une dégénérescence des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière entraînant une atrophie musculaire et conduisant finalement à la paralysie. La plupart des patients souffrant de SMA présentent des signes cliniques de la maladie dès l'enfance. Quelques formes de la maladie se transmettent selon le mode autosomique dominant ou sont liées au chromosome X. Nous ne les aborderons pas dans cette étude que nous limiterons aux SMA plus classiques, liées à la mutation du gène *SMN*.

La SMA est la maladie génétique responsable du plus grand nombre de mort des très jeunes et jeunes enfants. On la retrouve dans toutes les régions du monde et son incidence est de 1 pour 10.000 naissances (Pearn, 1978). Toutes les études épidémiologiques ont mis en évidence une inexplicable prépondérance de la maladie chez les hommes.

Les enfants atteints de SMA semblent plus brillants et plus sociables que la moyenne ; ils présentent des QI élevés, en particulier quand ils sont atteints de la forme la plus grave. Ils manifestent un vif intérêt pour ce qui les entoure, et ils possèdent une acuité intellectuelle exacerbée.

1112-Aspects cliniques.

Les patients atteints de SMA présentent une importante faiblesse musculaire, consécutive à une dénervation que l'on peut mettre en évidence par des explorations électrophysiologiques et par l'étude anatomopathologique de biopsies musculaires. Il existe une forte corrélation entre l'âge d'apparition des symptômes et la sévérité de la faiblesse, de sorte que plus la maladie commence précocement et moins le pronostic vital est favorable. C'est selon ce critère que les SMA sont traditionnellement classées en 4 types (Pearn, 1980).

(1) Type I.

La SMA de type I [SMA I] ou maladie de Werdnig-Hoffmann est la forme la plus sévère de la maladie. Les signes cliniques en sont visibles dès la naissance et même avant. Dans ce cas, on observe une diminution des mouvements fœtaux intra-utérins. Les nouveau-nés atteints de cette forme présentent souvent une sévère faiblesse qui exige la mise en œuvre d'une assistance respiratoire dès la naissance. Progressivement, l'atrophie et la paralysie gagnent les muscles distaux. L'atteinte bulbaire et respiratoire n'est un signe important que chez les enfants atteints de SMA I. La faiblesse des membres s'accompagne toujours d'une hypotonie à laquelle elle est proportionnelle. Ces enfants sont tellement faibles qu'ils ne peuvent pas tenir leur tête et ne peuvent s'asseoir seuls. Les muscles intercostaux ainsi que les muscles respiratoires accessoires sont très atteints, mais le diaphragme est relativement épargné. L'insuffisance respiratoire, les difficultés à avaler, l'accumulation de sécrétions accompagnent souvent les SMA I, mais on les observe moins fréquemment dans les formes moins sévères. L'atteinte constante des muscles respiratoires est responsable de la mort prématurée des petits malades. Environ 80 % des enfants atteints de SMA I meurent au cours de la première année, et il est exceptionnel qu'ils vivent plus de 2 ans. Cependant, les progrès de l'assistance respiratoire ont permis à certains petits patients de survivre plus longtemps (Bach *et al.*, 2003).

(2) Type II.

Les enfants souffrant de SMA de type II [SMA II] ou forme intermédiaire peuvent s'asseoir mais ne marchent jamais. Les signes cliniques observés chez les enfants atteints de cette forme se manifestent en général entre 3 et 15 mois ; ces enfants ont une espérance de vie de plus de 4 ans et ils peuvent même atteindre l'adolescence. Ils présentent une faiblesse diffuse et symétrique des muscles distaux prédominant aux muscles proximaux, et plus importante dans les jambes que dans les bras. L'intensité et la nature de ces signes varient d'un enfant à l'autre. Une analyse neuropathologique des SMA II suggère que le stress oxydatif et à un moindre degré, la mort cellulaire par apoptose seraient impliqués dans la neurodégénérescence observée chez les patients atteints de SMA II (Araki *et al.*, 2003).

(3) Type III.

L'amyotrophie spinale infantile de type III [SMA III] ou maladie de Kugelberg-Welander, encore appelée forme juvénile, débute entre 2 et 17 ans. Les patients atteints de cette forme peuvent marcher. Là aussi, comme pour la SMA II, la survie des patients atteints de SMA III dépend de la qualité des soins qui leur sont donnés.

(4) Type IV.

Chez certains patients, les signes cliniques apparaissent tardivement et sont de moindre intensité. Jadis, on n'incluait pas ces formes tardives dans le cadre des SMA et l'on considérait qu'il s'agissait d'une autre maladie des motoneurones. Cependant, il a été prouvé que ces adultes présentent des délétions homozygotes du gène *SMN*, et ce fait a amené les cliniciens à adjoindre un quatrième type à la classification des SMA [SMA IV], appelé forme adulte.

1113-Traitements actuels de l'amyotrophie spinale progressive.

Actuellement, les patients SMA ne bénéficient d'aucun autre traitement que palliatif. Il s'agit de prévenir et de gérer les effets secondaires consécutifs à la perte progressive des unités motrices. Dans le cas des patients atteints de SMA I, la prévention et la gestion des infections respiratoires sont les problèmes majeurs qui se posent aux cliniciens. Il convient d'administrer les antibiotiques appropriés dès les premiers signes de l'infection et de prendre toutes les mesures utiles pour désencombrer convenablement les voies pulmonaires et remédier à l'insuffisance pulmonaire. Celle-ci engendre une très grande fatigue et peut aller jusqu'à la défaillance respiratoire, principale cause de mortalité chez ces patients. Le cas des patients atteints de SMA II et III est différent car ces formes de SMA ont un meilleur pronostic. On peut retarder l'apparition du déficit respiratoire par la pratique régulière de l'exercice des muscles de la respiration. Cet entraînement est très bénéfique ; il stabilise notamment la capacité vitale inspiratoire. Il s'agit là d'un paramètre très important puisqu'il conditionne le recours éventuel à la ventilation mécanique (Koessler *et al.*, 2001). Un programme physique intensif et régulier des autres muscles est également pratiqué chez ces patients, dans le but de maintenir la mobilité des articulations ainsi qu'une certaine force musculaire.

Un essai pilote a été réalisé sur des patients de type SMA II et III auxquels on a administré de l'albutérol dans le but d'agir sur leur fonction respiratoire. Ce vasodilatateur β_2 -adrénergique semble avoir amélioré ou maintenu cette dernière, sans avoir d'effets secondaires, mais ces résultats doivent être confirmés par une étude incluant un nombre plus important de patients (Kinali *et al.*, 2002).

112-Gènes responsables de l'amyotrophie spinale progressive.

En 1990, des expériences de clonage positionnel du gène impliqué dans les SMA ont permis d'identifier une région chromosomique associée aux 3 formes connues de cette maladie ; cette région est située sur le bras long du chromosome 5, dans la région q11.2-13.3 (Brzustowicz *et al.*, 1990 ; Gilliam *et al.*, 1990 ; Melki *et al.*, 1990 a ; 1990 b). Des analyses plus fines ont contribué à rétrécir la taille de la région incriminée ; ces travaux ont permis de poser les premiers diagnostics prénataux en utilisant des marqueurs polymorphiques liés au locus SMA (Daniels *et al.*, 1992 ; Melki *et al.*, 1992). Le locus SMA est situé dans une région génomique très complexe qui contient des séquences de multicopies répétitives, des pseudogènes et des séquences analogues à des transposons. Ces observations suggèrent qu'il s'agit là d'une région très instable (Francis *et al.*, 1993 ; Kleyn *et al.*, 1993 ; Melki *et al.*, 1994). Une caractérisation plus poussée a mis en évidence une région chromosomique particulière constituée d'une duplication inversée d'environ 500 kilobases [kpb] dont chaque élément contient 4 gènes : le gène *SMN* [pour *survival of motor neuron* (Lefebvre *et al.*, 1995)], le gène codant la protéine NAIP [pour *neuronal apoptosis inhibitory protein* (Roy *et al.*, 1995)], le gène codant la protéine p44, laquelle est une sous-unité du facteur de transcription TFIIF, et enfin le gène *HAF5* dont la fonction est inconnue (Burglen *et al.*, 1997 ; Scharf *et al.*, 1998). Chacun de ces gènes contient une copie télomérique et une copie centromérique. Les régions codantes de ces gènes sont hautement conservées ce qui suggère que la duplication est un événement récent de l'évolution (Lefebvre *et al.*, 1995 ; Carter *et al.*, 1997 ; Scharf *et al.*, 1998 ; Rochette *et al.*, 2001).

1121-Le gène *SMN*.

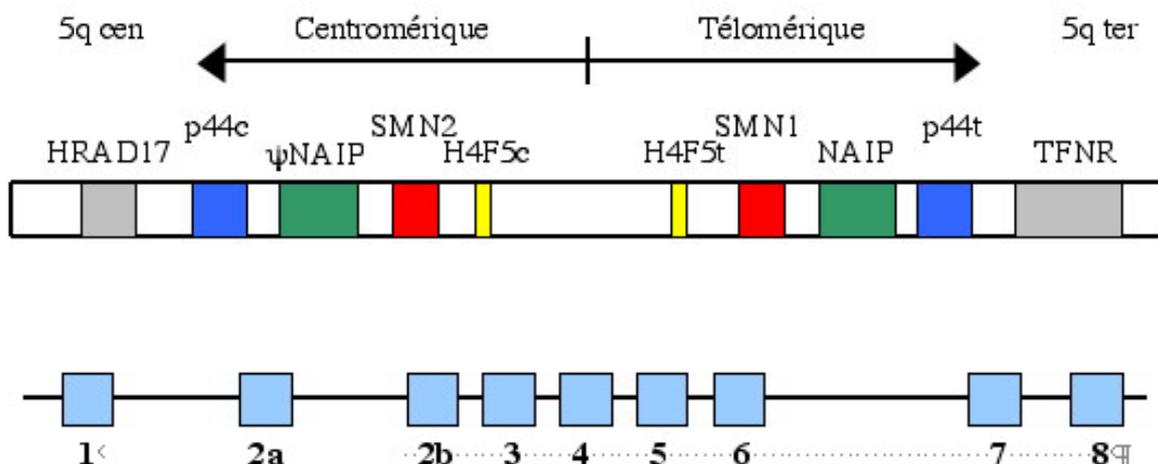
(1) Localisation et séquence.

Les plus petites délétions caractérisées chez les patients SMA ont permis d'identifier le gène *SMN* comme le gène dont la mutation entraîne la SMA. Il se compose de 27 kbp réparties en 9 exons qui sont exprimés en un transcrit d'1,7 kilobases [kb] (Burglen *et al.*, 1996 b ; Chen *et al.*, 1998) . Le codon stop est situé après l'exon 7, et l'exon 8 est non codant (Figure 1.1).

La copie télomérique du gène *SMN* appelée *SMN1* ou *SMNt* est absente de façon homozygote chez 98 % des patients SMA, et elle présente des mutations faux-sens, non-sens ou encore des décalages du cadre de lecture chez les patients restants (Lefebvre *et al.*, 1995). Le gène *SMN1* est dupliqué en une copie centromérique homologue à 99 % appelée *SMN2* ou *SMNc* (Monani *et al.*, 1999 a). Les 2 gènes sont transcrits. Le gène *SMN2* est présent chez tous les patients alors qu'il est absent chez 5 % des individus témoins, sans aucune conséquence clinique, ce qui indique qu'il n'est pas indispensable à la survie des motoneurones. C'est à partir de ces observations que le gène *SMN1* et non le gène *SMN2* a été reconnu comme le gène qui détermine la maladie (Lefebvre *et al.*, 1995).

FIGURE 1.1.

Structure du locus q11.2-13.3 du bras long du chromosome 5 et du gène *SMN*. (D'après Lefebvre *et al.*, 1995).



Le gène *SMN1* se distingue de *SMN2* uniquement par la mutation de 5 nucléotides (1 dans l'intron 6, 1 dans la partie non-codante de l'exon 7, 2 dans l'intron 7 et 1 dans l'intron 8). Ces mutations sont dites silencieuses, car elles n'ont aucun effet sur la séquence en acides aminés [AA] correspondante. Les DNA complémentaires issus des 2 gènes sont identiques (Figure 1.2) sauf à hauteur de 2 nucléotides situés dans les exons 7 et 8. Une simple transition non polymorphique située dans l'exon 7 en position +6 est responsable de l'épissage alternatif de *SMN2*. Quand le nucléotide est une Cytosine comme dans *SMN1*, l'exon 7 est reconnu et inclus dans la protéine. Si la position 6 de l'exon 7 est une Thymine, comme dans *SMN2*, la majorité des transcrits excluent l'exon 7.

FIGURE 1.2.

Séquence du DNA complémentaire du gène *SMN*. (N° d'accès ncbi #U18423).

```

cgg ggc ccc acg ctg cgc atc cgc ggg ttt gct atg gcg atg agc agc 48
ggc ggc agt ggt ggc ggc gtc ccg gag cag gag gat tcc gtg ctg ttc 96
cgg cgc ggc aca ggc cag♦agc gat gat tct gac att tgg gat gat aca 144
gca ctg ata aaa gca tat gat aaa gct gtg gct tca ttt aag cat gct 192
cta aag aat ggt gac att tgt gaa act tcg ggt aaa cca aaa acc aca 240
cct aaa aga aaa cct gct aag aag aat aaa agc caa aag aag aat act 288
gca gct tcc tta caa cag♦tgg aaa gtt ggg gac aaa tgt tct gcc att 336
tgg tca gaa gac ggt tgc att tac cca gct acc att gct tca att gat 384
ttt aag aga gaa acc tgt gtt gtg gtt tac act gga tat gga aat aga 432
gag gag caa aat ctg tcc gat cta ctt tcc cca atc tgt gaa gta gct 480
aat aat ata gaa cag aat gct caa gag♦aat gaa aat gaa agc caa gtt 528
tca aca gat gaa agt gag aac tcc agg tct cct gga aat aaa tca gat 576
aac atc aag ccc aaa tct gct cca tgg aac tct ttt ctc cct cca cca 624
ccc ccc atg cca ggg cca aga ctg gga cca gga aag♦cca ggt cta aaa 672
ttc aat ggc cca cca ccg cca ccg cca cca cca cca ccc cac tta cta 720
tca tgc tgg ctg cct cca ttt cct tct gga cca cca♦ata att ccc cca 768
cca cct ccc ata tgt cca gat tct ctt gat gat gct gat gct ttg gga 816
agt atg tta att tca tgg tac atg agt ggc tat cat act ggc tat tat 864
atg♦ggg ttc aga caa aat caa aaa gaa gga agg tgc tca cat tcc tta 912
aat taa gga♦gaa atg ctg gca tag agc agc act aaa tga cac cac taa 960
aga aac gat cag aca gat ctg gaa tgt gaa gcg tta tag aag ata act 1008
ggc ctc att tct tca aaa tat caa gtg ttg gga aag aaa aaa♦gga agt 1056
gga atg ggt aac tct tct tga tta aaa gtt atg taa taa cca aat gca 1104
atg tga aat att tta ctg gac tct ttt gaa aaa cca tct gta aaa gac 1152
tgg ggt ggg ggt ggg agg cca gca cgg tgg tga ggc agt tga gaa aat 1200
ttg aat gtg gat tag att ttg aat gat att gga taa tta ttg gta att 1248
tta tgg cct gtg aga agg gtg ttg tag ttt ata aaa gac tgt ctt aat 1296
ttg cat act taa gca ttt agg aat gaa gtg tta gag tgt ctt aaa atg 1344
ttt caa atg gtt taa caa aat gta tgt gag gcg tat gtg gca aaa tgt 1392
tac aga atc taa ctg gtg gac atg gct gtt cat tgt act gtt ttt ttc 1440
tat ctt cta tat gtt taa aag tat ata ata aaa ata ttt aat ttt ttt 1488
tta 1491

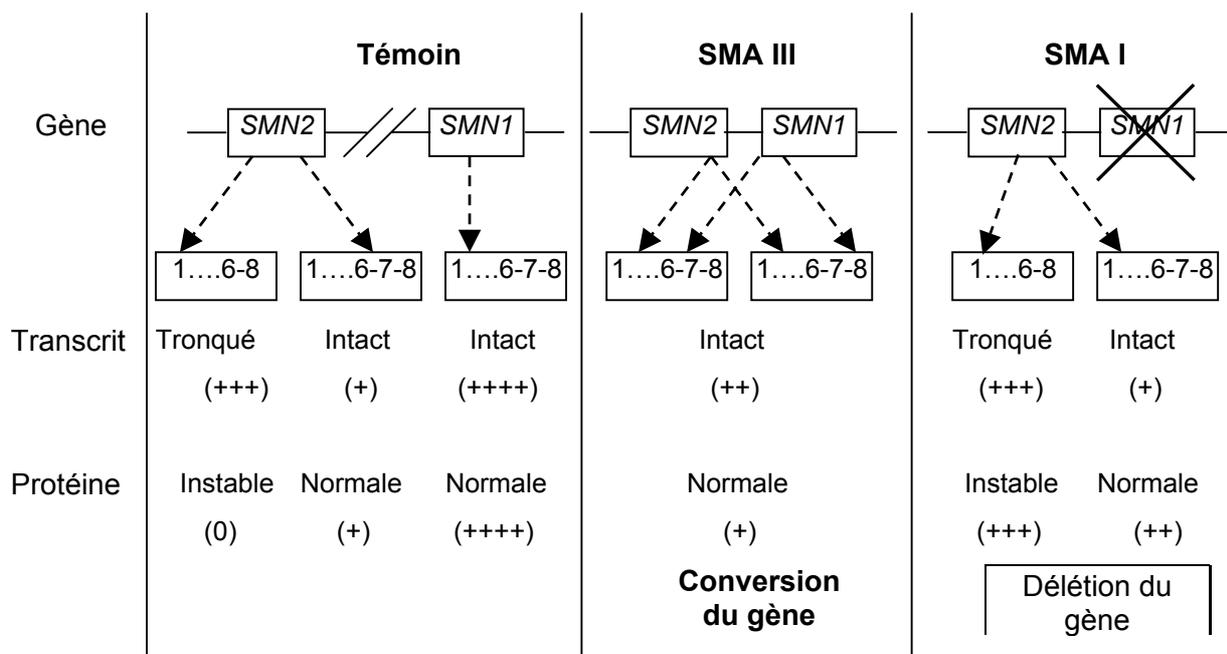
```

Le symbole ♦ délimite les exons.

Deux hypothèses sont énoncées pour expliquer cette différence de comportement : ou bien cette transition interrompt un élément activateur de l'épissage de l'exon (*exonic splicing*

enhancer [ESE]) appelé SE2, ce qui conduit à l'épissage alternatif de cet exon par empêchement de la reconnaissance du site d'épissage en 3' ; cet événement est spécifique du transcrit de *SMN2* (Lefebvre *et al.*, 1995 ; Lorson *et al.*, 1999 ; Lorson et Androphy, 2000), ou bien la transition de l'exon 7 crée un élément inhibiteur de l'épissage (*exonic splicing silencer* [ESS]) dans *SMN2* (Kashima et Manley, 2003). Cette dernière hypothèse n'a jamais été confirmée contrairement à la première qui est reconnue par plusieurs équipes. Le résultat prédit par ces 2 théories est cependant identique : les transcrits complets sont presque exclusivement produits par *SMN1* alors que la forme prédominante codée par *SMN2* (60 %) est dépourvue de l'exon 7 (Lefebvre *et al.*, 1995 ; Gennarelli *et al.*, 1995).

FIGURE 1.3.
Bases génétiques de l'amyotrophie spinale progressive. (D'après Nicole *et al.*, 2002).



Le transcrit tronqué, sans exon 7, code une protéine raccourcie de 16 résidus du côté carboxyterminal. Cette protéine est appelée SMN Δ 7 ; elle est fonctionnellement déficiente et instable, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Pellizzoni *et al.*, 1999). Cette propriété explique pourquoi l'expression de la protéine issue du gène *SMN2* est incapable de compenser le défaut d'expression du gène *SMN1* chez les patients SMA (Lorson et Androphy, 2000). Ainsi, l'apparition du phénotype SMA résulte probablement de 2 événements : (a) une mutation du gène *SMN1* et (b) une déficience constitutive du gène *SMN2* qui conduit à la production d'une

quantité insuffisante de la forme intacte de la protéine SMN, la forme tronquée SMN Δ 7 issue de ce gène étant produite de façon prédominante (Figure 1.3). Il existe donc une étroite corrélation inverse entre la sévérité clinique de la maladie et la quantité de protéine intacte codée par *SMN2* (Coovert *et al.*, 1997 ; Lefebvre *et al.*, 1997).

Il a été montré que les parents de patients atteints de SMA II et III possèdent plus de copies du gène *SMN2* que les parents de patients SMA I, et il est possible de faire exactement la même observation chez les patients (Velasco *et al.*, 1996 ; Campbell *et al.*, 1997). La présence d'au moins 2 copies du gène *SMN2* est requise pour que les patients atteints de SMA I survivent quelques mois. Les patients atteints de SMA II disposent de 3 copies du gène *SMN2* alors que les patients SMA III en expriment un nombre supérieur à 3 (Vitali *et al.*, 1999). La présence d'une seule copie semble être très rare ; elle est associée à un phénotype très sévère de SMA, au pronostic très sombre (Brahe, 2000).

Grâce à une technique quantitative de réaction en chaîne de la polymérase (*polymerase chain reaction* [PCR]) qui fait appel à la fluorescence, il a été montré que les copies du gène *SMN2* ne sont pas fonctionnellement équivalentes d'un malade à l'autre, et que d'autres facteurs génétiques pourraient intervenir pour moduler la sévérité de la maladie (Harada *et al.*, 2002). D'autre part, une épreuve rapide fondée sur la PCR en temps réel a été mise au point afin de déterminer facilement et rapidement le nombre de copies des gènes *SMN1* et *SMN2* chez les patients (Feldkotter *et al.*, 2002).

L'effet bénéfique des gènes *SMN2* supplémentaires permet d'augmenter la production de protéine SMN intacte. Par conséquent, une des approches thérapeutiques de la SMA pourrait consister à modifier l'expression ou l'épissage du gène *SMN2*.

(2) Régulation transcriptionnelle.

Des recherches plus poussées ont été entreprises pour savoir si les différences observées entre les produits des gènes *SMN1* et *SMN2* pouvaient être attribuées à une différence d'activité du promoteur ou plutôt à l'épissage alternatif de l'exon 7 spécifique de *SMN2*. L'analyse des promoteurs des gènes *SMN1* et *SMN2* a montré que ces éléments sont quasiment identiques tant dans leur séquence que dans leur activité (Echaniz-Laguna *et al.*, 1999 ; Monani *et al.*, 1999 b). Il existe un élément actif en *cis* dans la région régulatrice du promoteur. Cette région est impliquée dans le contrôle de la transcription au cours de la différenciation cellulaire et sans doute aussi au cours du développement (Germain-Desprez *et al.*, 2001). Le site utilisé pour déclencher la transcription varie en fonction de l'origine fœtale

ou adulte du tissu. Cependant, pour des tissus parvenus au même stade de développement, le même site d'initiation est utilisé. La protéine SMN exprimée pendant le développement fœtal est codée en grande partie par le gène *SMN1* qui engendre un RNA plus long. Un tel état de fait explique pourquoi la SMA se manifeste si précocement chez les patients les plus sévèrement affectés. Il a également été montré que les facteurs de transcription capables de se lier au promoteur de *SMN* varient en nombre et en nature selon les types cellulaires considérés. En effet, la régulation transcriptionnelle à laquelle sont soumis les promoteurs des gènes *SMN* est telle que leur activité diminue au fur et à mesure de la différenciation cellulaire. Un autre élément actif en *cis*, appelé élément 1 et localisé dans l'intron 6, semble responsable de l'épissage de l'exon 7 de *SMN*. Quand cet élément 1 est muté, on observe une augmentation de l'inclusion de l'exon 7 (Miyajima *et al.*, 2002).

Le déchiffrement des mécanismes fondamentaux régulant la transcription de *SMN* pourrait conduire à la découverte de traitements susceptibles d'augmenter l'expression du gène *SMN2*, et de diminuer par conséquent la sévérité du phénotype SMA.

(3) Mutations retrouvées dans le gène *SMN1* des patients atteints d'amyotrophie spinale progressive.

Le nombre d'unités répétitives situées dans le *locus* SMA varie de 0 à 4 par chromosome. Cette région est donc d'une très grande instabilité et elle est propice à l'apparition de délétions et de mutations. L'importante fréquence de néo-mutations *de novo* — on en retrouve chez 2 % des patients atteints de SMA — est due essentiellement à des *crossing-over* inégaux survenant entre unités répétitives au cours des méïoses paternelles. Il en résulte des délétions de taille variable. L'absence du gène *SMN1* à l'état homozygote est plus fréquemment observée chez les patients atteints de SMA I et II (96 % et 94 % respectivement) que chez les patients atteints de SMA III (86 %). Alors que la majorité des patients SMA I sont porteurs de réelles délétions de *SMN1*, la majorité des patients de type SMA II et III présentent une absence du gène *SMN1* à l'état homozygote en raison de la conversion de *SMN1* en *SMN2*. Il y a donc augmentation du nombre de copies du gène *SMN2* (Figure 1.3) (Wirth *et al.*, 1997 ; 1999). Cette conversion porte soit sur le gène entier, soit sur une partie de celui-ci. Dans ce dernier cas, des gènes *SMN* hybrides possèdent en général l'exon 7 du gène *SMN2* et l'exon 8 du gène *SMN1*. Une étude extensive du nombre de copies de *SMN1* et *SMN2* exprimé par la population générale et par les patients atteints de SMA prouve (a) qu'il peut y avoir conversion de *SMN2* en *SMN1* et (b) que, dans la population

générale, un haut nombre de copies de *SMN1* est associé à un faible nombre de copies de *SMN2* (Ogino *et al.*, 2003).

A l'heure actuelle, on a déjà identifié 27 mutations, parmi lesquelles des mutation non-sens et faux-sens, des décalages du cadre de lecture, des délétions, des inversions et des mutations dans un site d'épissage (Tableau 1.1). La plupart des mutations faux-sens sont localisées dans une région très conservée des exons 6 et 7 et il est montré que ces mutations réduisent la capacité d'oligomérisation de la protéine SMN (Talbot *et al.*, 1997 ; Hahnen *et al.*, 1997 ; Wirth *et al.*, 1999 ; Lorson *et al.*, 1998).

Si on la compare à d'autres maladies génétiques dans lesquelles le gène est complètement absent, la SMA présente l'avantage d'ouvrir des perspectives thérapeutiques simples et certainement efficaces consistant à réguler la transcription du gène *SMN* afin de promouvoir l'apparition de la forme intacte de la protéine exprimée par *SMN2*.

(4) Le gène *SMN* et les autres maladies.

Les relations entre les mutations de *SMN* et leur éventuelle incidence sur la sclérose latérale amyotrophique [ALS pour *amyotrophic lateral sclerosis*] sont à ce jour controversées et ont fait l'objet de nombreux échanges bibliographiques entre les équipes d'avis opposés (Crawford et Skolasky, 2002). Pour certains auteurs, il existe un lien entre les délétions centromériques du gène *SMN* et les formes sporadiques adultes des maladies des motoneurons (Moulard *et al.*, 1998). Plus récemment, il est montré que le nombre anormal de copies du gène *SMN1* est un facteur de susceptibilité pour l'ALS (Corcia *et al.*, 2002 a ; 2002 b ; Echaniz-Laguna *et al.*, 2002). Il semble bien, en effet, que les délétions homozygotes de *SMN2* soit un facteur de risque pour l'ALS (Veldink *et al.*, 2001). A l'opposé, d'autres auteurs ne détectent aucune prédisposition à l'ALS chez des patients présentant des délétions de *SMN* (Parboosingh *et al.*, 1999). Il est bien difficile de répondre à cette question en raison de la variabilité naturelle du nombre de copies du gène *SMN1* et plus encore de *SMN2*. Les travaux que nous venons d'évoquer reposent sur des études réalisées sur des échantillons restreints de population ce qui en diminue la significativité.

TABLEAU 1.1.

Principales mutations du gène *SMN1* décrites chez les patients atteints d'amyotrophie spinale progressive. (D'après Wirth, 2000).

Type de mutation	Exon (E) Intron (I)	Mutation de <i>SMN1</i>	Type de SMA	Références
Délétions	E8 I4-I6	Exon 8 Exons 5 et 6	II, III I	Gambardella <i>et al.</i> , 1998 Wirth <i>et al.</i> 1999
Mutation non-sens	E1 E3	Q15X W102X	I, III III	Wirth <i>et al.</i> 1999 Sossi <i>et al.</i> , 2001
Décalage du cadre de lecture	E1 E2a E2b E3 E3 E3 E4 E4 E4 E6 I6	27insG 124insT 241-242in4 425del5 430del4 472del5 542delGT 591delA 618insT 773insC 813ins/dup11 c.867+2T→G	II I III III I-III I I-III II I III I, II I	Skordis <i>et al.</i> , 2001 Wirth <i>et al.</i> 1999 Wirth <i>et al.</i> 1999 Sossi <i>et al.</i> 2001 Bussaglia <i>et al.</i> , 1995 Brahe <i>et al.</i> , 1996 Parsons <i>et al.</i> , 1998a Parsons <i>et al.</i> , 1998b Wirth <i>et al.</i> 1999 Clermont <i>et al.</i> , 1997 Martin <i>et al.</i> , 2002 Parsons <i>et al.</i> , 1996 ; Parsons <i>et al.</i> 1998b ; Clermont <i>et al.</i> 1997 Martin <i>et al.</i> 2002
Mutation d'un site d'épissage	I6 I7	c.868-11del7 c.922+3del4 c.922+6T→G	I II III	Lefebvre <i>et al.</i> 1995 Lefebvre <i>et al.</i> 1995 Wirth <i>et al.</i> 1999
Mutation faux-sens	E1 E3 E6 E7	A2G E134K P245L S261I Y272C T274I G275S G279C G279V	II, III I III III I-III II, III III II, III I	Parsons <i>et al.</i> 1998b Clermont <i>et al.</i> 1997 Rochette <i>et al.</i> , 1997 Hahnen <i>et al.</i> 1997 McAndrew <i>et al.</i> , 1997 Lefebvre <i>et al.</i> 1995 Wirth <i>et al.</i> 1999 Hahnen <i>et al.</i> 1997 Wirth <i>et al.</i> 1999 Parsons <i>et al.</i> 1998b Burglen <i>et al.</i> , 1996c Wang <i>et al.</i> , 1998 Talbot <i>et al.</i> 1997

Le gène *SMN* est associé à d'autres maladies neuromusculaires. Des délétions à l'état homozygote de *SMN1* ont été retrouvées, par exemple, chez des patients atteints de myopathie congénitale avec inclusions cytoplasmiques (Vajsar *et al.*, 1998). La SMA peut être

également associée à de l'arthrogrypose multiple congénitale avec ou sans déficit cardiaque chez des patients qui, cliniquement, n'avaient pas fait l'objet d'un diagnostic de SMA (Burglen *et al.*, 1996 a).

Il semble qu'il y ait une coopération fonctionnelle entre l'antigène nucléaire 2 du virus d'Epstein-Barr [EBNA2] et SMN. En effet, des études de localisation cellulaire ont montré que SMN coactive le promoteur viral en présence de cet antigène (Voss *et al.*, 2001). La méthylation d'EBNA2 est indispensable pour sa liaison à la protéine SMN et cette liaison est une étape très importante dans la transformation des lymphocytes B par le virus d'Epstein-Barr (Barth *et al.*, 2003).

1122-Le gène *NAIP*.

L'examen de la moelle épinière de patients morts de SMA permet de mettre en évidence de nombreux motoneurons qui présentent une sorte de gonflement et une chromatolyse ; ces caractères pourraient indiquer qu'ils sont en apoptose. La déplétion en motoneurons observée dans la SMA suggère qu'il existe un défaut de régulation de la voie apoptotique neuronale entraînant une persistance pathologique ou une réactivation de l'apoptose physiologique survenant pendant le développement embryonnaire. Identifié en même temps que le gène *SMN*, le gène *NAIP* est situé dans le *locus* SMA du chromosome 5 (Roy *et al.*, 1995). En raison de sa position adjacente à celle de *SMN1*, le gène *NAIP* pourrait être intéressé par les grandes délétions observées chez les patients atteints de SMA I, mais non chez les malades atteints de formes moins sévères (SMA II et III). Chez 2 % de la population générale, on trouve des délétions de la copie centromérique *NAIP* situées dans les exons codants 5 et 6, mais elles n'entraînent pas l'apparition du phénotype SMA. *NAIP* est muté de manière homozygote chez 45 % des patients atteints de SMA I et chez 18 % des patients atteints de SMA II et III. La présence ou l'absence du gène *NAIP* n'influence pas l'âge d'apparition et la durée de survie des patients atteints de SMA I ; cependant, chez ceux d'entre eux qui sont dépourvus de gène *NAIP*, la détérioration des fonctions respiratoires est plus rapide que chez ceux qui ont conservé *NAIP* (Taylor *et al.*, 1998). Chez les patients atteints de SMA I, le gène *NAIP* est délété et le nombre de copies de *SMN2* est bas alors que c'est l'inverse chez les patients atteints de SMA II et III (Campbell *et al.*, 1997). Il semble donc que les délétions du gène *NAIP* influencent la sévérité de la maladie (Akutsu *et al.*, 2002).

La protéine NAIP appartient à la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose humaine ou IAP [*inhibitor of apoptosis*] qui expriment en général dans leur région aminoterminal 1 à 3 domaines appelés *Baculovirus inhibitor of apoptosis repeats* [BIR]. Ces domaines sont définis par une séquence consensus CX₂CX₁₆HX₆₋₈ (Uren *et al.*, 1998). L'action anti-apoptotique de la protéine NAIP et des autres membres de la famille des IAP a été mise en évidence dans divers systèmes de culture cellulaire ; elle se manifeste par des effets sur la différenciation et sur la survie des cellules neuronales, notamment sur celle des motoneurones (Liston *et al.*, 1996 ; Deveraux et Reed, 1999 ; Gotz *et al.*, 2000). NAIP interagit avec l'hippocalcine et cette interaction protège les neurones de la mort cellulaire induite par le calcium par l'intermédiaire de mécanismes dépendants ou non de la caspase 3 (Mercer *et al.*, 2000). Il a également été montré que la protéine NAIP exerce son activité anti-apoptotique en inhibant directement les caspases 3 et 7 par ses domaines *BIR* (Maier *et al.*, 2002). Les délétions homozygotes des exons 5 et 6 retrouvées chez les patients atteints de SMA peuvent entraîner soit l'absence complète de NAIP, soit la production d'une protéine tronquée dans ses domaines *BIR*. Une telle protéine perd sa capacité à inhiber les caspases effectrices ou la voit en tout cas sérieusement diminuée. Il en résulte une importante mort des motoneurones déjà déficients en protéine SMN. La sévérité clinique de la SMA s'en trouve augmentée.

1123-Le gène *p44*.

Le troisième gène identifié dans le région SMA est le gène *p44* qui code une sous-unité du facteur de transcription TFIIF. Comme *SMN* et *NAIP*, *p44* existe sous forme de 2 copies (une copie centromérique et une copie télomérique) et chez les patients atteints de SMA I, il présente des délétions (Burglen *et al.*, 1997 ; Carter *et al.*, 1997). Ce facteur de transcription est impliqué dans la transcription, la réparation du DNA et le contrôle du cycle cellulaire, mais son implication dans la pathologie est inconnue.

1124-Le DNA mitochondrial.

Des études fonctionnelles réalisées sur le tissu musculaire de patients atteints de SMA indiquent que l'activité enzymatique des chaînes respiratoires ainsi que les taux d'oxydation y sont abaissés (Sperl *et al.*, 1997). Ces résultats peuvent s'expliquer par une diminution de la quantité de DNA mitochondrial et/ou une réduction du nombre de mitochondries dans le tissu

musculaire affecté. Des analyses quantitatives par empreintes de type *Southern Blot* ont mis en évidence une forte diminution de la quantité de DNA mitochondrial dans les tissus musculaires de patients atteints de SMA par rapport au DNA nucléaire, alors qu'aucune différence en terme de densité en mitochondries n'a pu être observée entre les muscles de malades et les muscles de sujets témoins, au moins par les méthodes histochimiques (Berger *et al.*, 2003). Ce phénomène semble être une conséquence de l'atrophie musculaire. En effet, celle-ci peut à elle seule conduire à une régulation négative des complexes de la chaîne respiratoire codés par des gènes nucléaires et mitochondriaux.

113-La protéine SMN.

1131-Séquence et structure.

Le gène *SMN* code une protéine de 294 AA de masse moléculaire [MM] égale à 38 kilodalton [kD]. Sa séquence n'est homologue à aucune des protéines répertoriées dans les banques de données actuelles (Figure 1.4). Elle présente un domaine riche en proline contenant un motif symétrique Pro₅-X₁₇-Pro₁₀-X₁₇-Pro₅ (où X représente un résidu quelconque) hautement conservé chez l'Homme et chez la Souris. Ce fait suggère que le domaine riche en proline joue un rôle très important (Lefebvre *et al.*, 1995 ; DiDonato *et al.*, 1997).

FIGURE 1.4.
Séquence de la protéine SMN.

MAMSSGGSG	GVPEQEEDSVL	FRRGTQSDD	SDIWDDTALI	40
KAYDKAVASF	KHALKNGDIC	ETSGKPKTTP	KRKPAAKKNKS	80
QKKNTAASLQ	QWKVGDKCSA	IWSEDGCIYP	ATIASIDFKR	120
ETCVVVYTY	GNREEQNLS	LLSPISEVAN	NIEQNAQENE	160
NESQVSTDES	ENSRSPGNKS	DNIKPKSAPW	NSFL PPPPM	200
PGPRLGPGKP	GLKFNG PPPP	PPPPPHLLS	CWLPPFPSGP	240
PI PPPP PIC	PDSLDDADAL	GSMLISWYMS	GYHTGYMGMF	280
RQNQKEGFCS	HSLN			

Cette séquence a été déduite du cDNA (Lefebvre *et al.*, 1995). Les domaines riches en proline sont représentés en gras.

Nombre de polypeptides qui possèdent ce domaine interviennent dans la polymérisation de l'actine ou sont des ligands des profilines [PFN] (Carlsson *et al.*, 1977). Il existe 2 isoformes de profilines (PFN I et PFN II) qui se différencient l'une de l'autre par leur affinité pour certains ligands. La PFN I s'exprime chez les Mammifères au moment de l'embryogenèse et elle est distribuée largement dans différents tissus et cellules, alors que la PFN II est préférentiellement localisée dans le système nerveux central et dans des neurones en culture (Witke *et al.*, 1993 ; 1998). Il a été montré que le domaine polyproline de la protéine SMN interagit avec le site de liaison correspondant des PFN, et que la forme mutée de SMN Δ 7 ne peut plus interagir ni avec elle-même, ni avec PFN (Giesemann *et al.*, 1999). Il se pourrait que la phase d'oligomérisation de SMN, nécessaire à l'expression de sa fonction, ainsi que son transport entre le cytoplasme et le noyau fussent modulés par les PFN, et plus particulièrement par la PFN II neuronale. Ce fait permettrait d'expliquer — au moins en partie — pourquoi le défaut d'une protéine ubiquiste comme l'est SMN, provoque une dégénérescence spécifique des motoneurones alors que les autres cellules restent intactes, en cas de SMA.

1132-Localisation.

(1) Localisation cellulaire.

La protéine SMN est présente dans toutes les cellules de l'organisme, à la fois dans le cytoplasme et dans noyau. Dans ce dernier, elle est localisée dans des structures particulières, appelées *gems* [pour *gemini of coiled bodies*] (Liu et Dreyfuss, 1996). Ces nouvelles structures nucléaires de 0,1 à 1 μ m de diamètre, identifiées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la protéine SMN, semblent être étroitement associées aux *coiled bodies* [CB] ou corps spiralés nucléaires. De telles structures ne constituent qu'un site de stockage pour les éléments du complexe d'épissage (Young *et al.*, 2000). En cellules HeLa, SMN et la coiline p80 (un marqueur spécifique des CB) sont exprimées dans des structures nucléaires adjacentes aux CB (Liu et Dreyfuss, 1996). C'est la coiline qui forme un pont entre ces derniers et SMN (Hebert *et al.*, 2001). Dans certaines cellules, il n'a pas été possible de mettre en évidence les *gems* ni de trancher entre l'absence totale de ces structures ou leur éventuelle présence dans des structures de si petite taille qu'elles ne sont pas visibles. Une expression élevée de SMN n'est pas suffisante pour qu'il en résulte la formation de *gems* visibles. De même, SMN ne semble pas indispensable à la formation des CB. SMN est absente dans 10 % des CB de certains

tissus et, dans les fibroblastes de patients SMA I, il se forme des CB bien que SMN y soit pratiquement indétectable. La protéine SMN dépourvue de l'exon 7 est capable de former des *gems*, mais avec une efficacité réduite. La partie aminoterminal de la protéine semble être indispensable à une localisation cellulaire correcte de SMN (Le *et al.*, 2000).

Par des techniques immunocytochimiques, on a pu mettre en évidence une réduction significative du nombre de *gems* chez les patients atteints de SMA I ainsi qu'une corrélation entre le nombre de *gems* et le degré de sévérité de la maladie (Coover *et al.*, 1997 ; Lefebvre *et al.*, 1997). Cette corrélation aide au diagnostic de la maladie et en éclaire le pronostic.

(2) Localisation tissulaire.

L'étude de l'expression de la protéine SMN dans différents tissus humains lors de l'ontogenèse et de la période post-natale montre que pendant cette dernière, le niveau d'expression de la protéine est progressivement réduit dans différents tissus. Le rôle de la protéine SMN est donc plus important pendant la vie fœtale qu'à la période post-natale dans le muscle squelettique, dans le cœur, dans le rein et dans le cerveau. De plus, l'expression de SMN dans le tissu musculaire de patients atteints de SMA I, II et III est très faible, voire absente et ce, dès avant le début de la maladie clinique. Ces faits suggèrent que l'expression de SMN est soumise à une régulation développementale et/ou hormonale inconnue jusqu'alors, et que l'on peut mettre en évidence par l'étude de la régulation du promoteur (cf PARAGRAPHE 1121(2) de la présente SECTION). Ainsi, la SMA est une maladie embryofœtale plutôt qu'une maladie post-natale (Burlet *et al.*, 1998). Dans les cellules musculaires fœtales, et uniquement dans ce type de cellules, la protéine SMN se situe dans des structures cytoplasmiques punctiformes, de taille similaire à celle des *gems* et qui n'ont jamais été décrites dans d'autres cellules (Burlet *et al.*, 1998). Il se pourrait donc que la protéine SMN joue un rôle particulier dans le tissu musculaire et que celui-ci est défectueux chez les patients atteints de SMA, qui n'expriment que très faiblement SMN comme on l'a vu ci-dessus. Une telle déficience pourrait également expliquer l'existence de certaines anomalies des fibres musculaires, détectées chez les sujets atteints de SMA.

La protéine SMN est exprimée de manière généralisée dans le système nerveux central des Mammifères. Il semble que dans les noyaux des motoneurones, les *gems* ainsi que les CB soient plus grands, plus nombreux et très souvent positionnés à côté du nucléole. Ces constatations sont de nature à éclairer la pathogénie de la SMA ; ces neurones, en effet, sont tout particulièrement affectés dans la maladie. La protéine SMN semble participer au bon

fonctionnement du nucléole des motoneurones ; en cas de SMA, celui-ci ne pourrait plus remplir convenablement son rôle. L'étude qui vient d'être résumée fournit pour la première fois un fondement anatomique aux hypothèses impliquant le gène *SMN* dans la dégénérescence neuronale associée à la SMA (Battaglia *et al.*, 1997). La protéine SMN est aussi fortement exprimée dans des neurones qui semblent ne pas être affectés en cas de SMA : les neurones pyramidaux de la couche V du neocortex, les neurones du *pallidum* du ganglion de la base, les neurones des noyaux cérébelleux profonds et les motoneurones du tronc cérébral. L'existence et la survie des motoneurones dépendent absolument de l'expression de la protéine SMN à un taux élevé. Quand 2 des 4 allèles disponibles du gène *SMN* sont mutés ou absents — c'est la situation qui prévaut chez les patients atteints SMA —, le niveau de protéine SMN passe en-dessous du seuil critique, nécessaire à la survie des motoneurones, mais il est encore compatible avec la survie des autres types cellulaires du système nerveux central.

1133-Rôle de la protéine SMN : le complexe SMN.

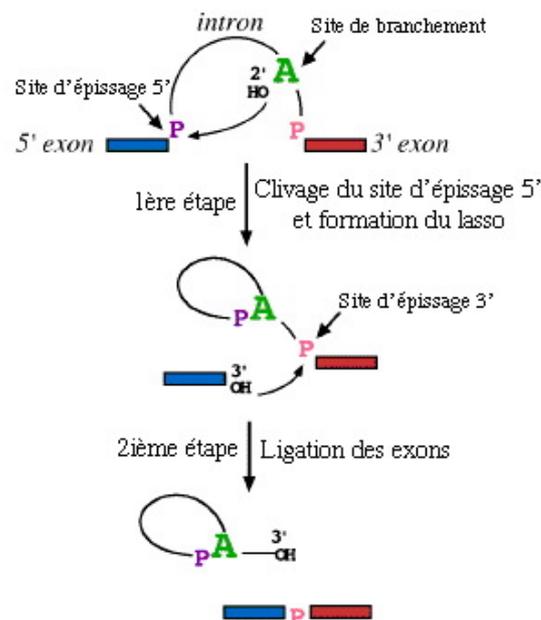
(1) La maturation des RNA pré-messagers : la réaction d'excision-épissage.

Chez les Procaryotes, l'enchaînement des AA dans les protéines reflète exactement celui des codons du RNA messenger et celui-ci est une copie strictement complémentaire du brin de DNA modèle. Il existe une colinéarité gène-protéine. Chez les Eucaryotes supérieurs, en revanche, moins de 1/10 du DNA est exprimé. Les produits de transcription primaire des gènes des Eucaryotes contiennent des séquences non codantes (les introns) et des séquences codantes (les exons). Le dogme de la colinéarité gène-protéine ne s'applique pas à ces organismes. Les séquences introniques et exoniques constituent les RNA pré-messagers, éléments du RNA hétérogène nucléaire [hnRNA pour *heterogenous nuclear RNA*]. Avant de passer dans le cytoplasme, ces précurseurs subissent une dernière phase de maturation au cours de laquelle les introns sont éliminés. Le bon déroulement de cette étape, appelée étape d'excision-épissage [*splicing* en anglais] est conditionné par l'existence de séquences consensus situées aux bornes et à l'intérieur de l'intron (Figure 1.5). Ainsi, l'extrémité 3' de l'exon 1 se termine par un G suivi par un autre G correspondant au premier nucléotide de l'intron. Le groupement OH porté par le ribose en 2' de l'A située dans l'intron est appelé site de branchement. C'est lui qui attaque le phosphate compris entre les 2 G. Il se forme une liaison phosphotriester très labile. La coupure libère l'extrémité 3' OH du G de l'exon 1. Le

phosphate forme un pont entre l'A en 2' et l'extrémité 5' de l'intron par une réaction de transestérification 2'-5' phosphate. Il se forme une structure en lasso. La deuxième étape implique une autre transestérification qui forme encore une liaison phosphotriester. La coupure libère l'intron et reforme une liaison normale 3'-5' entre les 2 exons.

FIGURE 1.5.

Mécanismes chimiques de l'excision des introns par le spliceosome. (D'après le site www.mun.ca/biochem/courses/3107/images/moorefig.gif.)

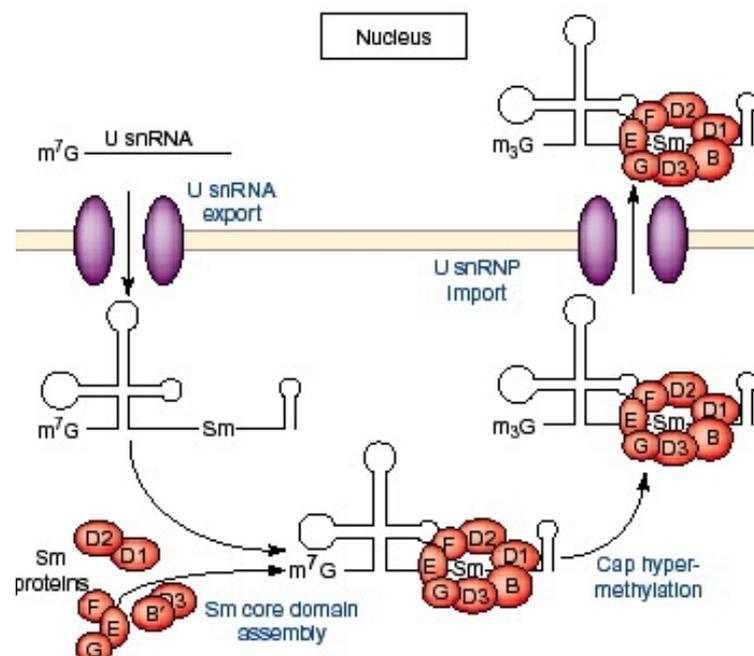


Ces étapes d'épissage sont catalysées par des structures particulières appelés *small nuclear ribonucleoproteins* [snRNP]. Le noyau contient des petits RNA de moins de 300 nucléotides appelés snRNA [pour *small nuclear RNA*] appelés U₁, U₂, U_{4/6} et U₅. Les snRNA contiennent une séquence simple brin riche en uridine (d'où leur nom), entourée de 2 épingles à cheveux qui forment le site Sm (Branlant *et al.*, 1982 ; Reddy et Busch, 1988). Ils s'associent aux protéines Sm (appelées B/B', D1, D2, D3, E, F et G) pour former les complexes snRNP. Les 7 protéines Sm s'arrangent en un anneau et s'assemblent selon un motif appelé site Sm et dont la séquence codante conservée est PuAU₄₋₆GPu (Kambach *et al.*, 1999 ; Branlant *et al.*, 1982 ; Nagai *et al.*, 2001). Chaque snRNP contient 1 snRNA pour U₁, U₂ et U₅ ou 2 snRNA pour U_{4/6}, au moins 7 protéines Sm, et des polypeptides qui leur sont spécifiques (Mattaj et De Robertis, 1985 ; Will et Luhrmann, 2001). L'ensemble forme un gros complexe de 60 S appelé le *spliceosome* (on a proposé le terme d'épisséosome en

français), centre catalytique de la réaction d'excision-épissage des RNA pré-messagers. Il reconnaît les sites d'épissage — qui sont, nous l'avons vu, des séquences conservées localisées aux extrémités des exons et des introns —, ainsi que des éléments auxiliaires d'épissage comme les ESE. Les facteurs d'épissage appelés protéines SR et SR-like forment un groupe important de protéines se liant aux ESE. Ils possèdent, d'une part, des domaines riches en sérine et arginine (d'où leur nom, S et R désignant en nomenclature unilittérale la sérine et l'arginine) qui se lient aux protéines et, d'autre part, des motifs de reconnaissance qui leur permettent de se lier aux RNA. Ces protéines activent la reconnaissance d'un site d'épissage voisin.

La biogenèse des snRNP obéit à un cycle complexe d'événements qui nécessite un transport bidirectionnel des snRNA à travers la membrane nucléaire (Figure 1.6) (De Robertis, 1983 ; Mattaj et De Robertis, 1985 ; Mattaj, 1986 ; Mattaj *et al.*, 1988 ; Neuman de Vegvar et Dahlberg, 1990). Une fois transcrits dans le noyau, les snRNA sont exportés dans le cytoplasme où ils se lient par leur site Sm aux protéines Sm pour former le *core* Sm. Puis la 7-méthylguanosine m^7G de la coiffe des snRNA est hyperméthylée en 2,2,7-triméthylguanosine m_3G (Mattaj, 1986). Les protéines D1-D2 et E-F-G forment d'abord un complexe stable partiel avec le snRNA puis D3-B/B' s'ajoutent à cet ensemble pour compléter le *core*.

FIGURE 1.6.
Biogenèse des snRNPs. (D'après Meister *et al.*, 2002.)



Une fois assemblés, les snRNP recrutent les récepteurs nécessaires à l'importation nucléaire et ils sont transloqués dans le noyau où ils jouent leur rôle dans l'épissage des RNA pré-messagers (Mattaj, 1986 ; Mattaj *et al.*, 1988 ; Luhrmann *et al.*, 1990 ; Neuman de Vegvar et Dahlberg, 1990 ; Zieve et Sauterer, 1990). Dans le noyau, les snRNP naissants s'accumulent d'abord dans les CB et ce n'est que plus tard qu'ils vont se localiser dans les speckles (Sleeman et Lamond, 1999).

Le RNA pré-messager se lie d'abord à un nombre indéfini de protéines se liant au RNA pour former le complexe H (Figure 1.7). La reconnaissance du site 5' d'épissage par l' U_1 snRNP et la liaison d'autres facteurs non snRNP au point de branchement engage le RNA pré-messager dans le processus d'épissage (Legrain *et al.*, 1988 ; Seraphin et Rosbash, 1989 ; Michaud et Reed, 1991). Le complexe E qui en résulte contient également l' U_2 snRNP, mais ce dernier y est très faiblement lié (Das *et al.*, 2000). A l'étape suivante, l' U_2 snRNP se lie de façon stable au point de branchement, selon un mécanisme dépendant de l'ATP, pour former le pré-spliceosome ou complexe A (Smith *et al.*, 1989 ; Fu et Maniatis, 1990 ; Zamore *et al.*, 1992 ; Das *et al.*, 2000).

L'adjonction de la particule tri-snRNP formée par $U_{4/6}$ associé à U_5 marque alors la conversion du pré-spliceosome en spliceosome mature ou complexe B (Lamm *et al.*, 1991 ; Maroney *et al.*, 2000). De nombreux réarrangements entre les RNA ont lieu au sein du complexe B et aboutissent à la formation du réseau catalytique des RNA du spliceosome (Staley et Guthrie, 1998). Une fois établies, ces interactions entre RNA permettent le bon déroulement des réactions chimiques de l'épissage sous le contrôle du complexe C. Puis, le spliceosome se désagrège et les UsnRNP sont recyclés pour s'engager dans une nouvelle étape d'épissage.

(2) Les protéines constitutives du complexe SMN.

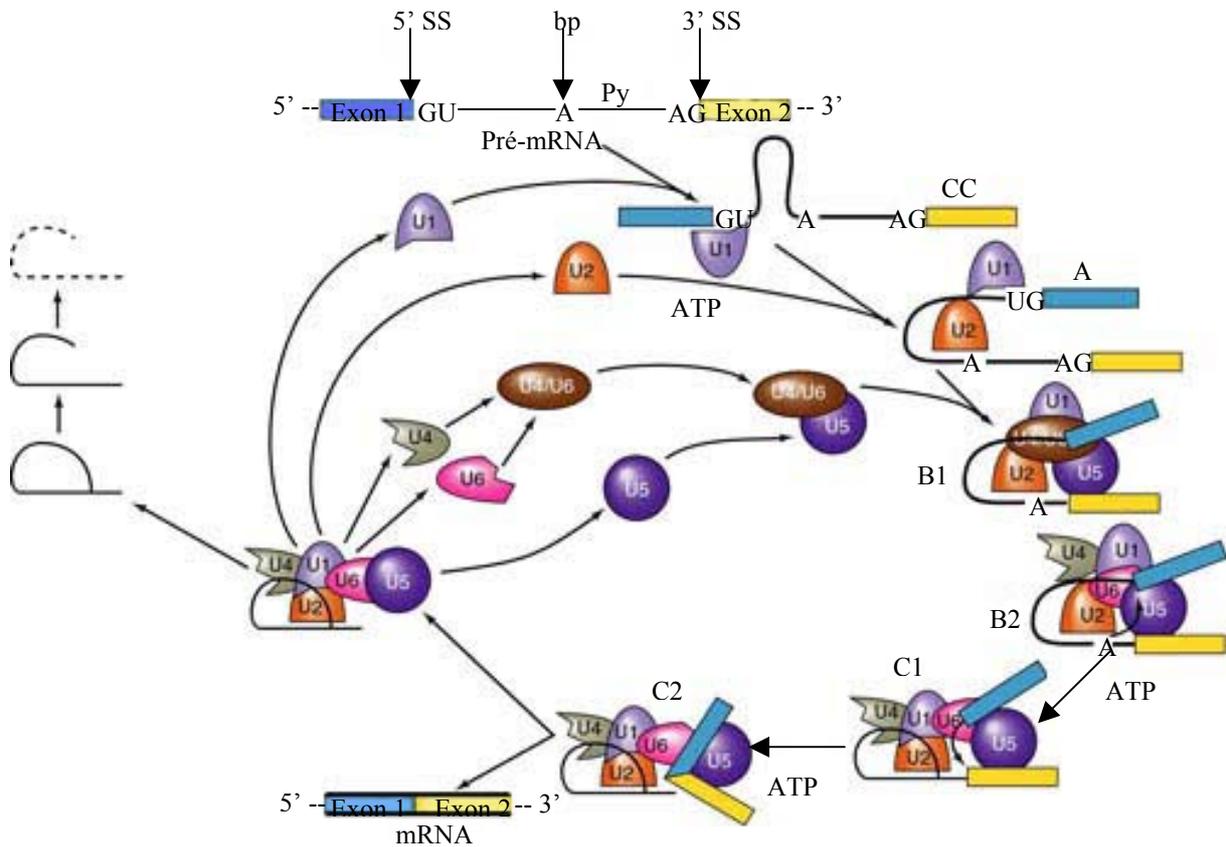
La liaison de la protéine SMN à plusieurs protéines se liant elles-mêmes au RNA, et éventuellement directement au RNA a rapidement suggéré qu'elle pouvait jouer un rôle dans la maturation des RNA messagers, mais sa fonction exacte dans le processus est encore inconnue (Liu et Dreyfuss, 1996 ; Liu *et al.*, 1996).

Il semble que toutes les protéines interagissant avec SMN soient à ce jour identifiées. Toutes sont localisées dans les *gems*, c'est pourquoi on leur a donné le nom de gémines. Le numéro qui leur a été attribué correspond à l'ordre chronologique dans lequel elles ont été

découvertes. Elles forment le complexe SMN. Celui-ci intervient dans l'épissage des RNA pré-messagers et se lie à de nombreux autres éléments qui constituent pour lui des substrats.

FIGURE 1.7.

Le cycle d'épissage. (D'après www.blc.arizona.edu/marty/411/Modules/spliceo.html.)



Au moyen d'un criblage par double hybride, qui a fait appel à SMN comme amorce, la première protéine identifiée comme se liant à celle-là a été la protéine SIP1 [pour SMN *interacting protein 1*] ou gémme 2 (Liu *et al.*, 1997). Elle forme un complexe stable avec SMN *in vitro* et *in vivo*, et les 2 protéines sont colocalisées dans les *gems* et dans le cytoplasme, ce qui suggère qu'elles fonctionnent ensemble. L'immunoprécipitation de ce complexe de 300 kD a montré qu'il contient, outre SMN et la gémme 2, des protéines Sm du *core* Sm (B/B', D, E, F, G, U₁A) ainsi que d'autres protéines identifiées plus tard. SMN interagit directement avec les protéines D1, D3, B/B' et E ce qui suggère que le complexe SMN joue un rôle important dans la biogénèse des snRNP et/ou dans leur fonction (Friesen et Dreyfuss, 2000). L'existence d'une homologie de séquence significative entre la gémme 2 et

la protéine Brr1 de levure vient conforter cette idée (Noble et Guthrie 1996 a ; 1996 b). En effet, Brr1 est impliquée dans la biogenèse des snRNP chez *S. cerevisiae*.

La micro-injection de SMN dans des oocytes de Xénope a permis d'éclairer sa fonction et celle de son premier partenaire, la gémme 2 (Fischer *et al.*, 1997). Il existe dans la protéine SMN 2 domaines distincts, susceptibles d'interagir avec plusieurs protéines Sm et avec la gémme 2 d'une part, et d'autre part, avec d'autres molécules de protéine SMN (Liu *et al.*, 1997 ; Liu et Dreyfuss, 1996). L'extrémité aminoterminal de SMN est étroitement associée à la gémme 2 alors que son extrémité carboxyterminale possède un domaine conservé YG, nécessaire à l'auto-assemblage et à l'interaction avec les snRNP du *core* Sm (Lorson *et al.*, 1998). L'oligomérisation de SMN lui permet d'entrer en interaction efficace avec SmB, SmD1 et SmD3 ; on suppose que cette oligomérisation crée un site de liaison à haute affinité pour les protéines Sm (Pellizzoni *et al.*, 1999). SMN interagit directement avec les protéines Sm par leurs séquences RG (Friesen et Dreyfuss, 2000). Fait intéressant à relever, la région qui est impliquée dans la liaison de SMN aux protéines Sm est codée par les exons 6 et 7 du gène *SMN*, sièges de la plupart des mutations trouvées chez les patients atteints de SMA. Les mutants de la protéines SMN présentent donc des anomalies de liaison avec les protéines snRNP, observables *in vitro* et *in vivo*. On en déduit que des anomalies de la biogenèse des snRNP constituent le fondement moléculaire du phénotype SMA (Pellizzoni *et al.*, 1999).

Trois nouveaux variants d'épissage de la gémme 2 (gémme 2- β , - γ , - δ), en plus de la forme intacte de la protéine (appelée gémme 2- α), ont été découverts (Aerbajinai *et al.*, 2002). L'analyse des niveaux d'expression de ces différentes isoformes de gémme 2 a révélé qu'il y a une importante augmentation de la quantité de gémme 2- β dans les tissus de patients atteints de SMA par comparaison aux tissus de sujets normaux. En revanche, le niveau d'expression de la gémme 2- α est fortement diminué dans les tissus des malades souffrant de SMA. Un changement quantitatif dans l'expression des variants d'épissage de la gémme 2 semble donc être associé à la mort motoneuronale anormale observée dans les maladies neurodégénératives (Aerbajinai *et al.*, 2002). Des souris dont les gènes *gemin 2* et *Smn* ont été invalidés sur le mode hétérozygote présentent une dégénérescence des motoneurons lombaires plus importante que les souris dont seul le gène *Smn* a été invalidé sur le même mode. Les motoneurons en voie de dégénérescence présentent un défaut dans l'assemblage des snRNP. Les souris *gemin 2*^{+/-} apparaissent normales, et, en particulier ne présentent aucun signe de perte motoneuronale. Il est intéressant de noter que les souris *gemin 2*^{+/-} expriment la gémme 2 dans leur moelle épinière à des taux comparables à ceux que l'on observe dans la moelle de

souris sauvages, et ce, malgré l'absence d'un allèle du gène. Dans les autres tissus, le niveau d'expression de la gémme 2 est réduit de moitié. Ces observations suggèrent donc que, dans la moelle épinière, le niveau d'expression de la gémme 2 est régulé spécifiquement (Jablonka *et al.*, 2002).

Pour exercer ses fonctions, SMN doit ou bien posséder une activité intrinsèque, ou bien recruter des protéines capables d'induire activement des transitions structurales dans les snRNP cibles. La plupart des facteurs capables d'assembler et de séparer des éléments de la machinerie d'épissage sont des RNA hélicases à boîte DEAD/DEAH. Une de ces protéines, appelée gémme 3 ou dp103 est colocalisée dans les *gems*, avec SMN et avec la gémme 2. Le domaine carboxyterminal de la gémme 3 en convoie l'interaction directe avec SMN ainsi que la localisation dans les *gems*. La gémme 3 interagit également avec plusieurs protéines du *core* Sm dont B/B', D2 et D3. Elle est distribuée de façon uniforme dans le cytoplasme où a lieu l'assemblage des snRNP (Charroux *et al.*, 1999).

La gémme 4 ou GIP1 est un autre composant du complexe SMN et colocalise avec cette protéine dans les *gems* (Charroux *et al.*, 2000). Elle interagit directement avec la gémme 3 mais pas avec SMN. Elle établit également des liens directs avec plusieurs protéines Sm dont B, D1 et D3, et E, et elle est associée aux snRNA U₁ et U₅ dans les oocytes de Xénope. La gémme 4 ne présente d'homologie de séquences avec aucune autre protéine connue. Son étroite association à la gémme 3 suggère qu'elle pourrait agir comme cofacteur de l'activité ATPasique et/ou hélicase de cette dernière. Elle est par ailleurs la seule gémme à être détectée dans le nucléole, ce qui donne à penser qu'elle exerce des fonctions supplémentaires, probablement dans la biogenèse des ribosomes. Ainsi, cette protéine ferait le lien entre SMN et la biogenèse des UsnRNA d'une, et la biogenèse des RNA ribosomaux, de l'autre.

La gémme 5 ou p175 se lie à SMN à la fois *in vivo* et *in vitro*. On la retrouve dans le cytoplasme, dans les *gems* nucléaires et dans le nucléole (Gubitz *et al.*, 2002). Elle possède un motif en hélice α *coiled coil* du côté carboxyterminal et 13 répétitions tryptophane-arginine (WR) du côté aminoterminal. Ces 2 structures sont des domaines d'interactions protéine-protéine. La gémme 5 interagit avec les protéines Sm B, D1, D3 et E du *core* Sm et jouerait donc un rôle dans l'assemblage des snRNP.

La gémme 6 n'a d'homologie de séquences avec aucune autre protéine et ne présente aucun motif qui permettrait de lui suggérer une fonction (Pellizzoni *et al.*, 2002). Elle interagit de façon spécifique avec les protéines Sm D2 et E et à moindre degré avec SmB et D3.

La gémme 7 interagit directement avec la gémme 6 et avec SMN, et forme un pont entre les 2. Des répétitions RG dans la partie aminoterminal de cette protéine sont nécessaires à la bonne survenue de cette interaction, mais elles ne sont pas suffisantes (Baccon *et al.*, 2002). La gémme 7 interagit fortement avec la protéine SmE et plus faiblement avec les SmB, D2 et D3.

Il semble que tous les éléments constitutifs du complexe SMN aient été aujourd'hui identifiés. La figure 1.8 donne un schéma général de ce complexe, schéma qui tient compte de la composition connue des composants et de leurs interactions. Par souci de simplicité, ce complexe est présenté sous la forme d'un dimère, bien qu'il forme des oligomères d'ordre supérieur *in vivo* (Liu *et al.*, 1997 ; Charroux *et al.*, 1999 ; 2000 ; Meister *et al.*, 2000 ; Paushkin *et al.*, 2002). La stœchiométrie des divers composants est encore inconnue ; cependant les interactions individuelles dans le complexe sont bien déterminées : SMN interagit directement avec la gémme 2, la gémme 3, la gémme 5 et la gémme 7, alors que la gémme 4 est associée au complexe par l'intermédiaire de la gémme 3. L'interaction de la gémme 6 avec le complexe nécessite la présence de la gémme 7.

(3) Les substrats du complexe SMN.

L'assemblage du *core* Sm est dépendant de l'ATP ; *in vivo*, il nécessite la présence de facteurs, dont l'association au complexe SMN, par ailleurs régulée, est une étape cruciale (Fischer *et al.*, 1997 ; Buhler *et al.*, 1999 ; Meister *et al.*, 2001 a). La liaison directe de SMN aux protéines Sm est fortement augmentée par la modification des R (arginines) des protéines B/B', D1 et D3 en diméthylarginines [DMR] (Buhler *et al.*, 1999 ; Brahms *et al.*, 2001 ; Friesen *et al.*, 2001). Le complexe SMN n'est pas le seul à être impliqué dans ce phénomène : celui de méthyltransférase l'est aussi. Appelé PRMT5 ou méthylosome, ce dernier fonctionne comme l'unité d'assemblage provoquant la formation active des snRNP. En fait, après chaque tour d'assemblage, le complexe SMN doit être rechargé en protéines Sm neuves pour retrouver son activité. Cette étape est régulée par le complexe PRMT5 (Meister *et al.*, 2001 b ; Friesen *et al.*, 2001 ; Pu *et al.*, 1999), qui non seulement active les protéines Sm par transformation des DMR et promeut leur transfert ultérieur dans le complexe SMN, mais encore stimule l'activité du complexe SMN pour la réaction d'assemblage des snRNP (Meister *et al.*, 2002).

La protéine SMN interagit avec une nouvelle sous-famille de protéines appelées les hnRNP Q. Ces dernières forment un groupe d'environ 30 protéines qui se lient aux RNA pré-messagers et messagers, jouent un rôle crucial dans tous les aspects de la maturation des RNA pré-messagers, notamment dans leur épissage, dans le transport des mRNA, dans la transcription, et dans la stabilisation et le recyclage des snRNP (Dreyfuss *et al.*, 1993 ; Burd et Dreyfuss, 1994 ; Krecic et Swanson, 1999 ; Shyu et Wilkinson, 2000). Les protéines de la sous-famille des hnRNP Q (comprenant Q1, Q2 et Q3) résultent de l'épissage alternatif d'un gène commun ; elles interagissent *in vitro* et *in vivo* avec SMN (Mourelatos *et al.*, 2001). On trouvera en ANNEXE, SECTION 67 un Tableau récapitulant ces données.

Comme il est indiqué dans le PARAGRAPHE précédent, l'hyperméthylation de la coiffe des snRNA de m⁷G en m₃G est un signal indispensable à l'efficacité de l'importation nucléaire des snRNP nouvellement formés. Or l'hyperméthylase humaine de la coiffe des snRNA se lie directement à la protéine SMN *in vitro* et *in vivo* (Mouaikel *et al.*, 2003). Ce fait suggère que la genèse d'un mauvais signal de localisation nucléaire des snRNP représente un important défaut moléculaire qui pourrait être impliqué dans la pathogénie de la maladie.

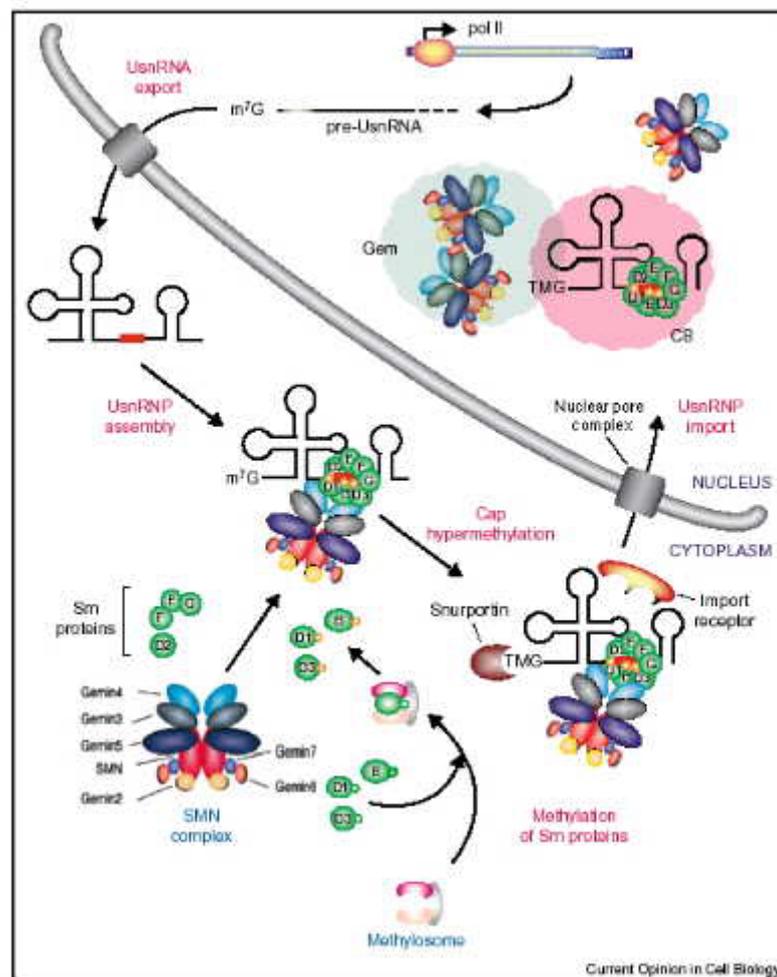
Les fonctions du complexe SMN ne se limitent pas au métabolisme des snRNP d'épissage ; elles s'étendent aux RNP nucléolaires et sans doute à d'autres RNP comme les télomérases. La transcription des RNA préribosomiques, leur maturation et l'assemblage des ribosomes a lieu dans le nucléole où les rRNA sont transcrits, puis clivés en molécules 28 S, 18 S et 5,8 S et enfin modifiés par méthylation et pseudo-uridylation des bases. Ces réactions sont convoyées par des petites particules de ribonucléoprotéines nucléolaires ou *small nucleolar ribonucleoproteins* [snoRNP]. Il a été montré que la fibrillarine et GAR1, 2 marqueurs spécifiques des snoRNP, se lient directement à la protéine SMN sauvage, mais non aux formes mutées des patients atteints de SMA (Pellizzoni *et al.*, 2001). Ainsi, le complexe SMN pourrait également intervenir dans la maturation des rRNA.

(4) En résumé.

On peut résumer comme il suit l'intervention du complexe SMN dans la biogenèse des snRNP (Figure 1.8). Les snRNA sont transcrits par la RNA polymérase II [pol II] sous forme de précurseurs contenant une coiffe (m⁷G) en 5'. La reconnaissance de cette coiffe par certaines structures entraîne l'exportation des snRNA dans le cytoplasme. Ceux-ci se lient au complexe SMN qui contient les protéines Sm. Les protéines Sm D1, D3 et peut-être B sont les premières à être méthylées par le méthylosome ; il y apparaît des DMR symétriques qui les

dirigent vers le complexe SMN. Il semble que le complexe SMN réunit les snRNA et les protéines Sm en se liant à chacune de ces structures. Il en résulte la production de snRNP. Cette étape est nécessaire pour l'hyperméthylation de la coiffe et pour la maturation de l'extrémité 3' des snRNA.

FIGURE 1.8.
Intervention du complexe SMN dans la biogenèse des snRNP. (D'après Massenet *et al.*, 2002.)



Un *core* Sm correctement assemblé ainsi que la coiffe m₃G sont les conditions préalables à l'importation des snRNP dans le noyau. La coiffe m₃G se lie spécifiquement à la snurportine qui interagit ensuite avec l'importine β. C'est l'ensemble de ce complexe, accompagné d'un récepteur non encore défini (appelé *import receptor*) ; qui reconnaît le *core* Sm lequel convoie l'importation des snRNA. Le complexe SMN n'est pas relargué des

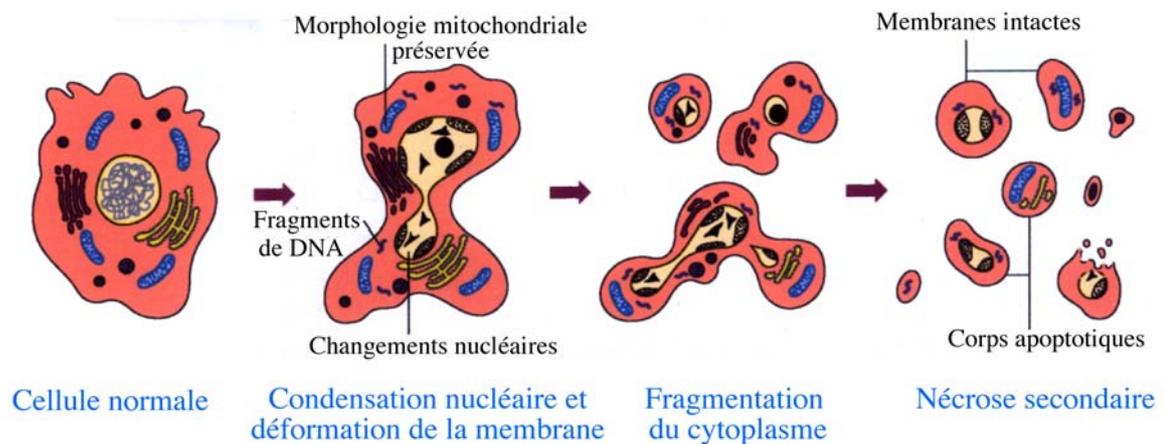
particules snRNP après l'assemblage du *core* Sm ; il est présent pendant et après l'hyperméthylation de la coiffe. Il reste lié aux UsnRNP après qu'ils ne soient importés dans le noyau. Ainsi, le rôle du complexe SMN ne se limite pas à l'assemblage du *core* Sm, il est également impliqué dans la biogenèse complète des snRNP dans le cytoplasme.

1134-SMN et apoptose.

Contrairement à la nécrose qui est accidentelle et souvent associée à une maladie, l'apoptose est un phénomène physiologique qui n'est jamais associé à un processus inflammatoire. L'apoptose intervient physiologiquement dans le développement embryonnaire. C'est une mort cellulaire programmée qui permet d'éliminer sélectivement les cellules devenues indésirables pour l'organisme. Les événements conduisant à la mort de la cellule sont très rapides et se déroulent selon un mécanisme très précis (Figure 1.9). Le noyau cellulaire commence à se condenser puis il se fragmente. Les chromosomes sont clivés en fragments de taille régulière et le cytoplasme donne naissance à des petites vésicules qui sont rapidement ingérées par les cellules voisines. Cependant, la membrane cellulaire ne se rompt pas ce qui évite la libération de toute substance inflammatoire dans le milieu extérieur. L'expression de certaines molécules spécifiques à la surface de la cellule apoptotique permet aux cellules voisines ou à des macrophages de la reconnaître et de l'ingérer. L'apoptose est donc un processus d'auto-destruction commandé par la cellule elle-même. L'analyse de ce phénomène lors de l'ontogénèse du Nématode *C.elegans* a permis de montrer que le programme d'apoptose est génétiquement déterminé (Hengartner et Horvitz, 1994). Il repose sur la parfaite inter-régulation de 2 types de gènes et de leurs produits. Les uns ont pour rôle d'interrompre prématurément la vie de la cellule en provoquant son suicide ; les autres ont pour fonction de permettre la survie de la cellule. Les gènes de survie sont dominants : c'est l'absence des molécules codées par les gènes de survie qui déclenche le suicide sous l'effet des produits des gènes tueurs.

La famille des gènes *Bcl-2* est subdivisée en 2 sous-familles antagonistes : la première code des produits favorisant la survie ; elle comprend *Bcl-2* (Hockenbery *et al.*, 1990) et *Bcl-xl* (Boise *et al.*, 1993) ; la seconde code des produits impliqués dans le suicide cellulaire ; elle comprend *Bax* (Olivai *et al.*, 1993) et *Bad* (Yang *et al.*, 1995). Les protéines codées par ces 2 sous-famille de gènes interagissent et ainsi se neutralisent. C'est la proportion respective des 2 types de produit qui détermine le devenir de la cellule.

FIGURE 1.9.
Événements cellulaires de l'apoptose. (D'après le catalogue APOPTOSIS de Roche Molecular Biochemical, 2000.)



Depuis longtemps, la mort cellulaire programmée des motoneurones est considérée comme un élément important de la pathogénie de la SMA. En effet, dès 1996, une diminution de l'expression de Bcl-2 a été mise en évidence dans les fibres musculaires de patients atteints de SMA (Tews et Goebel, 1996). Puis, il est montré que SMN se lie à Bcl-2 et est colocalisé avec cette molécule anti-apoptotique (Iwahashi *et al.*, 1997). Lorsque SMN et Bcl-2 sont coexprimées dans les cellules HeLa, elles agissent en synergie pour contrebalancer les effets pro-apoptotiques des protéines Bax et Fas. La protéine SMN se lie également à p53 ; on peut donc supposer qu'elle a un rôle anti-apoptotique (Young *et al.*, 2002). C'est son extrémité carboxyterminale qui semble indispensable à la fonction anti-apoptotique, celle-là même qui est absente dans la forme tronquée SMN Δ 7 (Vyas *et al.*, 2002). Il a été prouvé que SMN, Bcl-2 et Bax sont localisées dans la région post-synaptique des jonctions neuromusculaires normales. La protéine SMN post-synaptique normale pourrait maintenir les interactions antérogrades et rétrogrades entre le nerf et le muscle notamment en modulant ou soutenant l'expression de signaux trophiques émis par le motoneurone. En cas de SMA, la protéine SMN mutée post-synaptique est quantitativement déficiente et ne peut pas jouer son rôle (Broccolini *et al.*, 1999). Dans les neuropathies périphériques chroniques, SMN est associée à Bcl-2. Il se pourrait qu'ainsi les fibres musculaires cherchent à endiguer un phénomène proche de l'apoptose, et à contrecarrer l'effet de Bax dont l'expression est associée à une importante amyotrophie avancée consécutive à la dénervation chronique. Dans les fibres musculaires humaines en voie de régénération, fibres que l'on observe dans de nombreuses maladies, SMN, Bcl-2 et Bax sont coexprimées.

L'expression de la protéine SMN est régulée au cours du développement, et les protéines de la famille de Bcl-2 participent également à ce phénomène ainsi qu'à la régénération de nombreux tissus. Dans le muscle adulte, il se pourrait que la surexpression de SMN et Bcl-2, agissant soit en synergie, soit indépendamment, protège les fibres musculaires en cours de réparation/régénération contre les effets apoptotiques induits par Bax ou par d'autres facteurs pro-apoptotiques.

Au cours du développement embryonnaire, on observe une augmentation du nombre de cellules présentant une fragmentation du DNA dans la moelle épinière de fœtus atteints de SMA I. Il semble donc que la mort cellulaire programmée est augmentée de façon aberrante chez ces patients. Une analyse ultra-structurale des motoneurones de patients atteints de SMA I confirme qu'un grand nombre de ces cellules sont en apoptose (Simic *et al.*, 2000).

La comparaison du contenu en Bcl-2 et Bcl-X d'extraits protéiques préparés à partir de moelle épinière de fœtus atteints de SMA I et de fœtus sains montre que l'expression de Bcl-2 dans les motoneurones des malades est diminuée et que celle de Bcl-X y est retardée. De tels résultats confirment que ces 2 protéines pourraient jouer un rôle dans l'apoptose anormale des motoneurones observée en cas de SMA (Soler-Botija *et al.*, 2002).

Il a été possible de développer un vecteur viral capable de transférer des gènes dans des neurones en culture et *in vivo* (Hardwick *et al.*, 2000) en utilisant à cette fin le virus Sindbis. Dans ce système, le virus joue non seulement le rôle du vecteur pour l'expression de protéines hétérologues dans les neurones, mais il joue aussi celui de déclencheur de la mort cellulaire. La forme intacte du gène *SMN* s'est ainsi montrée capable d'inhiber l'apoptose neuronale induite par le virus, tandis que les gènes des formes mutantes de *SMN* trouvées chez des patients atteints de SMA au contraire l'augmentent (Kerr *et al.*, 2000). Une forme immunoréactive de SMN de 29 kD a été détectée uniquement dans les cellules apoptotiques transfectées par un vecteur exprimant le gène normal alors qu'elle était complètement absente des cellules non atteintes. Il se pourrait donc que la protéine SMN fût clivée dans les cellules apoptotiques, et y libère des facteurs pro-apoptotiques.

114-Modèles animaux des amyotrophies spinales progressives.

Il est indispensable de pouvoir disposer de modèles animaux, notamment murins, de SMA, non seulement pour mieux élucider la pathogénie moléculaire de la maladie, mais aussi pour éprouver de possibles stratégies thérapeutiques.

L'homologue du gène *SMN* humain n'est présent qu'à une seule copie chez la Souris. Il est appelé *Smn* (Viollet *et al.*, 1997). De nombreuses souris présentent des mutations spontanées associées à une dégénérescence motoneuronale, mais à ce jour, on n'en connaît aucune dans le gène *Smn*. Il a donc été produit des souris déficientes en gène *Smn* — de génotype *Smn*^{-/-} (Schrank *et al.*, 1997). Ces souris ont un développement embryonnaire normal jusqu'au stade *morula* compactée ; passé ce stade, les embryons présentent des altérations morphologiques et des changements dégénératifs qui conduisent à leur mort avant même qu'ils ne soient implantés dans l'utérus. Ce stade correspond justement au déclenchement de la transcription embryonnaire. Avant qu'ils ne soient atteints, la présence de transcrits maternels compense probablement l'absence d'expression de *Smn*. Ces travaux ont permis de confirmer que l'expression du gène *Smn* (et par inférence, celle du gène *SMN* humain) est essentielle au développement embryonnaire normal et à la survie.

Il a fallu attendre l'année 2000 pour que soient construits plusieurs modèles animaux de SMA.

1141-Modèles ciblant le nerf.

La maintenance des fonctions du motoneurone requiert l'expression de taux plus importants de protéine SMN que celle d'autres cellules. La protéine SMN pourrait donc avoir un rôle spécifique, encore inconnu, dans les motoneurones, et ce rôle ne pourrait pas être joué par le produit du gène centromérique. Pour étudier les conséquences d'une réduction de la disponibilité de SMN dans les motoneurones, on a étudié ceux-ci chez des souris *Smn*^{+/-} présentant une inactivation hétérozygote du gène *Smn* (Jablonka *et al.*, 2000). Ces animaux développent une dégénérescence motoneuronale qui commence après la naissance et qui progresse jusqu'au sixième mois ; la progression ralentit entre le sixième et le douzième mois. De telles observations concordent avec celles que l'on a faites chez des patients atteints de SMA III ; on rappelle que ces derniers ne présentent pas de déficit moteur avant l'âge de 3 à 6 ans et que, chez eux, le phénotype typique SMA n'apparaît que plus tard. Ainsi, les souris hétérozygotes pour *Smn* présentent un phénotype qui rappelle celui d'une SMA III. C'est le premier vrai modèle animal mimant cette maladie.

Une autre stratégie a consisté à produire des souris au gène *Smn* invalidé, mais rendues viables par l'introduction du transgène *SMN2* humain dans leur patrimoine génétique. Ces Souris ont donc un génotype *Smn*^{-/-}*SMN2*. Deux méthodes ont été utilisées pour produire ces animaux (Figure 1.10). La première a consisté à introduire le gène *SMN2* humain entier dans

une souche au fond génétique *Smn*^{-/-} : ce modèle mime la situation des patients atteints de SMA chez qui la protéine SMN est présente tout le temps, mais à des taux plus faibles. Les souris ainsi engendrées présentent des symptômes identiques à ceux des patients SMA atteints de SMA I (Monani *et al.*, 2000). Une seconde méthode a permis d'obtenir le même phénotype en croisant des souris *Smn*^{+/-} avec des souris transgéniques porteuses du fragment de DNA couvrant le gène *SMN2* humain ainsi qu'une partie de *NAIP* et *H4F5* (Hsieh-Li *et al.*, 2000). Les souris ainsi obtenues ont été baptisées "SMA-like". Toutes sont affectées, mais l'aspect clinique de l'atteinte est très variable. Certains animaux meurent immédiatement, d'autres survivent quelques semaines et les troisièmes survivent et se reproduisent normalement. Les souris au phénotype le plus sévère possèdent un très petit nombre de copies du transgène *SMN2* (Monani *et al.*, 2000) ou produisent de faibles quantités de protéine SMN (Hsieh-Li *et al.*, 2000) tandis que les animaux présentant des formes plus légères sont associées à un nombre plus élevé de copies de *SMN2*.

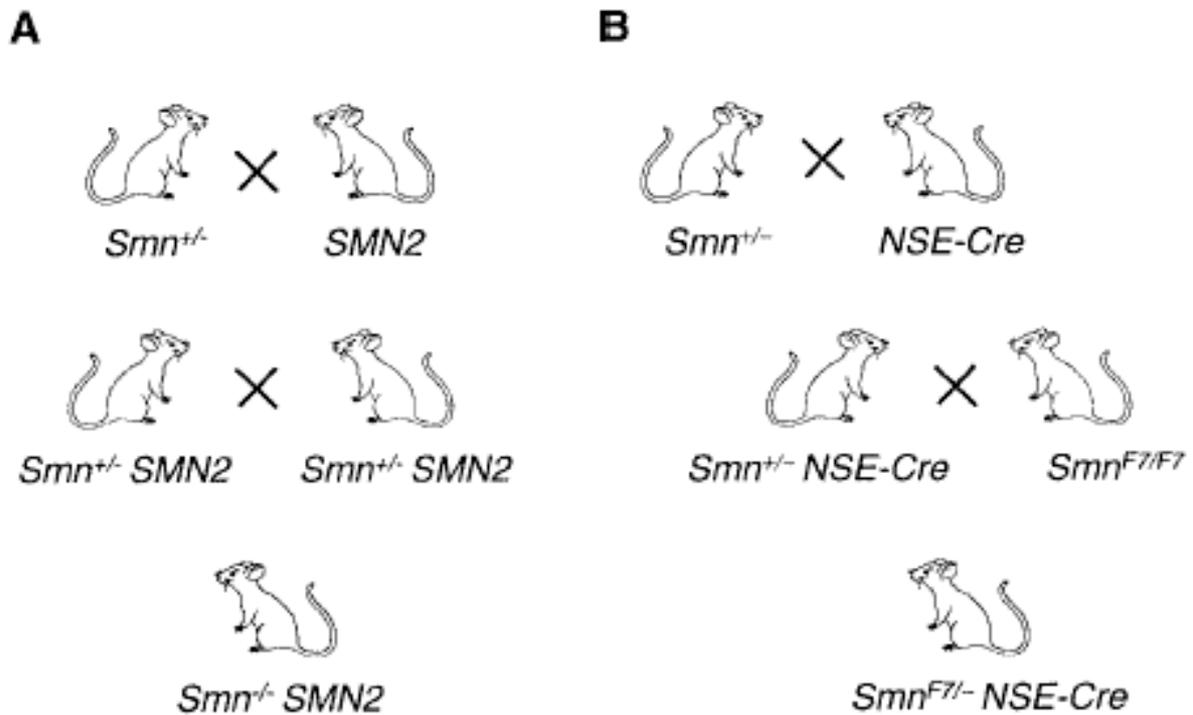
Une autre approche a consisté à produire une délétion conditionnelle de l'exon 7 du gène *Smn* murin en utilisant le système de recombinaison Cre/loxP du bactériophage P1. Le gène de la recombinase *Cre* est exprimé sous le contrôle du promoteur de l'énolase spécifique des neurones [NSE pour *neuron specific enolase*] afin d'induire la délétion de *Smn* seulement dans ces cellules. Ces souris sont normales à la naissance, mais 2 semaines après, elles développent des déficits moteurs et des tremblements, et elles finissent par se paralyser. Elles meurent 17 à 36 jours après la naissance. Les muscles squelettiques présentent tous les signes histologiques de la dénervation (atrophie des fibres musculaires associée à une expression extrajonctionnelle des récepteurs à l'acétylcholine), mais les corps cellulaires des motoneurons sont apparemment normaux (Frugier *et al.*, 2000).

Pour ces souris, aucune observation histologique ni mesure électrophysiologique des muscles et des nerfs périphériques comparable à celles réalisées pour l'évaluation du diagnostic SMA ne sont disponibles, de même qu'une démonstration que la maladie est restreinte au système moteur.

1142-Modèles ciblant le muscle.

Le même système Cre/loxP a été utilisé pour cibler cette fois-ci le muscle (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2001). Le transgène de la recombinase *Cre* a été placé sous le contrôle du promoteur du gène de l' α -actine humaine afin de produire des souris mutantes dans lesquelles

FIGURE 1.10.
Modèles génétiques murins pour la SMA. (D'après Schmalbruch et Haase, 2001).



[A] Modèle de Monani et Li.

[B] Modèle de Frugier.

la délétion de l'exon 7 de *SMN* est restreinte au muscle squelettique. Une importante réduction d'expression de la forme intacte de la protéine SMN est détectée chez ces souris, alors que la forme *SMN* Δ 7 est prédominante. Cette manipulation génétique produit un animal présentant un phénotype sévère, caractérisé par une paralysie musculaire qui commence après 3 semaines de vie et évolue rapidement vers la mort à l'âge de 33 jours. L'analyse histologique des muscles montre que ces souris mutantes développent une myopathie progressive. Ce modèle a permis de confirmer une hypothèse émise par notre laboratoire bien antérieurement, à savoir que le muscle est aussi une cible du défaut du gène *SMN* et que le muscle est fortement impliqué dans le défaut moteur observé chez les malades et, selon nous, dans la mort des motoneurons.

Dans un autre modèle, la délétion de l'exon 7 du gène *Smn* s'exprime soit dans les cellules satellites et les myotubes, soit dans les myotubes seulement. Quand les cellules satellites sont mutées, les souris développent un processus de myopathie sévère, une paralysie motrice progressive et elles meurent précocement 1 mois après leur naissance. Ces souris ont été appelées mutants sévères. Elles présentent une diminution de la régénération musculaire

corrélative à un défaut des précurseurs myogéniques observables à la fois *in vitro* et *in vivo*. Au contraire, quand les cellules satellites restent intactes, les souris développent aussi un processus de myopathie, mais le phénotype est moins grave, la survie moyenne est de 8 mois et les performances motrices sont analogues à celles des témoins. Ces mutants sont dits légers. On y observe une forte proportion de myofibres en régénération exprimant SMN. Ce phénomène compense la perte progressive des myofibres matures survenue au cours des 6 premiers mois de vie. Ainsi, malgré des propriétés contractiles normales, les mutants légers voient leur la force et leur masse musculaire se réduire progressivement. Le déclin progressif du processus de régénération musculaire n'est plus capable de contre-balancer la dégénérescence musculaire qui conduit à une perte spectaculaire de myofibres. Les cellules satellites intactes augmentent de façon remarquable la survie et les performances motrices des souris mutantes souffrant de myopathies chroniques, mais leur potentiel régénérateur est limité (Nicole *et al.*, 2003). Ces travaux pourraient ouvrir des nouvelles voies thérapeutiques.

115-Essais de thérapie génique.

Différentes stratégies peuvent être envisagées pour traiter les malades souffrant de SMA. La plus logique consiste à leur fournir la forme normale du gène *SMN* pour pallier la mutation de leur gène *SMN* endogène. Une autre serait de modifier l'expression de *SMN2* en changeant l'épissage de ses exons de manière telle que l'exon 7 soit incorporé plus fréquemment ou exclusivement dans les mRNA issus de ce gène. On peut aussi envisager d'utiliser la thérapie génique pour transférer des gènes codant des protéines susceptibles d'empêcher le développement de la maladie. Ce type de traitement ne serait alors que palliatif.

1151-Modification de l'épissage du gène *SMN*.

L'une des thérapies potentielles de la SMA consiste à identifier ou à produire des molécules capables de stimuler l'inclusion de l'exon 7 dans les mRNA issus de *SMN2* afin d'augmenter la quantité de molécules de protéines SMN intactes produites. Pour étudier les phénomènes d'inclusion ou d'exclusion de l'exon 7, il a été construit différents vecteurs de mini-gènes contenant les exons 6 à 8 et les introns correspondants des gènes *SMN1*, *SMN2*, et *SMN1ex⁷* (un gène dans lequel C est remplacé par T à la position +6 de l'exon 7, ce qui modifie l'épissage, en rendant cette région analogue à celle qui existe dans le gène *SMN2*)

(Lorson *et al.*, 1999). Ces mini-gènes ont été cotransfectés dans des cellules avec des gènes codant divers facteurs intervenant dans l'épissage, fusionnés avec le gène de la GFP. Il a été possible, dans ces conditions, d'identifier une protéine SR, la Htra2- β 1 comme un facteur capable de moduler l'expression de *SMN2* chez la Souris (en cellules NIH3T3) et chez l'Homme (en cellules HEK 293), et d'inverser le motif d'épissage de *SMN2* en un motif comparable à celui du gène *SMN1* normal. La protéine SMN de pleine longueur est produite en grande quantité quand la cellule est cotransfectée avec un mini-gène *SMN2* et le gène codant Htra2- β 1 (Hofmann *et al.*, 2000). Cette augmentation résulte de la formation d'un complexe entre Htra2- β 1 et la protéine du spliceosome hnRNP G appartenant à la famille des protéines Sm. Ce complexe, qui se lie à la séquence SE2 du gène SMN, promeut l'inclusion de l'exon 7 (Hofmann et Wirth, 2002).

Le système de mini-gènes comprenant les exons 6 à 8 de divers gènes *SMN* fusionné avec un gène rapporteur (GFP ou luciférase) a permis de mettre au point un système de criblage à haut débit et d'identifier des molécules capables de réguler l'épissage de *SMN* comme le vanadate de sodium, un inhibiteur des phosphatases (Zhang *et al.*, 2001) ou le butyrate de sodium (Chang *et al.*, 2001).

L'aclarubicine s'est également montrée capable d'induire efficacement l'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits du gène *SMN2* endogène, dans des fibroblastes de patients atteints de SMA I, ainsi que dans les transcrits d'un mini-gène *SMN2* introduit dans une lignée cellulaire de motoneurones NSC34 (Andreassi *et al.*, 2001). Dans les fibroblastes de patients atteints de SMA I, ce traitement a augmenté la production de protéine SMN ainsi que le nombre de *gems* à des valeurs semblables à celles qui sont observées dans des tissus normaux.

Ces résultats suggèrent que l'induction du changement du mode d'épissage d'un gène constitue une nouvelle et fructueuse approche pour modifier l'expression du gène responsable de certaines maladies et prouve que le criblage à haut débit est un moyen parfaitement utilisable pour trouver des composés capables d'affecter ce mode. Toutefois, toute la difficulté de cette stratégie consiste à limiter les effets de ces molécules au gène d'intérêt et à éviter que ses effets ne s'étendent à d'autres gènes de l'organisme ; de plus ces molécules présentent une certaine toxicité.

Une modulation plus spécifique de l'épissage a été réalisée par l'usage d'oligoribonucléotides antisens destinés à bloquer le site d'épissage en 3' de l'exon 8 ; il en a résulté un niveau plus élevé d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits des mini-gènes transfectés, mais l'amplitude et l'efficacité des effets sont restées très faibles et l'utilisation de

ces nucléotides *in vivo* reste improbable (Lim et Hertel, 2001). Une autre stratégie fait appel à des oligonucléotides complémentaires de l'exon cible mais qui ne bloquent pas les réactions survenant aux sites d'épissage comme le font les RNA antisens conventionnels. Ces oligonucléotides incorporent une "queue" non complémentaire dont la séquence mime un *ESE* et augmente le taux d'inclusion de l'exon 7 dans les transcrits. Ils ont été utilisés *in vivo* et il a été prouvé que l'inclusion de l'exon 7 dans le mRNA du gène *SMN2* endogène est augmentée dans des fibroblastes de patients atteints de SMA. Le niveau atteint dans ces conditions est celui que l'on trouve dans les fibroblastes témoins et un nombre normal de *gems* est partiellement restauré (Skordis *et al.*, 2003).

1152-Introduction de la forme normale du gène *SMN*.

L'usage d'un vecteur adénoviral pour introduire le gène *SMN* dans des fibroblastes issus de patients atteints de SMA a permis de retrouver un nombre de *gems* équivalent, voire supérieur, à celui que l'on trouve dans les fibroblastes d'individus sains. De plus, la surexpression de *SMN* dans ces cellules a permis une relocalisation de la gémme 2 dans les *gems*. Cette étude est la première à démontrer qu'il est possible de transférer le gène *SMN* dans des cellules issues de malades pour en restituer une expression normale. Il s'agit là d'un résultat très prometteur qui permet d'envisager la mise au point de nouvelles thérapies de la SMA (Di Donato *et al.*, 2003).

1153-Administration de vecteurs de gènes exprimant des facteurs neurotrophes.

L'injection intramusculaire d'un vecteur adénoviral exprimant la cardiotrophine-1 [CT-1], un facteur neurotrophe de la famille IL-6 des cytokines, augmente la survie moyenne et retarde l'apparition du déficit moteur des souris mutantes utilisées pour ces travaux (Frugier *et al.*, 2000). La CT-1 prévient partiellement la perte des axones moteurs proximaux et la désorganisation du cytosquelette des terminaisons synaptiques motrices. Elle semble donc retarder la progression de la maladie (Lesbordes *et al.*, 2003).

12-Le développement de la jonction neuromusculaire : aspect moléculaire.

Dans le système nerveux, la communication intercellulaire est assurée par les synapses, points de contact entre les neurones et leurs cellules-cibles. Ces dernières sont le plus souvent des neurones, ou des fibres musculaires squelettiques. Dans ce dernier cas, la synapse prend le nom de plaque motrice ou jonction neuromusculaire [JNM]. Son rôle est de transmettre à la fibre musculaire l'information électrique engendrée par le neurone moteur sous forme d'une onde de dépolarisation. L'extrémité de l'axone ou bouton neural étant très petite par rapport à la fibre musculaire, le signal électrique est transformé en un signal chimique par l'intermédiaire de l'acétylcholine [ACh] qui en permet l'amplification.

La genèse des structures impliquées dans la JNM lors du développement embryonnaire est bien connue. De nombreuses thèses au laboratoire ont présenté cette question dans leur introduction. Nous nous intéresserons ici plus particulièrement à l'aspect moléculaire du phénomène, et notamment aux protéines impliquées dans la structure de la JNM ; certaines d'entre elles, en effet, ont été identifiées très récemment.

121-Molécules impliquées dans le développement de la jonction neuromusculaire.

La JNM se développe en plusieurs étapes dont chacune réclame pour sa mise en place un jeu défini de différents facteurs.

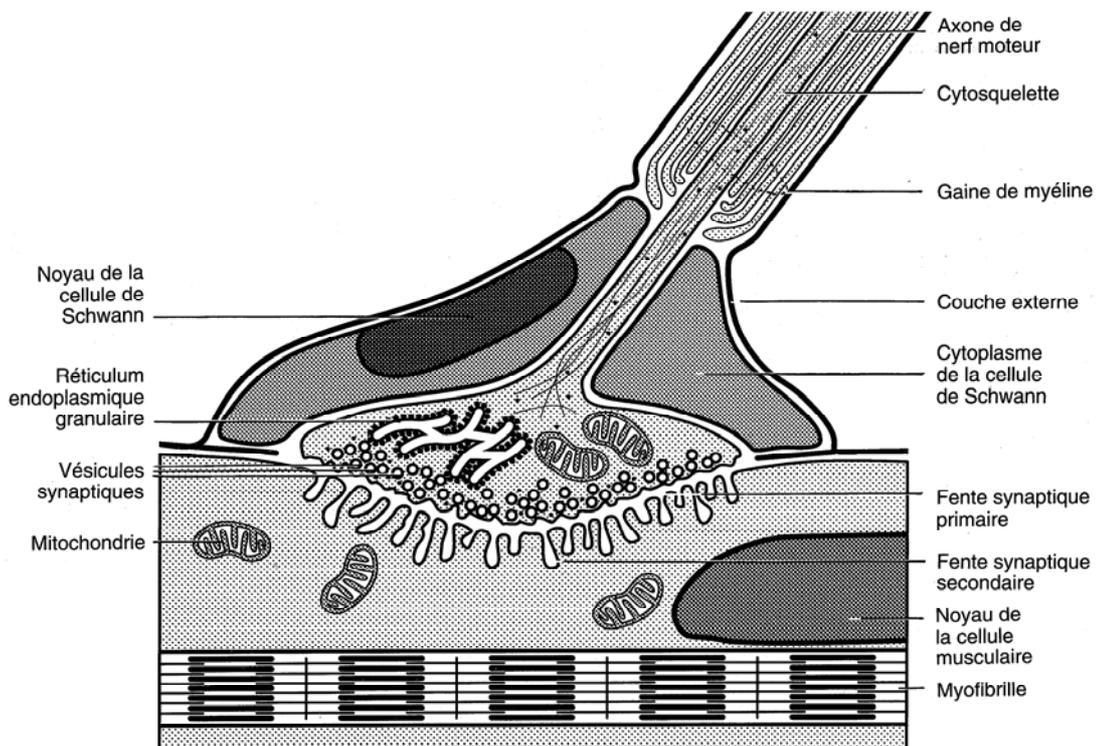
1211-Etablissement du contact entre le nerf et le muscle.

Les mécanismes fondamentaux de la synaptogenèse sont les mêmes pour tous les muscles. Le neurone moteur, la fibre musculaire et la cellule de Schwann qui rentrent dans la structure de la JNM acquièrent leur identité et migrent vers leur localisation finale bien avant la formation des synapses (Figure 1.11).

La synaptogenèse proprement dite est déclenchée dès que les extrémités des neurones en croissance établissent des contacts avec les fibres musculaires. Les axones se rendent vers leur structures-cibles grâce au déplacement actif du cône de croissance qui se meut au moyen de filopodes. Le cône est guidé vers sa destination finale par des marqueurs moléculaires qui lui indiquent la voie à suivre. La nature de ces signaux fait l'objet de spéculations

contradictoires. Une théorie suggère que ces molécules signaux sont sécrétées par le tissu cible. Parmi ces facteurs, il convient de citer le *nerve growth factor* [NGF], le *brain-derived growth factor* [BDGF] et l'*insulin-like growth factor* [IGF]. Une autre théorie, appelée théorie du guidage par contact, suppose que le cône de croissance est guidé en raison de sa capacité particulière d'adhésion à des substances spéciales et convenablement distribuées de la matrice extracellulaire, comme la fibronectine, la laminine ou la *neural cell adhesion molecule* [NCAM] (Levi-Montalcini, 1987 ; Landmesser *et al.*, 1988 ; Westerfield et Eisen, 1988).

FIGURE 1.11.
Schéma d'une plaque motrice. (D'après Burkitt *et al.*, 1993).



Une fois que l'axone est au contact du muscle, il passe d'un état dit de croissance à l'état d'axone synaptogénique. Des facteurs diffusibles sécrétés par les cellules de Schwann contribuent à ce changement (Peng *et al.*, 2003). La séquence des événements survenant pendant la genèse de la JNM serait la suivante : (a) avant l'innervation, le muscle produit une série de facteurs trophiques qui permet à l'axone moteur de croître à sa surface ; (b) le contact de l'axone avec les cellules de Schwann provoque le changement d'état évoqué plus haut et

induit la formation de la JNM ; (c) la cellule musculaire régule négativement sa production de stimuli trophiques qu'elle confine exclusivement à la JNM.

En plus de leurs effets trophiques qui assurent la survie neuronale, les neurotrophines augmentent la sécrétion des neurotransmetteurs à hauteur de la JNM (Poo, 2001). Ainsi, la confinement de la production des stimuli trophiques à la seule JNM permet de stabiliser le contact nerf-muscle, par la fourniture d'un support trophique aux motoneurones qui établissent correctement les JNM, et par la mise en place d'un mécanisme qui augmente l'efficacité de la transmission synaptique (Figure 1.13 a).

1212-L'agrine et sa cascade de réactions.

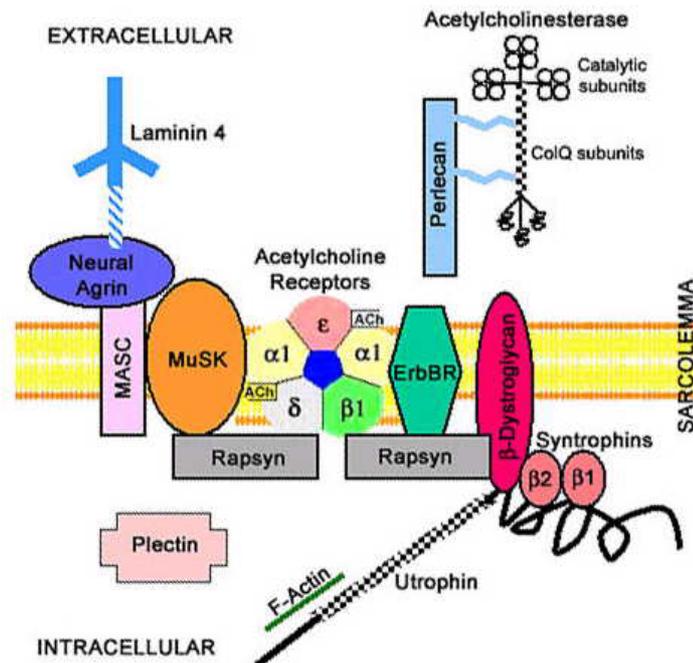
Les vésicules synaptiques de la terminaison nerveuse libèrent des molécules de neurotransmetteurs qui diffusent à travers la fente synaptique et activent leurs récepteurs localisés dans la membrane post-synaptique. Ces récepteurs doivent être agrégés à forte densité et très précisément en face des sites de libération de neurotransmetteurs de la terminaison nerveuse, afin d'assurer une transmission synaptique rapide et précise. La membrane musculaire post-synaptique héberge un appareil post-synaptique élaboré, constitué de nombreuses protéines et caractérisé par une très forte densité en récepteurs à l'acétylcholine [RACH] (Figure 1.12).

Le RACH est la mieux étudiée des protéines de la JNM, et son agrégation est un marqueur de la différenciation post-synaptique. Les RACH de la JNM adulte sont fortement concentrés dans la membrane post-synaptique ($> 10\,000$ molécules/ μm^2) alors qu'ils sont pratiquement absents de la membrane plasmique extra-synaptique (< 10 molécules/ μm^2). Une telle distribution résulte de 3 procédés majeurs de signalisation. Tout d'abord, quand le contact entre le motoneurone en croissance et le muscle en développement s'établit, les RACH pré-existants, distribués de façon diffuse, se redistribuent pour former des agrégats au site de contact nerf-muscle. Puis, en-dessous de la terminaison nerveuse, les noyaux musculaires deviennent des noyaux synaptiques spécialisés et commencent à transcrire les gènes codant les sous-unités de RACH à des taux plus élevés. Enfin, la transcription génique des sous-unités des RACH est stoppée dans les régions extra-synaptiques par une activité électrique qui se propage le long de la fibre musculaire grâce à une cascade de signalisation faisant intervenir le calcium, la protéine kinase C et des facteurs régulateurs de la transcription (Laufer et Changeux, 1989). Ces 3 facteurs agissant conjointement assurent le maintien des RACH à une

forte densité dans les agrégats de la membrane post-synaptique et leur absence dans le reste du sarcolemme (Figure 1.13 a, b).

FIGURE 1.12.

L'appareil post-synaptique de la synapse neuromusculaire. (D'après le site www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/musdist/dag2.htm.)



(1) L'agrine joue un rôle central dans la formation de la jonction neuromusculaire.

On a pu identifier les facteurs impliqués dans la différenciation synaptique grâce aux progrès réalisés dans les techniques de culture de tissus ; ils ont permis de reproduire *in vitro* certains aspects de la synaptogenèse. Les cocultures de motoneurons et de myotubes, notamment, ont permis d'isoler une molécule, l'agrine, à partir d'extraits membranaires de la raie *Torpedo californica*. L'activité biologique de l'agrine, et sa distribution tissulaire, a conduit à élaborer "l'hypothèse de l'agrine" qui veut que cette molécule soit le facteur dérivé du motoneurone qui induit la formation de l'appareil post-synaptique au cours du développement (McMahan, 1990). L'expérience a, depuis, largement confirmée cette hypothèse. Ainsi, l'agrine recombinante induit l'agrégation de RACH et la formation d'un appareil post-synaptique complet en culture de myotubes dénervés tout comme elle le fait

lorsqu'elle est exprimée en des sites extra-synaptiques *in vivo* (Sanes et Lichtman, 2001). Enfin, des souris dont le gène de l'agrine a été invalidé présentent des défauts dans la formation de la JNM (Burgess *et al.*, 1999).

L'agrine est un protéoglycane à héparane-sulfate synthétisé par le motoneurone ; elle est transportée le long de l'axone et libérée à la terminaison nerveuse où elle s'associe de façon stable à la lame basale de la fente synaptique. L'agrine existe sous 2 isoformes différentes. La forme synthétisée par les motoneurones, appelée classiquement l'agrine neurale ou z^+ agrine, promeut très activement l'agrégation des RACH, et elle suffit à induire la spécialisation post-synaptique dans le muscle, alors que les formes exprimées par les cellules musculaires et par les cellules de Schwann, dites non-neurales ou z^- agrines, ne peuvent promouvoir l'agrégation.

Par des interactions avec d'autres voies de signalisation, l'agrine est capable d'induire l'expression locale de certains gènes de protéines post-synaptiques comme les RACH, MuSK et ErbB (Moore *et al.*, 2001).

(2) Le récepteur de l'agrine.

La différence de fonction biologique entre la forme z^+ et les formes z^- de l'agrine s'explique par la liaison sélective de l'agrine neurale à son récepteur. La voie de signalisation activée par l'agrine implique des changements d'état de phosphorylation des composants de l'appareil post-synaptique. L'agrine induit par exemple la phosphorylation transitoire d'une tyrosine de la sous-unité β des RACH qui survient avant leur agrégation mais n'est pas nécessaire à cette dernière (Wallace *et al.*, 1991 ; Meyer et Wallace, 1998). L'attention des auteurs s'est donc concentrée sur la possible existence de récepteurs à activité tyrosine kinase dans la JNM. C'est ainsi qu'a été identifié le récepteur transmembranaire à tyrosine kinase, spécifique du muscle et appelé MuSK [pour *muscle-specific receptor tyrosine kinase*], effectivement activé par l'agrine (Valenzuela *et al.*, 1995). Des expériences faisant appel à des souris dont le gène *MuSK* est invalidé, confirment que ce récepteur est nécessaire mais non suffisant pour activer la voie de signalisation induite par l'agrine (DeChiara *et al.*, 1996 ; Sander *et al.*, 2001). L'agrine active MuSK dans les myotubes, mais non en cellules hétérologues transfectées pour le gène *MuSK*. Dans le muscle, le récepteur MuSK est complexé à une autre molécule qui y est exprimée sélectivement et qui est essentielle à la liaison de l'agrine (Glass *et al.*, 1996). Ce co-récepteur appelé MASC [pour *muscle accessory*

specific component] fait partie d'un complexe qui est capable à la fois de lier l'agrine et d'y répondre.

L' α -dystroglycane, qui est exprimé dans les fibres musculaires en association avec le β -dystroglycane, se lie effectivement à l'agrine. La premier de cette glycoprotéine pourrait donc être un bon candidat au rôle du MASC. Cependant, (a) les agrine tronquées du site de liaison à l' α -dystroglycane, sont encore capables d'induire l'agrégation des RACH et l'activation de MuSK (Gesemann *et al.*, 1996), et (b) l'activation de MuSK induite par l'agrine est normale dans des myotubes traités par des anti-sens et qui expriment des taux faibles d' α -dystroglycane (Jacobson *et al.*, 1998). Ces observations suggèrent donc que l' α -dystroglycane n'est pas le co-récepteur MASC de MuSK. Ce corécepteur n'est pas encore identifié.

Une fois stimulé par l'agrine, MuSK subit une auto-phosphorylation sur des résidus tyrosines intra-cytoplasmiques qui constituent des sites de liaison pour les molécules impliquées dans la transduction du signal. L'inactivation de l'activité kinase de MuSK par des mutations dans le site de liaison de l'ATP abolit l'activité d'agrégation des RACHs de MuSK, ce qui illustre la nécessité de l'activité kinase de MuSK dans la signalisation de l'agrine (Zhou *et al.*, 1999).

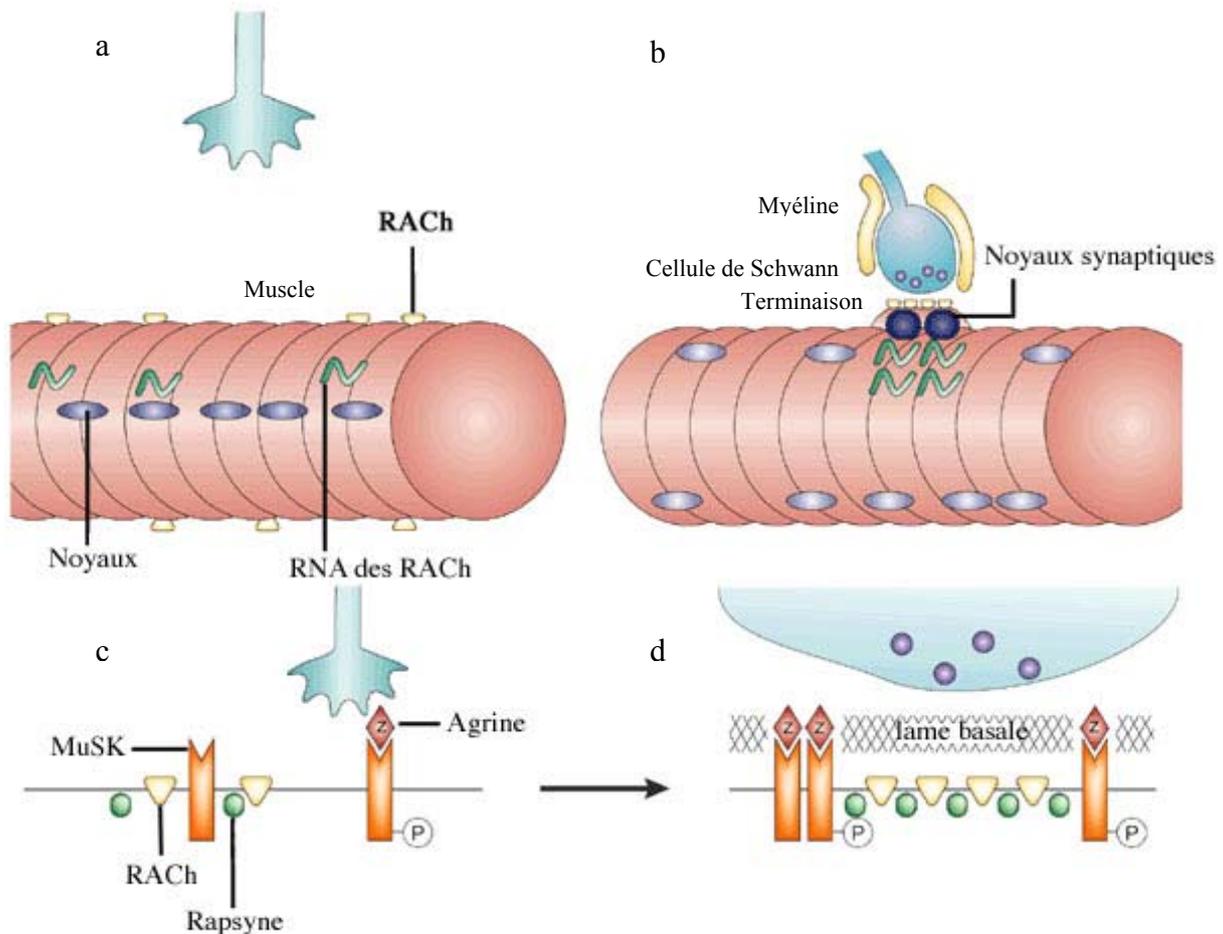
(3) La rapsyne.

Une autre protéine, la rapsyne, est nécessaire pour que la cellule musculaire réagisse à l'agrine (Gautam *et al.*, 1995). Elle est indispensable non seulement à l'agrégation des RACH mais encore à la différenciation post-synaptique dans nombre de ses aspects (Gautam *et al.*, 1999). La rapsyne et MuSK s'agrègent quand leurs gènes respectifs sont transfectés en cellules hétérologues (Apel *et al.*, 1997). Dans les myotubes issus de souris rapsyne^{-/-}, MuSK est activé par l'agrine ; il est agrégé en-dessous de la terminaison nerveuse alors que les RACH et les autres composants post-synaptiques ne le sont pas. La rapsyne agit donc en aval de MuSK. *In vivo*, les RACH extra-synaptiques non agrégés sont associés à la rapsyne. L'agrine induit une augmentation des interactions de la rapsyne avec les RACH de surface ; il en résulte une activation de la liaison des RACH au cytosquelette et l'agrégation progressive des RACH dans la région post-synaptique. Ces phénomènes dépendent d'un mécanisme non-sécrétoire. Ils correspondent vraisemblablement à un recrutement de la rapsyne à partir d'une réserve libre, non associé aux RACH (Moransard *et al.*, 2003). De tels résultats modifient la vision traditionnelle qui voulait que la rapsyne forme d'abord des auto-agrégats puis recrute

les RACH dans ces structures. En fait, la rapsyne forme tout de suite des agrégats avec les

FIGURE 1.13.

Agrégation des RACHs lors de la synaptogénèse. (D'après Sanes et Lichtman, 2001.)



[a] L'axone moteur s'approche d'un myotube nouvellement formé. Dans la région de contact, l'axone se différencie en terminaison nerveuse motrice spécialisée dans la libération du neurotransmetteurs. La cellule de Schwann recouvre la terminaison nerveuse et le muscle forme un appareil post-synaptique complexe. [b] Les RACH sont d'abord exprimés, faiblement, le long de la surface du myotube. Dans le muscle adulte, au contraire, ils sont très concentrés dans la membrane post-synaptique et presque absents des zones extra-synaptiques. Cette agrégation implique à la fois une redistribution des RACH, et une synthèse synaptique de ces derniers. Cette synthèse locale résulte d'une activation de la transcription des sous-unités de RACH par les noyaux sous-synaptiques et d'une répression des noyaux extra-synaptiques. [c] L'agrine est libérée par la terminaison nerveuse et se stabilise par liaison à la lame basale de la fente synaptique. Elle active MuSK pour déclencher l'agrégation des RACH par l'intermédiaire de la rapsyne qui est une protéine cytoplasmique.

RACH. Il semble que la phosphorylation de la sous-unité β des RACH par des kinases de la famille Src, activées par l'agrine, régule le lien de ce récepteur au cytosquelette membranaire post-synaptique et contribue à la stabilisation de ses agrégats (Borges et Ferns, 2001). La

rapsyne semble également être impliquée dans le transport des RACH à la membrane plasmique ; en effet, elle est colocalisée avec les RACH dans les vésicules de transport dérivées de l'appareil de Golgi (Marchand *et al.*, 2000).

(4) La neuréguline.

Outre une redistribution des protéines pré-existantes par l'agrine, la forte densité de la JNM en protéines est assurée par une régulation positive de la transcription des gènes de ces dernières dans les noyaux sous-synaptiques. Ce phénomène intéresse notamment les RACH, l'acétylcholinestérase, MuSK, la rapsyne, etc. L'activation de la transcription est due en partie à la neuréguline-1, protéine exprimée par le motoneurone et sécrétée dans la fente synaptique (Fischbach et Rosen, 1997). Elle appartient à la famille des ARIA [pour *ACh-R inducing activity*] car elle a la capacité de stimuler la transcription des gènes des sous-unités du RACH dans des myotubes. Les récepteurs de la neuréguline sont des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, appelés Erb B ; ils sont concentrés dans la membrane post-synaptique. La signalisation conduisant à l'expression des gènes sous l'effet de la neuréguline-1 fait intervenir les MAP kinases, ainsi que toute une cascade de réactions (Si *et al.*, 1998 ; Schaeffer *et al.*, 2001) dans le détail desquelles nous n'entrerons pas.

(5) Autres molécules intermédiaires intervenant dans l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine induite par l'agrine.

Si l'on prend en considération la complexité de l'appareil post-synaptique et sa plasticité lors du développement embryonnaire et post-natal, on peut aisément concevoir que la synaptogenèse soit régulée par d'autres molécules intermédiaires que celles que nous venons d'évoquer. Ainsi, il a été montré que le calcium extracellulaire est indispensable à l'activation de MuSK alors que le calcium intracellulaire est nécessaire à la phosphorylation de la sous-unité β des RACH et à l'agrégation de ces récepteurs (Borges *et al.*, 2002).

L'agrégation des RACH dans les myotubes dépend également des petites GTPases Rac et Cdc42 qui sont activées par l'agrine et sont connues pour réguler la polymérisation de l'actine dans de nombreux types cellulaires ; dans les cellules musculaires, elles sont nécessaires à l'agrégation des RACH probablement parce qu'elles interviennent dans la réorganisation des filaments d'actine (Weston *et al.*, 2000).

Un autre intermédiaire important de la voie de signalisation est le monoxyde d'azote [NO] (Jones et Werle, 2000). Il semble que la NO synthétase s'agrège avec les RACH dans des myotubes traités par l'agrine (Luck *et al.*, 2000).

1213-Voie d'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine non dépendante de l'agrine.

Les isoformes 1 et 2/4 des laminines sont capables d'induire une agrégation des RACH en activant une voie différente de la voie de l'agrine. Les agrégats formés sont plus grands et présentent une densité plus importante en RACH. Les voies induites par l'agrine et par les laminines ont toutes les 2 besoin des dystroglycannes pour assurer aux agrégats une morphologie et une stabilité normales (Montanaro *et al.*, 1998). La laminine redistribue les dystroglycannes et les syntrophines en un réseau grossier ; ce phénomène induit la formation d'agrégats de RACH, de rapsyne, d' α -dystrobrevine, d'utrophine, et en quantité moindre, de MuSK. Cette voie dépend absolument de la rapsyne, et elle dépend aussi de Src. Des myotubes prétraités par de la laminine exigent ensuite moins d'agrine pour l'agrégation de leurs RACH ; la laminine rend donc les myotubes plus sensibles à l'agrine en activant des tyrosines kinases (Burkin *et al.*, 2000). Il semble que la voie de la laminine active la voie de l'agrine mais elle n'est pas efficace à elle toute seule (Marangi *et al.*, 2002).

1214-Agrégation des récepteurs de l'acétylcholine en absence de motoneurones.

Au cours des dernières décennies, on a attribué à l'agrine un rôle clé dans l'agrégation des RACH à la surface du muscle. Cependant, ce point de vue mérite aujourd'hui d'être reconsidéré au regard des résultats d'expériences qui montrent que l'agrégation des RACH peut avoir lieu dans la portion centrale des myofibres *in vivo* en l'absence complète de motoneurones, et par conséquent d'agrine neurale (Yang *et al.*, 2001).

Dans des myotubes cultivés en conditions aneurales, des agrégats de RACH se forment spontanément et plusieurs protéines post-synaptiques interagissent avec le RACH indépendamment de l'agrine neurale (Fuhrer *et al.*, 1999). Les RACH interagissent avec la rapsyne et s'agrègent dans une zone centrale du muscle. Cette zone centrale est la plus mature et possède donc le plus haut niveau de MuSK et de RACH ; selon toute probabilité, c'est elle qui est la plus apte à former des agrégats de RACH. Ainsi, les myotubes ont la capacité intrinsèque de préassembler les complexes protéiques, comme par exemple MuSK, en l'absence de motoneurones. Le contact nerveux ne fait que stabiliser les agrégats présents et

en crée de nouveaux. MuSK est indispensable à la transcription des gènes synaptiques, indépendamment du nerf, et la rapsyne est nécessaire à l'agrégation des RACH en l'absence de motoneurones. Les RACH et la rapsyne forment un précomplexe avec d'autres protéines et il est vraisemblable que ce préassemblage est l'étape préliminaire et fondamentale du mécanisme menant à la formation spontanée d'agrégats de protéines dans les cellules musculaires.

Cependant, l'importance du nerf et particulièrement de l'agrine neurale n'est pas discutée. Non seulement cette protéine redistribue-t-elle les RACH pré-existants, mais encore, à travers ses interactions avec la neuréguline-1, permet-elle aussi la synthèse de nouvelles molécules de RACH.

122-La maturation post-synaptique.

1221-Stabilisation des agrégats de récepteurs de l'actéylcholine..

Les myofibres se contractent et leur membrane plasmique doit être stabilisée pour résister aux contraintes mécaniques de la contraction. La stabilisation de la membrane est assurée par le complexe glycoprotéique dystrophine/utrophine ou *dystrophin/utrophin glycoprotein complex* [D/UGC] qui relie le cytosquelette du muscle à la matrice extracellulaire. Ce complexe est constitué de la dystrophine, de l'utrophine, des dystroglycannes, des sarcoglycannes, des syntrophines et des dystrobrevines (Henry et Campbell, 1999).

L'utrophine et la dystrophine, 2 protéines homologues, sont les composants du complexe qui ont la taille la plus grande. Les JNM des souris déficientes à la fois en dystrophine et utrophine sont tout à fait normales ; elles expriment simplement moins de RACH et leur JNM présentent moins de plis post-synaptiques. Ainsi, le D/UGC en soi ne semble pas indispensable à la formation des JNM et des agrégats de RACH, mais il paraît être très important pour leur maturation et en particulier pour la formation des plis post-synaptiques.

Deux observations montrent l'importance des dystroglycannes dans l'assemblage des structures fondamentales de la membrane synaptique. (a) Les laminines sont des constituants majeurs de la lame basale et l' α -dystroglycane est un récepteur de la laminine (b) La laminine et l' α -dystroglycane peuvent s'assembler à la surface de la cellule et se lier à d'autres molécules de la matrice comme le collagène, et le perlécane. Le dystroglycane est

donc exigé pour maintenir l'intégrité du D/UGC ; il permet d'ancrer les éléments du complexe à la membrane plasmique. Il ne joue pas le rôle de co-récepteur de MuSK, mais il est nécessaire à l'assemblage des petits agrégats de RACH en agrégats de taille normale ainsi qu'à la stabilisation des agrégats préformés, d'une part, et de la JNM, de l'autre.

La dystrobrevine joue un rôle similaire à celui des dystroglycannes. Elle est indispensable au maintien des agrégats de RACH à la fois *in vitro* et *in vivo* et elle intervient dans la formation des plis post-synaptiques et dans la ségrégation des RACH entre les crêtes et les fonds de ces plis.

Plusieurs tyrosines kinases, dont Src et Fyn (Smith *et al.*, 2001) et TrkB (Gonzales *et al.*, 1999), sont nécessaires à la stabilisation des agrégats de RACHs, mais leur mécanisme d'action dans ce phénomène est inconnu. Une possibilité intéressante serait qu'elles relient les RACH au D/UGC par l'intermédiaire par exemple de la dystrobrevine qui est un substrat des tyrosines kinases et est fortement phosphorylée dans l'organe électrique de la torpille (Wagner *et al.*, 1993).

1222-Maturation de la jonction neuromusculaire après la naissance.

La genèse de la plaque motrice ne se limite pas à la formation initiale de la JNM pendant l'embryogenèse ; elle implique aussi une maturation post-synaptique, en particulier dans les premières semaines qui suivent la naissance. A la naissance, les fibres musculaires sont innervées par plusieurs axones dont les terminaisons nerveuses peuvent même être entremêlées au-dessus de l'appareil post-synaptique. Les agrégats de RACH sont distribués de façon homogène dans la membrane post-synaptique qui par ailleurs est totalement dépourvue de plis. Différents événements post-nataux vont alors survenir et conduire à une élimination synaptique au cours de laquelle toutes les terminaisons nerveuses sauf une disparaissent du contact synaptique (Lichtman et Colman, 2000). On estime que 40 % à 70 % des motoneurones embryonnaires subissent une mort cellulaire programmée, immédiatement après que leur axone a contacté une cellule musculaire. Plusieurs éléments expérimentaux suggèrent que l'élimination des synapses est fondée sur la compétition dans laquelle rentrent les terminaisons nerveuses individuelles qui innervent la même structure post-synaptique. Le nombre de motoneurones échappant à la mort cellulaire dépend des cellules musculaires cibles et des cellules de Schwann qui les avoisinent (Phelan et Hollyday, 1991 ; Grieshammer *et al.*, 1998). Les unes et les autres contiennent une multitude de facteurs trophiques qui

favorisent la survie des motoneurones (Henderson *et al.*, 1998 ; Sendtner *et al.*, 2000). L'accès des motoneurones à ces facteurs semble être régulé par l'activité du muscle squelettique laquelle fait changer le nombre de contacts synaptiques. Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces phénomènes sont inconnus, mais il apparaît évident que l'activité électrique y joue un rôle décisif (Nguyen et Lichtman, 1996). Enfin, chaque terminaison nerveuse, sortie vainqueur de la compétition, est recouverte par une cellule de Schwann. A la fin de cette phase, chaque fibre musculaire n'est donc plus innervée que par un seul motoneurone.

Au même moment se forment des plis post-synaptiques ; il en résulte une ségrégation des protéines incluses dans cette portion de membrane soit sur les crêtes des plis soit en leurs fonds. Il en résulte des changements spectaculaires de la morphologie de la membrane post-synaptique. Ainsi, par exemple, les canaux sodiques se situent au fond des plis alors que les RACH sont au sommet des crêtes où ils sont étroitement en contact avec les terminaisons nerveuses (Marques *et al.*, 2000).

Un autre événement de la maturation post-synaptique survient dans les RACH eux-mêmes dont la composition change. La sous-unité embryonnaire γ est remplacée par la sous-unité adulte ϵ . Il en résulte une modification de la perméabilité du canal aux ions calcium. Les RACH doivent contenir la sous-unité ϵ pour que soit maintenu l'appareil post-synaptique de la JNM y compris les plis post-jonctionnels.

123-Jonction neuromusculaire et amyotrophie spinale progressive.

L'anatomopathologie indique que les fœtus présentant une délétion de l'exon 7 du gène *SMN* perdent leurs motoneurones par apoptose à la même période de l'embryogenèse que les fœtus témoins. Cette perte survient entre la huitième et la onzième semaine de gestation, au moment où les contacts neuromusculaires fonctionnels s'établissent. De plus, le nombre de motoneurones apoptotiques ne semble pas être plus élevé chez les malades. En revanche, le processus de mort programmée des motoneurones se prolonge. Alors que plus aucune apoptose des motoneurones n'est observée après la treizième semaine de gestation chez les fœtus sains, des motoneurones morphologiquement apoptotiques sont encore visibles à la seizième et même à la vingtième semaine de gestation dans la moelle épinière de fœtus atteints de SMA I (Fidzianska et Rafalowska, 2002). La mort motoneuronale semble donc précéder l'apoptose des cellules musculaires chez les patients souffrant de SMA. Ces résultats

confirment les analyses quantitatives de sections de corne antérieure de moelle épinière. Chez ces patients, en effet, on observe une diminution de 15 à 35 % des motoneurones par rapport aux témoins. De plus, il semble que la perte motoneuronale anormale s'accompagne d'un dysfonctionnement des motoneurones survivants (Soler-Botija *et al.*, 2002).

Il a été montré au laboratoire que les motoneurones de Rat se comportent différemment selon qu'ils sont cocultivés sur des cellules musculaires saines ou sur des cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA. Dans les cocultures réalisées avec des cellules musculaires de type SMA I, les motoneurones dégénèrent par apoptose 24 h après avoir été déposé sur la couche de cellules musculaires ; les neurones sensitifs cultivés dans les mêmes conditions ne dégénèrent pas (Guettier-Sigrist *et al.*, 2002).

Les muscles de patients atteints de SMA possèdent beaucoup moins d'unités motrices que les muscles de sujets sains, mais les unités motrices sont 3 fois plus grandes chez les malades. Cependant cette augmentation de taille des unités motrices ne peut pas compenser la réduction de presque 90 % des motoneurones (Galea *et al.*, 2001). Pendant la phase fœtale du développement, les défauts génétiques responsables de la SMA ne provoqueraient pas seulement l'apoptose d'un nombre anormal de motoneurones, mais ils laisseraient affaiblis ceux qui survivent, de sorte que ceux-ci seraient incapables d'émettre des neurites et que leurs axones ne pourraient atteindre les fibres musculaires non innervées.

La structure et l'ultrastructure des muscles de patients atteints de SMA sont celles de muscles immatures. La dégénérescence des motoneurones pourrait donc provenir d'un arrêt de maturation du muscle (Hausmanowa-Petrusewicz, 1989). Les cellules myogéniques de malades semblent pauvres en certains facteurs dont l'expression est régulée au cours du développement et qui sont essentiels à l'établissement des contacts neuromusculaires (Vrbova et Lowrie 1989). Par ailleurs, la vitesse de conduction des nerfs de patients atteints de SMA I et II est plus lente que celle des nerfs de sujets normaux. L'ensemble de ces faits conforte l'hypothèse selon laquelle, dans les formes les plus graves de la maladie, la maturation des nerfs est retardée (Krajewska et Hausmanowa-Petrusewicz, 2002).

Il a été montré au laboratoire que lorsque l'on innerve des cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA I et II par des explants de moelle épinière d'embryons de Rat, la coculture dégénère au bout de 1 à 3 semaines alors qu'elle se maintient pendant au moins 1 an si les cellules musculaires sont saines (Braun *et al.*, 1995). Si le développement du muscle est arrêté chez les nouveau-nés, de nombreux contacts neuromusculaires tout d'abord instaurés, sont perdus, ce qui prouve que les fibres musculaires immatures ne peuvent pas maintenir un contact permanent avec un motoneurone plus mature (Greensmith et Vrbova,

1991 ; 1992). Ces observations viennent corroborer les résultats des analyses immunocytochimiques de fibres musculaires provenant de patients atteints de SMA, analyses qui indiquent que ces fibres ont été transitoirement innervées mais qu'elles n'ont pas pu maintenir cette innervation (Dubowitz, 1978).

Plus récemment, une étude a montré que, pendant la différenciation neuronale, la protéine SMN s'accumule dans une structure localisée à proximité du cône de croissance. Or la protéine SMN interagit avec les profilines II, protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine. Cette interaction pourrait convoier le transport de l'actine et de SMN dans le cône de croissance du neurone. Le défaut de SMN pourrait avoir des répercussions et sur la maturation du motoneurone et sur la maturation du muscle. La mort des cellules résulterait donc d'un déficit en protéine SMN dans les cônes de croissance et d'une maturation défectueuse de la JNM. En période post-natale, le muscle présente un pic d'expression de la protéine SMN cytoplasmique, 6 jours avant la maturation de la JNM. En conclusion, les auteurs suggèrent que les défauts d'expression de SMN dans les neurones, dans les cellules gliales et dans les cellules musculaires participeraient chacun à la pathogénie de la SMA (Fan et Simard, 2002).

13-Vecteurs non-viraux ou synthétiques de transfert de gène.

131-La thérapie génique.

En 1986, lors de la première édition du Téléthon, la thérapie génique sort de l'ancre mystérieux du laboratoire et s'expose au grand public. La thérapie génique se propose de corriger directement dans la cellule une mutation génique responsable de maladies aujourd'hui incurables. Depuis l'autorisation du premier essai clinique humain en 1989, la déception et le scepticisme suscités par les résultats obtenus ont été à la mesure de l'enthousiasme du départ. En effet, la thérapie génique s'est montrée beaucoup plus compliquée à manier qu'il n'était prévu à ses tout débuts (Fischer, 2000). Cependant, en ce domaine, il faut se garder aussi bien d'un optimisme béat que du découragement.

Les progrès très rapides réalisés dans le domaine des biotechnologies ont permis de démontrer que de plus en plus de maladies connues pouvaient être d'origine génétique. Si l'on parvient à surmonter les obstacles semés sur la route la thérapie génique, on peut envisager de traiter nombre de ces maladies génétiques, ce qui était impensable il y a quelques années.

Pour introduire de l'acide nucléique dans les cellules, la première idée qui vint à l'esprit, et la plus logique, fut d'utiliser simplement du DNA nu sous forme de plasmide. Cette technique fut essayée sur différents tissus : le foie (Hickman *et al.*, 1994), le muscle cardiaque (Ardehali *et al.*, 1995), la glande thyroïde (Sikes *et al.*, 1994), le cerveau (Schwartz *et al.*, 1996) et la vessie, les reins et les testicules (Yoo *et al.*, 1999). Les résultats ne furent pas très prometteurs sauf dans le cas du tissu musculaire où l'expression des gènes persista pendant plusieurs mois après une injection intramusculaire de vecteur, bien que l'intégration chromosomique ne se produisît jamais (Acsadi *et al.*, 1991). Cette persistance de l'expression génique dans le tissu musculaire fut attribuée au lentturnover des noyaux des myofibres. Cependant, la capture des plasmides de DNA par les cellules musculaires fut relativement inefficace ; on remarqua qu'elle était limitée aux cellules adjacentes au site d'injection (Wolff *et al.*, 1991). Il fut donc évident qu'une autre stratégie s'imposait pour améliorer l'expression du DNA.

En raison de leur caractère hydrophobe, les membranes cellulaires ne sont pas perméables aux structures polyanioniques que sont les acides nucléiques. Il faut un vecteur pour introduire l'information génétique dans les cellules cibles. Les virus furent les premières entités auxquelles on pensa pour jouer ce rôle. En effet, ils ont acquis au cours de l'évolution la capacité d'atteindre, de pénétrer et d'exprimer de façon efficace leur matériel génétique dans les cellules. De nombreuses études s'attachèrent à produire différentes sortes de virus recombinants (Mulligan, 1991 ; Jolly, 1994). Parmi eux, les adénovirus et les rétrovirus se montrèrent les meilleurs candidats. L'utilisation de systèmes viraux permit des niveaux d'expression remarquables des gènes transférés, mais les virus montrèrent rapidement leurs limites ; ils présentent en effet de nombreux désavantages : toxicité, propriété inflammatoire et immunogène (Crystal, 1995). De plus, la production de virus vecteurs à grande échelle était très contraignante et ces vecteurs étaient incapables de transférer des gènes thérapeutiques de taille supérieure à 30 kb. C'est pourquoi les auteurs se sont attachés à développer des vecteurs non-viraux — appelés vecteurs synthétiques ou artificiels — moins toxiques, efficaces et de composition moléculaire parfaitement connue. Ces vecteurs sont faciles à produire en grande quantité et ils peuvent transporter des gènes thérapeutiques sans aucune limitation de taille. Pour délivrer le gène avec efficacité, le DNA doit être protégé du milieu extracellulaire (et surtout des protéines sériques), il doit traverser la membrane plasmique, il doit être ingéré et ne pas être dégradé par les nucléases lysosomiques. Enfin, le DNA doit sortir de l'endosome, se séparer du vecteur et, bien entendu, atteindre le noyau pour s'exprimer. Tous ces

événements sont autant d'étapes limitantes pour l'expression correcte du transgène, et le vecteur doit en assurer la survenue convenable (Ledley, 1995).

Dans la suite de ce CHAPITRE, nous décrirons les vecteurs non-viraux les plus couramment utilisés ainsi que les moyens récemment mis en œuvre pour améliorer leur efficacité.

132-Les vecteurs non-viraux de transfert de gène.

L'utilisation de vecteurs non viraux impose de trouver un équilibre entre faible cytotoxicité et forte efficacité du vecteur. Le DNA doit atteindre le noyau et être exprimé de façon efficace sans provoquer de trop importants dommages dans la cellule.

Les vecteurs non-viraux ou synthétiques peuvent être schématiquement classés en 2 familles : (a) les lipides cationiques, et (b) les polymères cationiques ou polycations. Le mélange des vecteurs cationiques avec le DNA anionique conduit à la formation d'agrégats hétérogènes par un processus d'auto-assemblage faisant appel à des interactions électrostatiques (Mount *et al.*, 2003). Ces complexes pénètrent dans la cellule par un mécanisme d'endocytose spontanée, dépourvu de toute cytotoxicité (Xu et Szoka, 1996). La libération du DNA dans le noyau est une étape cruciale dans l'expression ultime du produit du gène thérapeutique, mais ce mécanisme est très peu connu. Il est cependant en cours d'élucidation (Figure 1.14) (Salman *et al.*, 2001).

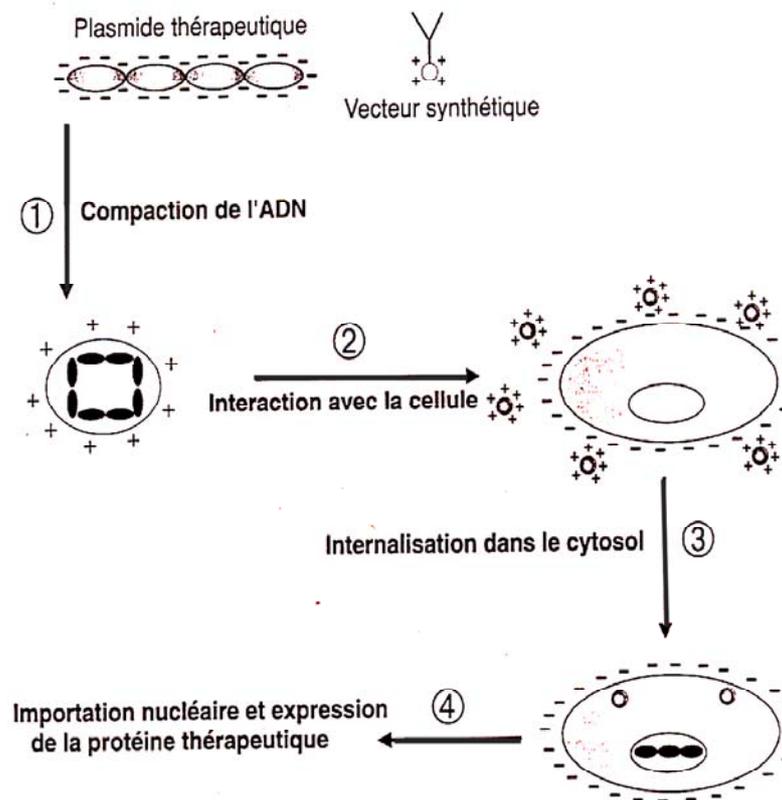
1321-Les lipides cationiques.

Le terme de liposome quelquefois utilisé dans le vocabulaire de la transfection par des lipides cationiques est impropre. En effet les agrégats de lipides cationiques et de DNA ne contiennent pas de phase aqueuse interne. Pour éviter la dégradation lysosomique des liposomes classiques, il a été développé des compositions liposomiques incapables de fusionner à pH neutre mais capables de le faire en milieu acide. Une fois entrés dans la cellules, les complexes formés, appelés lipoplexes, destabilisent le compartiment endolysosomique — qui est acide — et libèrent le DNA dans le cytoplasme.

Les lipides cationiques sont composés de 3 parties : (a) une tête hydrophile chargée positivement et qui interagit avec le DNA ; (b) un bras espaceur dont la composition détermine la biodégradabilité de l'ensemble, et (c) une queue hydrophobe, chargée

négativement et formée soit de 2 chaînes aliphatiques généralement insaturées et longues d'au moins 12 atomes de carbone, soit d'un dérivé du cholestérol.

FIGURE 1.14.
Principe des vecteurs synthétiques. (D'après Kreiss et Scherman, 1999).

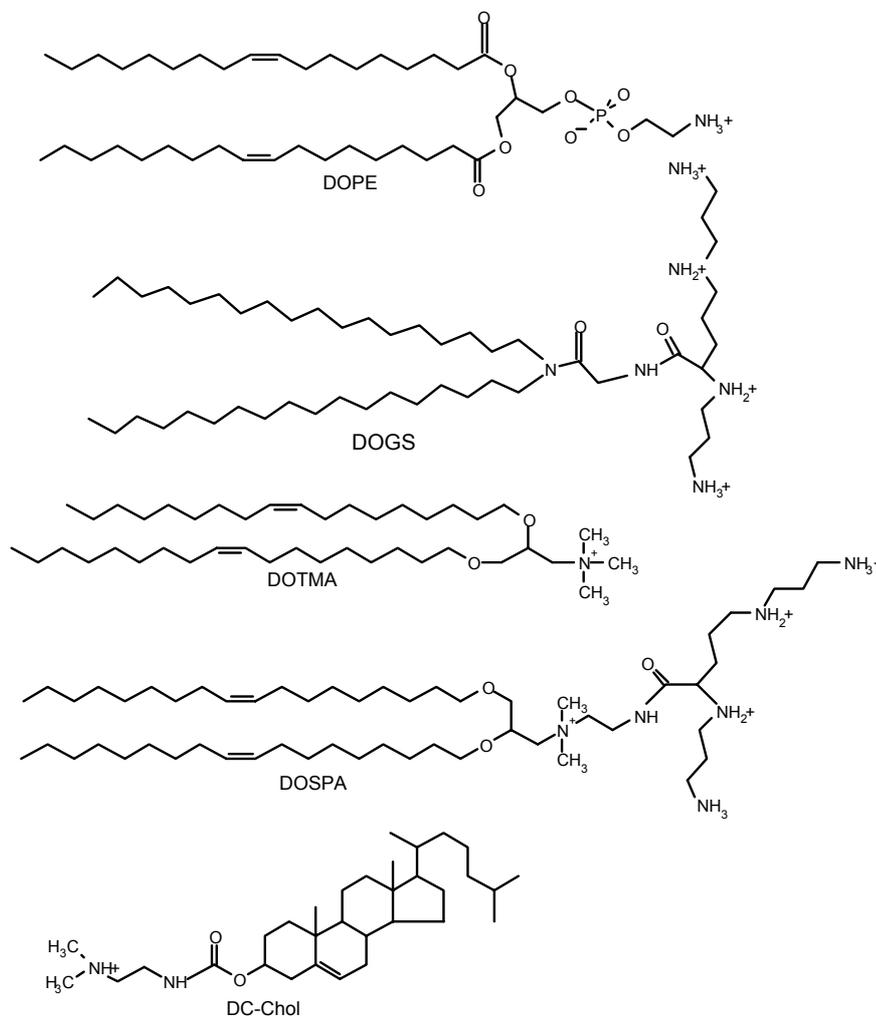


Les liposomes possèdent de nombreuses qualités qui en font des instruments de choix au yeux des géno-thérapeutes (on voudra bien nous pardonner ce néologisme). (a) Premièrement, le DNA d'intérêt n'est pas délivré par un virus, ce qui élimine tout risque de propagation. (b) Deuxièmement, ce type de vecteur n'induit aucune réponse immunologique dont on pourrait en craindre les conséquences biologiques. (c) Et troisièmement, une utilisation répétée de la transfection convoyée par les liposomes est tout à fait concevable puisque le patient ne risque aucunement d'être sensibilisé.

Lorsque l'on utilise des lipides cationiques, il convient de choisir un rapport lipide/DNA et une concentration totale en lipides optimaux car ces facteurs sont critiques pour la réussite d'une transfection. (Felgner et Ringold, 1989 ; Niculescu-Duvaz *et al.*, 2003). L'efficacité de transfection est augmentée par l'addition de lipides neutres promoteurs de la

fusion, comme le dioléylphosphatidyléthanolamine [DOPE] dont on pense qu'il aide à la

FIGURE 1.15.
Structure des lipides cationiques les plus couramment utilisés.



DOPE : dioléylphosphatidyléthanolamine ; DOGS : dioctadécylamidoglycylspermine ; DOTMA : chlorhydrate de N-(2,3-dioléyloxypropyl)-N,N,N-triméthylammonium ; DOSPA : 2,3-dioléyloxy-N-2-(sperminecarboxyamido)ethyl-N,N-diméthyl-1-propanammonium ; DC-Chol : 3 β [N-(N',N'-diméthylaminoethane) carbomoyl] cholestérol.

désorganisation de l'endosome. La cytotoxicité des complexes liposomiques varie avec la concentration en lipides, le temps d'exposition et le type cellulaire. Les connaissances acquises lors de l'étude et de l'utilisation des formulations les plus anciennes ont été mises à profit pour synthétiser de nouveaux composés (dérivés aliphatiques ou dérivés de cholestérol) qui présentent une meilleure efficacité de transfection.

(1) Dérivés aliphatiques.

Les lipides dont la région de tête présente une section transversale de petite surface et une section transversale de la chaîne aliphatique de plus grande surface affectent la forme d'un cône ; cette disposition facilite la libération intracellulaire des acides nucléiques (Hafez *et al.*, 2001). C'est pourquoi il a été synthétisé des dimères de chlorhydrate de N,N-dioléyl-N,N-diméthylammonium [DODAC] — dont les monomères sont unis l'un à l'autre par une chaîne hydrocarbonée de 3 ou 6 atomes de carbone — et qui sont appelés respectivement TODMAC 3 et TODMAC 6 (Gaucheron *et al.*, 2002). Ces molécules possèdent 2 groupes ammonium quaternaires et 4 chaînes oléyls — une telle disposition augmente le nombre de chaînes associées au groupe de tête. Elles ont été éprouvées *in vitro* sur des cellules BHK-21. A un rapport de charges positives aux charges négatives voisin de 2,5, les complexes formés avec le TODMAC 6 permettent une expression de la luciférase 5 à 20 fois supérieure à celle qu'autorisent le DODAC ou le TODMAC 3. Il semble donc que la capacité des vecteurs synthétiques à former des structures qui ne soient pas des bicouches soit corrélative au pouvoir de transfection. Toute synthèse de nouvelles molécules doit prendre en compte cette conclusion. Il convient aussi de noter que bien d'autres facteurs peuvent affecter le pouvoir de transfection et, parmi eux, notamment, la façon de construire les complexes, l'existence de barrières stériques, la capacité des lipides cationiques à se dissocier du DNA plasmidique après que le complexe a gagné l'intérieur de la cellule, et la composition lipidique de la membrane de l'endosome.

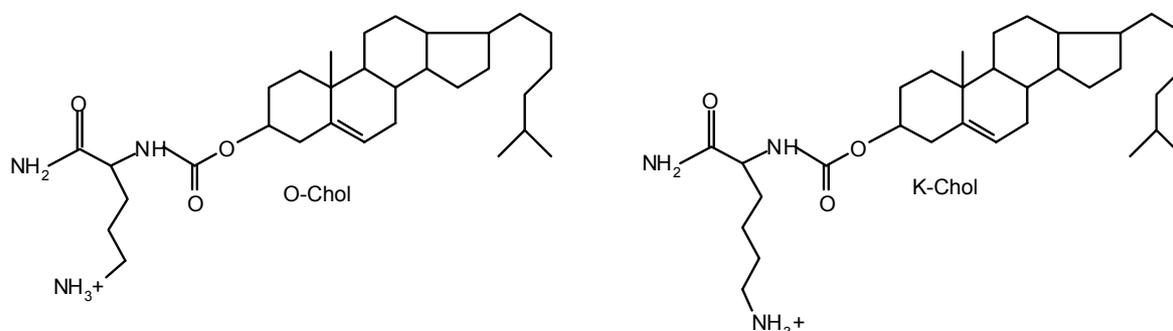
(2) Dérivés du cholestérol.

Les composés contenant un groupe guanidium dérivent du cholestérol ; ils se sont révélés utiles et pratiques lorsqu'ils ont été éprouvés pour leur pouvoir de transférer différentes lignées cellulaires. Ils établissent une paire de liaisons hydrogène avec les résidus phosphate des polynucléotides ce qui les rend solubles dans l'eau et fait d'eux des liposomes cationiques efficaces (Vigneron *et al.*, 1996). L'efficacité de transfection de ces vecteurs a été étudiée avec succès, *in vitro* sur des cellules humaines primaires de l'épithélium bronchique et *in vivo* sur l'épithélium respiratoire de la Souris (Oudrhiri *et al.*, 1997). Le ciblage des voies aériennes avait pour but ultime d'appliquer cette technique au traitement de la mucoviscidose. Plus récemment, la même équipe a synthétisé un lipide cationique bisguanidium-diacétylène [BGDA] qui s'est montré capable *in vitro* de transférer des gènes

sous forme de complexes avec le DOPE et un co-lipide neutre l'hydroxyéthylènediacétylène [HEDA] (Patel *et al.*, 2001). Les lipides dérivés des diacétylènes offrent un moyen d'étudier les effets des domaines polymérisables et par conséquent les relations structure/fonction des complexes lipides/DNA.

La greffe d'un résidu cholestérol au L-lysynamide [K-Chol] ou au L-orthinamide [O-Chol] permet d'obtenir des vecteurs très efficaces pour transférer des cellules de Mammifères *in vitro* (cellules 293, NIH 3T3 et HepG2) et relativement peu cytotoxiques (Figure 1.16) (Choi *et al.*, 2001).

FIGURE 1.16.
Lipides cationiques dérivés du cholestérol.



Le dérivé O-Chol a ensuite été utilisé *in vivo* ; il présente de nombreux avantages sur d'autres réactifs de transfection disponibles dans le commerce (efficacité augmentée de façon significative, moindre dépendance au sérum et sélectivité plus importante pour les cellules tumorales). Ce vecteur permet d'exprimer des gènes à un niveau très élevé en cellules tumorales péritonéales ; c'est donc un outil intéressant pour la thérapie génique de sujets souffrant de cancer des ovaires disséminés dans la cavité péritonéale (Lee *et al.*, 2002). Par ailleurs, le fait d'introduire un groupe hydrophile dans la portion aminoterminal des dérivés du cholestérol diminue la stabilité des complexes et facilite la libération du DNA de l'endosome (Hasegawa *et al.*, 2002).

(3) Lipoplexes chargés négativement couplés à l'albumine sérique humaine.

Les lipoplexes présentent un désavantage en cas d'éventuelles applications *in vivo* : ils interagissent avec les macromolécules sériques chargées négativement. Une telle interaction

limite leur efficacité de le transfert et par conséquent l'expression des gènes et elle empêche les complexes d'atteindre leur tissu cible. Pour contourner cette difficulté, on a imaginé de revêtir des liposomes cationiques avec de l'albumine, l'une des protéines plasmatiques les plus abondantes (Simoes *et al.*, 2000). L'albumine présente 2 avantages pour cette application : (a) elle induit une ingestion des lipoplexes par les cellules et (b) elle destabilise les endosomes en milieu acide ; la libération intracellulaire du gène s'en trouve donc améliorée. L'association des liposomes cationiques, du DNA et de l'albumine sérique humaine forme un complexe ternaire qui porte une charge négative plus importante que les lipoplexes correspondants dépourvus d'albumine. Ce complexe ternaire a une meilleure activité de transfection et transfecte un pourcentage plus élevé de cellules, et de plus, il est actif et non toxique en présence de sérum. Les complexes ternaires offrent donc une alternative crédible potentielle à l'usage thérapeutique des autres vecteurs synthétiques.

(4) La glycérophosphoéthanolamine couplée au fluor comme lipide auxiliaire.

La glycérophosphoéthanolamine partiellement couplée au fluor [F-PE] est un analogue très proche du DOPE. Mais elle possède une structure conique plus prononcée ce qui la rend plus efficace que ce dernier vecteur pour rompre les membranes. La F-PE a été ajoutée à une lipopolyamine cationique et son influence sur la transfection a été évaluée *in vitro* (sur des cellules épithéliales humaines de carcinome pulmonaire A 549), et *in vivo* (par injection intraveineuse dans la veine de la queue de Souris) (Boussif *et al.*, 2001). Les lipoplexes contenant de la F-PE possèdent un potentiel de transfection supérieur à celui des lipoplexes analogues couplés au DOPE, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. On peut attribuer cette efficacité à l'augmentation de leur caractère lipophile et hydrophile qui empêche le DNA d'interagir avec les composés du milieu intérieur et par conséquent en prévient la dégradation. Les complexes couplés au fluor seront certainement utilisés avec profit *in vivo*.

(5) Transfections stables avec étape de sélection à la G418 et phase d'enrichissement par trieur de cellules.

Une des limitations majeures de la thérapie génique appliquée à des cellules *ex vivo* est le caractère transitoire de la transfection et la perte progressive du gène introduit. Le problème peut être contourné par l'adjonction de 2 étapes supplémentaires à la procédure classique de transfection. Mais la méthode implique l'utilisation de plasmides de DNA exprimant le gène

de l'EGFP [pour *enhanced green fluorescent protein*] et le gène de résistance à la néomycine qui permettent respectivement une étape d'enrichissement par trieur de cellules ou FACS [pour *fluorescence activated cell sorter*] et la sélection des cellules transfectées au moyen de la G418, un antibiotique analogue à la néomycine. Par lipofection suivie de ces 2 étapes, il a été possible d'augmenter très fortement l'angiogénèse cutanée après greffe de kératinocytes primaires de cochon transfectés par le gène du VEGF (Rio *et al.*, 1999). Cette approche nous a permis d'obtenir des populations de cellules musculaires satellites primaires transfectées, représentant 70 % de la population initiale soumise à la transfection (Arnold *et al.*, 2002).

1322-Les polymères cationiques ou polycations.

Les polymères cationiques sont des vecteurs non-viraux riches en amines ; cette constitution leur donne une grande capacité à compacter les acides nucléiques. Leur mécanisme d'association au DNA repose sur le même principe que celui des lipides cationiques : le DNA est condensé par des interactions électrostatiques. Ainsi, la L-poly-L-lysine [PLL] est un polymère porteur d'une charge cationique uniforme : cette propriété lui permet de condenser des acides nucléiques en complexes appelés polyplexes, par analogie avec les lipoplexes qui se forment avec des lipides cationiques. La PLL complexée au DNA est incapable de transfecter une cellule en l'état, mais quand elle est couplée chimiquement à différents ligands, elle est capable de reconnaître des récepteurs spécifiques à la membrane plasmique des cellules cibles et de s'y lier. Les complexes DNA-polycation-ligand sont endocytés ; le DNA est introduit dans la cellule cible et s'y exprime (Erbacher *et al.*, 1996). La principale limite de cette technique vient de la dégradation lysosomique des complexes de transfection. On a amélioré l'activité de transfection de ce type de complexe en remplaçant la polylysine par des dendrimères de polyamidoamines ou par des polyéthylènimines — ces dérivés azotés possèdent des propriétés intrinsèques endosomolytiques (Haensler et Szoka, 1993 ; Boussif *et al.*, 1995) — et inventé le concept de virus artificiel. Ce concept est prometteur et il a permis le développement d'autres vecteurs moins toxiques combinant des lipides cationiques à des polycations pour augmenter l'efficacité de transfection.

(1) Amélioration du polyéthylèneimine.

Le polyéthylèneimine [PEI] est une substance chimique connue depuis plusieurs années. Il présente des propriétés de transfection intéressantes. Il est donc utilisé en tant

qu'agent de transfert de gènes depuis 1995 et il a fourni des résultats prometteurs *in vitro* aussi bien qu'*in vivo* (Boussif *et al.*, 1995 ; 1996 ; Ferrari *et al.*, 1997). Il a cependant la réputation d'être très cytotoxique (Helander *et al.*, 1998). Pour diminuer la cytotoxicité, on a imaginé d'éliminer le PEI non complexé par une centrifugation, et de modifier en même temps la procédure de transfection en ajoutant des molécules de PEI plus petites aux complexes PEI/DNA nouvellement formés. Il en est résulté une augmentation de la capacité tampon des complexes sans pour autant que leur concentration en charges superficielles ne soit modifiée (Godbey *et al.*, 1999). L'ensemble de ces modifications, qui doivent être toutes apportées à la procédure et non isolément, a permis d'améliorer le système de transfection. Il a été également confirmé que le succès des transfusions convoyée par le PEI est dû à la capacité de ce composant à tamponner le milieu endolysosomal.

Le transfert de gène dans le système nerveux central serait très intéressant pour soigner des maladies telles que l'ALS ou la SMA. Mais ces dernières évoluent très lentement ; il faudrait donc instaurer une thérapie continue impliquant l'expression du transgène sur le long-terme ce qui sous-entend l'administration répétée du vecteur. Pour délivrer un gène dans le système nerveux central, l'approche la plus répandue consiste à injecter directement le vecteur en un site déterminé. Il s'agit là d'un procédé très invasif, et, par ailleurs, l'expression du gène n'est détectée qu'au voisinage direct du lieu d'injection. Une méthode moins invasive consiste à faire une injection du vecteur dans le liquide céphalo-rachidien à hauteur de la zone lombaire du rachis. Une administration bi-hebdomadaire de complexes de PEI/DNA conduit à une expression stable du gène (pendant 6 semaines) dans la moelle épinière, si le PEI vecteur est modifié par du polyéthylène glycol, un polymère synthétique qui augmente la solubilité et réduit l'antigénicité, l'immunogénicité et la toxicité des groupes auxquels il est attaché (Shi *et al.*, 2003).

(2) Libération de gènes faisant appel à des polymères biodégradables.

L'usage de la PLL, couronné d'un certain succès, a conduit à la synthèse de l'acide poly[α -(4-aminobutyl)-L-glycolique] [PAGA]. Ce polymère est capable de former des complexes avec du DNA plasmidique et de protéger celui-ci de la dégradation nucléasique. De telles propriétés permettent d'améliorer les performances de la transfection par rapport à celles que l'on observe avec la PLL qui est un analogue structural du PAGA. Le produit terminal de dégradation du PAGA est facilement métabolisé et excrété de sorte que ce polymère est totalement biodégradable (Lim *et al.*, 2000). L'usage d'un complexe de

PAGA/DNA codant des cytokines d'intérêt a permis de retarder l'apparition de métastases tumorales, de les confiner voire de les éliminer et il a même empêché leur réapparition. Cette méthode ouvre la voie à de futurs traitements anticancéreux. Dans ce cadre, l'IL-12 s'est montrée la plus prometteuse pour induire une immunité anti-tumorale. Elle suscite en effet la production d'interféron- γ et de TNF- α , toutes cytokines qui convoient les effets anti-tumoraux des cellules immunitaires (Pham-Nguyen *et al.*, 1999). Le PAGA a été utilisé pour délivrer un plasmide appelé pmIL-12 codant le gène murin de l'IL-12 dans des cellules CT-12 d'adénocarcinome du colon en culture, et dans des souris balb/c CT-26 porteuses de tumeurs sous-cutanées. Il s'agissait par là, pour traiter le cancer, de développer un système de production/libération des cytokines qui soit non toxique et qui fasse appel aux polymères biodégradables. Le PAGA protège effectivement le plasmide pmIL-12 contre la dégradation nucléasique, il augmente l'expression du gène de l'IL-12 et il réduit la vitesse de progression des tumeurs chez les souris traitées. Grâce à sa biodégradabilité rapide, aucune réponse antigénique ni inflammatoire n'a pu être observée après son administration (Maheshwari *et al.*, 2000). Un tel système de libération de gènes conduit à l'inhibition de la croissance des tumeurs et prolonge la survie de l'animal grâce à la production de toute une série de cytokines et à l'infiltration des tumeurs par des cellules immunitaires à des niveaux beaucoup plus élevés que lorsque le plasmide pmIL-12 est utilisé seul. Les caractéristiques des complexes PAGA/pmIL-12 ajoutées à leur grande biodégradabilité font de ces derniers des outils très intéressants : en effet, on peut les administrer de façon répétée et ils peuvent maintenir une expression prolongée du gène d'intérêt (Maheshwari *et al.*, 2002).

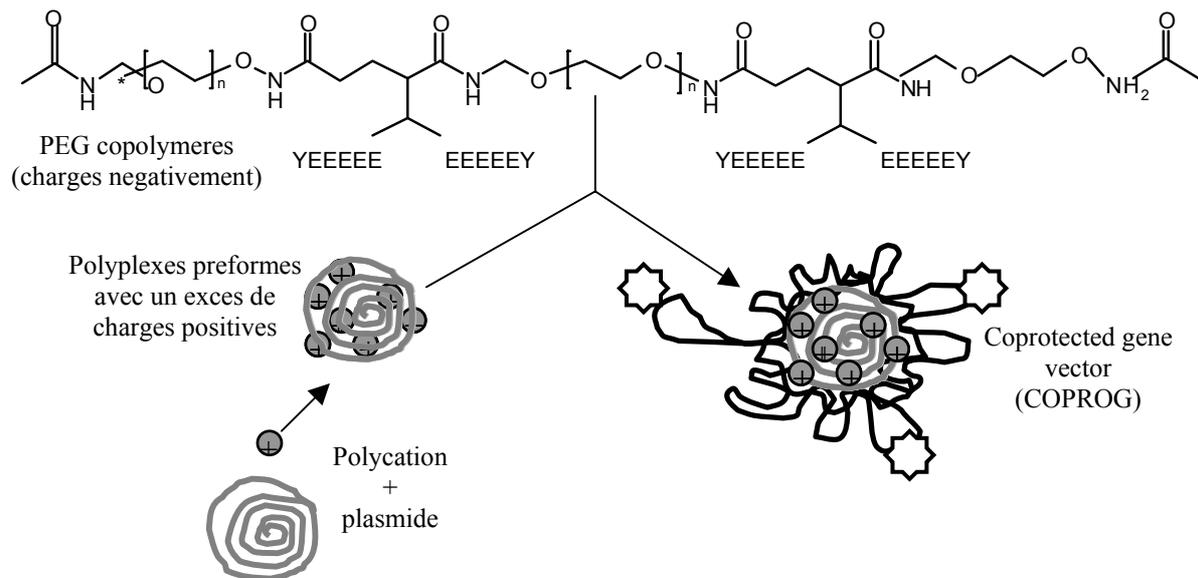
(3) Les co-polymères protecteurs.

De nombreux systèmes non-viraux de transfert de gènes présentent une bonne efficacité de transfection *in vitro*, mais ils sont complètement inefficaces lorsqu'ils sont essayés *in vivo*. En effet, les lipoplexes ou les polyplexes chargés positivement, ou leurs constituants, sont exposés à des composants du milieu intérieur, qui — comme le système du complément — altèrent leurs caractéristiques physico-chimiques et limitent leur applicabilité *in vivo*. L'un des buts essentiels du développement de nouveaux vecteurs consiste à trouver une structure de compromis qui permette à ces derniers de résister aux contraintes du milieu extra- et intracellulaire. Le polyéthylène glycol a la propriété de conférer, lors de la libération extra-cellulaire, une stabilité plus grande aux constituants auxquels il est lié. Cette propriété a été utilisée pour synthétiser une nouvelle classe de co-polymères protecteurs appelés

protective copolymers [PROCOP]. Il s'agit là de peptides anioniques couplés à une chaîne de copolymères de PEG réactifs, et assemblés à des vecteurs non-viraux de transfert de gènes par des interactions électrostatiques (Figure 1.17) (Finsinger *et al.*, 2000).

FIGURE 1.17.

Co-polymères protecteurs. (D'après Finsinger *et al.*, 2000).



Des complexes revêtus de tels co-polymères sont stabilisés stériquement dans leur taille minimale. Cette configuration réduit l'agrégation induite par le sel et l'albumine sérique ; il en résulte une réduction drastique de l'activation du complément, d'une part, et d'autre part, une diminution très importante des interactions avec les protéines du sérum. Ce type de vecteurs s'est révélé doté d'une remarquable efficacité de transfection et on peut envisager de les utiliser avec profit pour améliorer les étapes intracellulaires du transfert de gènes.

(4) Utilisation de signaux de ciblage nucléaire.

Afin d'augmenter la faible efficacité de délivrance du DNA d'intérêt dans le noyau des cellules cibles, il a été suggéré d'utiliser des signaux de ciblage nucléaire. Le facteur de transcription facteur GAL4 de la levure reconnaît une séquence du DNA spécifique et possède une activité de ciblage nucléaire. On a donc imaginé de l'utiliser comme facteur de

ciblage nucléaire. Mais la fonction de localisation nucléaire et la fonction de liaison au DNA de GAL4 sont mutuellement exclusives car GAL4 utilise une voie non conventionnelle pour rentrer dans le noyau (Chan *et al.*, 1998). Pour résoudre ce problème, on a lié une polylysine modifiée au signal de localisation nucléaire ou *nuclear localization signal* [NLS] de l'antigène tumoral [Ag T] du SV40. Une autre protéine de fusion, constituée du facteur GAL4 liée à l'hormone stimulatrice des mélanocytes [MSH pour *melanocyte-stimulating hormone*] a également été utilisée pour promouvoir efficacement le transfert de gènes dans des cellules exprimant le récepteur de la MSH (Chan et Jans, 2001). De ces expériences il ressort que l'utilisation de signaux de ciblage nucléaire peut augmenter la libération de gènes dans le noyau de la cellule et que cette libération peut encore être améliorée si l'on utilise l'endocytose convoyée par un récepteur pour faire pénétrer le vecteur dans la cellule.

Dans la même optique, l'ingestion de plasmides de DNA dans des cellules a été augmentée au moyen d'une oligolysine couplée à une séquence RGD qui à la fois condense le DNA et se lie aux intégrines exposées à la membrane plasmique des cellules. Lorsque cette structure est complexée à un lipide cationique tel que la Lipofectamine[®], l'expression du gène est améliorée grâce à l'augmentation d'efficacité du transport nucléaire lequel dépend de l'énergie et fait intervenir les complexes des pores nucléaires. Dans ces complexes, les peptides d'oligolysine couplés à la séquence RGD agissent comme des NLS tandis que les lipides cationiques facilitent l'entrée du vecteur dans la cellule et promeuvent la déstabilisation de l'endosome (Colin *et al.*, 2001).

(5) Expression de gènes ciblant un type cellulaire déterminé.

Dans certains cas, il ne faut cibler qu'un seul type cellulaire pour délivrer un gène d'intérêt. Il faut à cette fin construire des structures dans lesquelles un ligand ou un anticorps spécifique fait partie intégrante du véhicule de transfection. L'exemple du vecteur de transfert contenant une protéine de fusion GAL4-MSH illustre ce concept. Avec de tels vecteurs, seules les cellules qui expriment le récepteur d'intérêt ou un antigène particulier, ingéreront le gène thérapeutique par endocytose. C'est ainsi qu'un polymère cationique, la poly-L-ornithine [pOrn] a été modifiée par du galactose capable de reconnaître le récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes et par un peptide promoteur de fusion (dérivé de l'hémagglutinine d'un virus de la grippe et appelé mHA2) pour obtenir la construction Gal-pOrn-mHA2. Ce composé est capable de lier, de condenser et de libérer le DNA dans le cytoplasme après ingestion (Nishikawa *et al.*, 2000). Des complexes Gal-pOrn-mHA2/DNA

ont été injectés à des souris par voie intraveineuse. On en a ensuite étudié la distribution cellulaire et tissulaire au microscope confocal. Il apparaît que la construction introduite est capable de susciter une expression génique efficace préférentielle dans les hépatocytes. Une telle technique peut être utilisée pour cibler n'importe quel type de cellule.

Une autre possibilité de ciblage consiste à préparer des immunoplexes constitués de polyplexes à base de PEI lié à la streptavidine auxquels est attaché un anticorps couplé à la biotine (Guillem *et al.*, 2002). En cellules de lymphome humain, très difficiles à transfecter, cet immunoplexe s'est montré sélectif et n'a libéré les oligonucléotides que dans la lignée exprimant l'antigène visé, ici le CD4. Les immunoplexes sont donc de bons vecteurs non-viraux et permettent une libération spécifique et sélective d'acide nucléique aux cellules.

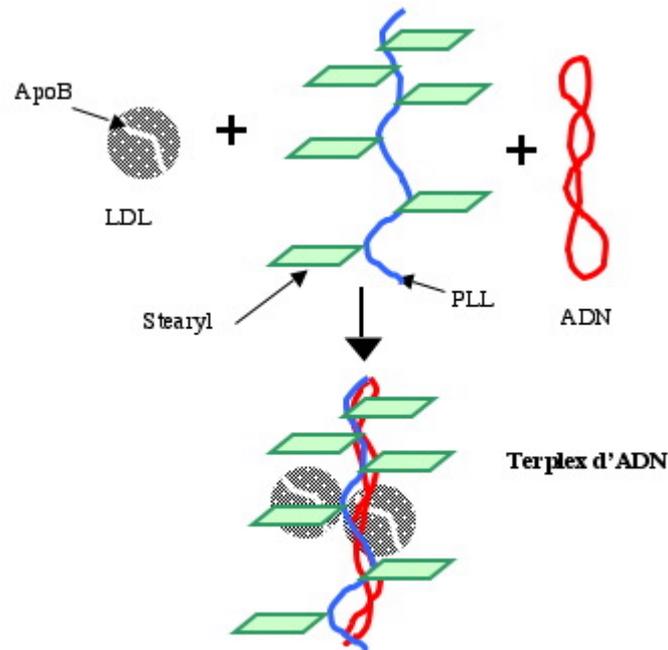
Le DNA peut aussi se lier à des facteurs de transcription spécifiques de certaines cellules, et capables de pénétrer dans le noyau en empruntant la machinerie d'importation nucléaire des protéines. Ainsi, un plasmide portant le promoteur du gène de l'actine γ des muscles lisses s'exprime exclusivement dans les cellules musculaires lisses, alors qu'il reste confiné au cytoplasme dans les fibroblastes. Il s'agit là d'un vecteur non-viral spécifique de certaines cellules ; théoriquement, ce concept peut être appliqué à tous les types cellulaires (Vacik *et al.*, 1999).

(6) Le terplexe de DNA.

Le terplexe de DNA est un nouveau vecteur qui équilibre les interactions électrostatiques et hydrophobes entre la stéaryl-PLL, la lipoprotéine de faible densité ou *low density lipoprotein* [LDL] et un DNA plasmidique (Figure 1.18). Le complexe ainsi formé pénètre dans la cellule en empruntant la voie de l'endocytose convoyée par un récepteur (Kim *et al.*, 1998). Les constituants de cette structure ont été très judicieusement choisis. Les groupes amines de la PLL interagissent avec les phosphates chargés négativement du DNA et neutralise partiellement la charge. Le groupe stéaryl établit des interactions hydrophobes avec la lipoprotéine et la LDL améliore l'efficacité de transfert de gène en augmentant l'endocytose convoyée par le récepteur du LDL.

On a utilisé un terplexe de DNA pour transfecter des cultures de cellules primaires de paroi artérielle afin d'y délivrer le gène thérapeutique et d'étudier les possibilités d'utiliser la

FIGURE 1.18.
Structure d'un terplexe de DNA. (D'après Kim *et al.*, 1998).



thérapie génique dans le traitement des maladies du système cardio-vasculaire (Yu *et al.*, 2001). La cytotoxicité du terplexe est beaucoup moins importante que celle de la Lipofectamine[®] et son efficacité de transfection est approximativement 60 fois plus importante que celle de ce vecteur, déjà ancien il est vrai. Le terplexe de DNA a été également utilisé *in vivo*. Il permet d'obtenir des taux de transfection des cellules du myocarde de Lapin, 20 à 100 fois supérieurs à ceux que l'on obtient avec le DNA seul (Affleck *et al.*, 2001). Une cytotoxicité minimale une remarquable efficacité de transfection font du terplexe de DNA un outil de choix pour le géno-thérapeute des maladies cardio-vasculaires.

(7) Le LPD1.

On a utilisée le principe du terplexe de DNA pour construire un autre complexe, appelé LPD1. Le LPD1 est constitué de PLL et de liposomes cationiques qui permettent de former une sorte de carapace lipidique à la surface de la particule (Gao et Huang, 1996). Cependant le diamètre de ce complexe est trop important (> 100 nm) et ne permet pas à ce dernier de traverser les pores nucléaires. C'est pourquoi la formule a été améliorée. Le sulfate

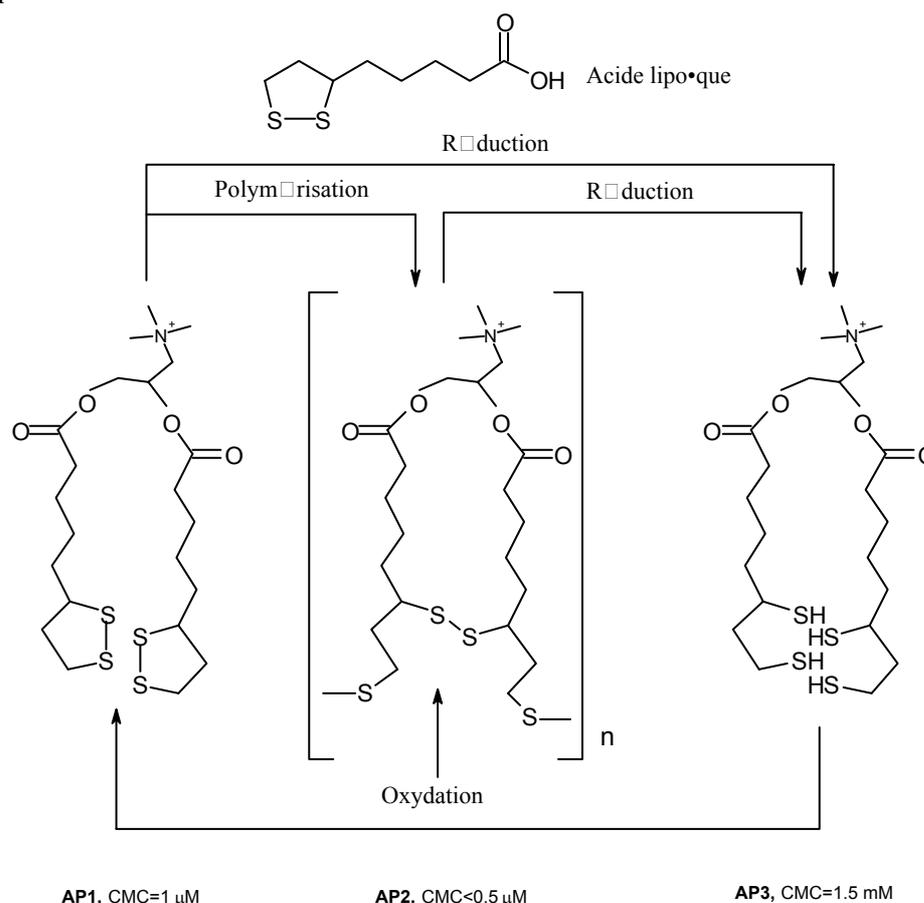
de protamine a remplacé la PLL, car il est plus petit, il porte de nombreuses charges positives et c'est un composé naturel. Le liposome cationique de la première formule est remplacé par le 1,2-dioléol-3,triméthylammonium propane [DOTAP]/cholestérol. Les particules de ce nouveau LPD1 sont sphériques, ont un diamètre moyen < 100 nm et sont très riches en lipides. Utilisées pour transfecter des cellules en cultures, elles permettent d'atteindre des taux de transfection supérieurs à ceux que l'on observe quand on utilise d'autres lipoplexes (Sorgi *et al.*, 1997). Elles ont donc été injectées par voie systémique dans le poumon, dans le cœur, dans le foie, dans la rate et dans le rein d'animaux de laboratoire. Les résultats se sont montrés des plus prometteurs ; dans le poumon, il persiste 40 % de la dose de DNA injectée. Le système du LPD1 a donc été utilisé pour traiter les métastases pulmonaires d'un néoplasme neuroendocrine multiple de la Souris lié à un déficit en produit du gène *Rb* ; il permet de réduire le nombre de métastases. Un tel système est donc intéressant pour la mise au point de thérapies génique anti-cancéreuses (Nikitin *et al.*, 1999).

Le LPD1 a pu être préparé sous forme de lyophilisat ou d'aérosol. Les 2 formulations permettent de transfecter des cellules A549 dérivées d'un carcinome pulmonaire de l'homme, comme en témoigne la bonne expression d'un gène rapporteur. L'aérosol est même plus efficace que les complexes LPD1 fraîchement préparés. L'aérosolisation est nécessaire pour atteindre le tractus respiratoire inférieur et assurer par conséquent un transfert de gène efficace et stable dans les poumons. Il est désormais possible de préparer des systèmes de vecteurs de gènes dispersibles et que l'on peut administrer par voie pulmonaire (Seville *et al.*, 2002).

1323-Les dérivés amphiphiles de l'acide lipoïque.

La prévention de la dégradation du DNA et la promotion de sa libération dans la cellule sont encore une fois mises à l'épreuve dans les dérivés amphiphiles de l'acide lipoïque. Les propriétés oxydo-réductrices des groupements lipoate de cette vitamine naturelle ont été utilisées pour synthétiser de nouveaux amphiphiles cationiques (Figure 1.19). En leur état oxydé, ces vecteurs condensent le DNA en particules sphériques homogènes qui libèrent le DNA libre (Kim *et al.*, 1998). Le complexe amphiphile augmente de 7 fois l'expression du gène et l'on peut encore améliorer cette performance en greffant un NLS au vecteur amphiphile. Une voie nouvelle s'ouvre à la synthèse d'une classe originale de vecteurs dont le potentiel redox contrôle la libération du gène qu'ils ont pour mission de transférer à la cellule.

FIGURE 1.19.
L'acide lipoïque.



1324-Les agents lysosomotropiques.

Les complexes DNA/vecteur non-viral sont connus pour rentrer dans la cellule par voie endocytotique ; l'obstacle majeur à l'expression efficace du gène est la dégradation du DNA dans le compartiment lysosomique (Lucas *et al.*, 1995). Les agents lysosomotropiques sont par définition "des substances captées sélectivement par le lysosome indépendamment de leur structure chimique ou du mécanisme de capture". Pour améliorer la libération des gènes, on a tenté d'utiliser la capacité de ces substances à empêcher la fusion de l'endosome avec le lysosome. A cette fin, la capacité de 3 agents lysosomotropiques (le saccharose, la chloroquine et la polyvinylpyrrolidone [PVP]) à augmenter l'efficacité de transfection a été étudiée sur 3 lignées cellulaires (COS, CHO et 293) (Ciftci et Levy, 2001). Tous se sont montrés capables d'augmenter la libération du DNA de l'endosome, avec une efficacité décroissant dans l'ordre suivant : sucrose > chloroquine > PVP. Cependant, l'augmentation de la libération est spécifique du type cellulaire et de l'agent considérés. De ces travaux, on peut

conclure que l'usage d'agents lysosomotropiques peut améliorer le transfert de gène et augmenter la durée d'expression du transgène.

1325-Les agents mitochondriotropiques.

Au cours des dernières années, on a identifié de nombreuses maladies liées à des mutations du génome mitochondrial et qui, le plus souvent, se manifestent par une perturbation du métabolisme oxydatif. Les fondements génétiques de ces maladies mitochondriales diffèrent de ceux que gouvernent le génome nucléaire. Il existe en particulier quelques modifications du code génétique (Wallace, 1999). Même si l'on comprend beaucoup mieux la pathogénie de ces maladies, elles ne font l'objet d'aucun traitement satisfaisant. La thérapie génique mitochondriale nécessite l'utilisation de vecteurs de transfection spéciaux, spécifiques des mitochondries. Pour l'instant il n'en existe aucun. On peut cependant imaginer que certaines molécules pourraient en tenir lieu. Le déqualinium, par exemple, est un amphiphile qui s'accumule préférentiellement dans les mitochondries en réponse à un gradient électrochimique transmembranaire ; il fait donc un bon candidat au rôle de vecteur thérapeutique mitochondrial (Lasch *et al.*, 1999). Des vésicules formées de déqualinium, appelées des DQAsomes, libèrent sélectivement le DNA dans des liposomes riches en cardiolipines qui miment à la fois l'intérieur et l'extérieur de la membrane mitochondriale. Ces vésicules pourraient bien être les premiers vecteurs de transferts spécifiques des mitochondries (Weissig *et al.*, 2000).

133-Conclusion.

Le terme de thérapie génique embrasse tant de mécanismes correcteurs (activer, inhiber ou réguler l'expression du gène thérapeutique ou pathologique) qu'il est impossible d'imaginer qu'une formule universelle, véritable solution miracle, permettrait de traiter toutes les maladies concernées. Pour chaque maladie concernée, ou presque, il faut envisager une stratégie différente. Dans ce CHAPITRE, nous avons exposé quelques-unes des approches développées pour corriger certains phénotypes pathologiques. Mais la description n'en est pas exhaustive. Chaque jour, de nouvelles techniques, souvent élégantes et judicieuses, sont conçues et mises au point pour améliorer le transfert de gènes. Les progrès réalisés en très peu de temps dans ce domaine sont considérables. Même si un certains public est déçu par les résultats obtenus en regard d'attentes vieilles de près de 20 ans, les connaissances acquises en

biologie moléculaire ont permis d'inclure un plus grand nombre de maladies dans les protocoles d'étude et de cerner plus étroitement les causes génétiques de certaines d'entre elles. Il reste beaucoup à faire pour traiter réellement les patients atteints de ces maladies, mais chaque jour qui passe marque un pas supplémentaire sur la route du succès.

14-Données antérieures obtenues au laboratoire : l'hypothèse musculaire de l'amyotrophie spinale progressive.

141-Apport des cocultures nerf-muscle à la compréhension de la maladie.

1411-Comportement des cocultures.

La SMA est définie, nous l'avons dit, comme une dégénérescence des motoneurones conduisant à une atrophie musculaire et finalement à la paralysie. Dans cette définition, l'atrophie musculaire n'est envisagée que comme une conséquence de la dénervation résultant de la dégénérescence motoneuronale et le muscle n'est pas impliqué dans la pathogénie. Nous nous sommes efforcés, depuis plusieurs années, de montrer que cette conception n'est pas juste. Les premiers modèles animaux de la maladie datent de 2000 et sont donc très récents. Avant cette date, le seul modèle disponible pour étudier la pathogénie de la maladie était un système de coculture hétérologue constitué de cellules musculaires humaines innervées par des explants de moelle épinière de Rat provenant d'embryons prélevés au treizième jour de gestation. Ce modèle permet de reconstituer une unité motrice fonctionnelle (Askanas *et al.*, 1987).

Lorsque de telles cocultures sont réalisées avec des cellules musculaires humaines saines, elles se maintiennent pendant 1 an ou plus, les fibres musculaires arrivent à maturation, les stries transversales sont visibles, et les fibres se contractent. En revanche, si les cellules musculaires sont issues de patients atteints de SMA I et II (mais non de SMA III), les fibres innervées dégèrent de manière caractéristique en 1 à 3 semaines, le cytosquelette se désorganise, des vacuoles apparaissent dans le cytoplasme et la culture finit par mourir. Si les cellules musculaires proviennent de patients souffrant d'autres maladies telles que l'ALS, qui est une autre maladie du motoneurone, le système se comporte comme les cocultures témoins ce qui exclut que le comportement anormal du versant musculaire de la coculture soit la conséquence d'une dénervation *in vivo* — l'ALS en effet s'accompagne d'une très

importante dénervation (Braun *et al.*, 1995). Cependant, les cellules musculaires humaines normales non innervées, cultivées seules, dégèrent spontanément au bout de 1 à 3 mois et les explants de moelle épinière de Rat le font au bout de 3 semaines environ. Il semble donc qu'il s'établisse un dialogue entre les 2 versants de la coculture et que cet échange permette au système de survivre et de se maintenir dans de bonnes conditions. Dans le cas des cocultures de cellules musculaires satellites de sujets atteints de SMA I ou II, le contact entre le nerf et le muscle s'établit, comme en témoigne l'apparition de contractions des fibres musculaires, mais le dialogue entre les 2 composantes de la culture est très probablement défectueux, et entraîne la mort de tout l'ensemble.

1412-Causes de la dégénérescence.

Les facteurs neurotrophiques BDNF, NT-3 et NT-5 augmentent la capacité des motoneurons de Rat à innover des cellules musculaires humaines normales dans le système de coculture, mais ces facteurs ne peuvent pas empêcher la dégénérescence des cocultures de cellules musculaires satellites de patients atteints de SMA I ou II (Braun *et al.*, 1996). Cette dégénérescence n'est pas due non plus à la sécrétion d'un facteur toxique par les cellules musculaires malades ni à l'absence de production d'un facteur trophique par les cellules saines (Braun *et al.*, 1997). Comme dans ce système, le versant nerveux provient d'embryons de Rat sains, il est logique d'imputer au versant musculaire la responsabilité de sa propre dégénérescence.

Le mélange des cellules musculaires satellites clonées provenant de malades (atteints de SMA I et II) avec des cellules satellites clonées saines conduit en culture aboutit à la formation d'hétéromyotubes par fusion des 2 types de cellules satellites. Ces structures se différencient et survivent plusieurs semaines après innervation sans qu'aucune dégénérescence ne puisse être observée (Guettier-Sigrist *et al.*, 1998). Ainsi, les cellules responsables de la dégénérescence des myotubes sont les cellules satellites. On concluait dans cette étude qu'une fois établi le contact entre le nerf et le muscle, celui-ci fournit un signal de survie aux motoneurons qui, en retour, peut exprimer son effet trophique sur la fibre innervée (voir SECTION 122 du présent CHAPITRE). En l'absence de ce signal, les motoneurons ne sont pas informés qu'ils ont atteint leur cible et qu'ils l'ont innervée avec succès, et ils rentrent en apoptose.

1413-Etude de l'expression du mRNA de la protéine SMN.

Lors de la culture de cellules musculaires satellites témoins *in vitro*, il apparaît 2 pics d'expression du mRNA de la protéine SMN. Le premier s'observe avant le début de la fusion au jour 2, et le deuxième 1 ou 2 jours avant la fin de la fusion, au jour 5. Dans les cellules myogéniques issues de malades, seul le deuxième pic est observé (Guettier-Sigrist *et al.*, 2001). Ces résultats confirment qu'il existe un défaut de maturation des muscles chez les patients atteints de SMA et ils suggèrent que le gène *SMN* est impliqué dans ce phénomène puisque lorsqu'il est muté, les fibres musculaires sont immatures.

1414-Etude de l'apoptose des cellules constitutives des cocultures.

Lorsque l'on dépose des motoneurones purifiés de Rat sur une culture de myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I, les 2 types de cellules dégénèrent en 24 h alors qu'ils se maintiennent au moins 2 semaines si les cellules musculaires servant de support proviennent de sujets sains. Cette dégénérescence est consécutive à un mécanisme d'apoptose (Guettier-Sigrist *et al.*, 2002). Une telle dégénérescence n'est jamais observée lorsque l'on utilise des neurones sensitifs au lieu et place des motoneurones.

Toutes ces expériences confirment que dans la SMA, il y a bien un défaut de dialogue entre le motoneurone et le muscle d'une part, et que, d'autre part, le muscle est certainement impliqué dans la pathogénie de cette maladie. Il s'agit là d'un fait aux conséquences thérapeutiques très importantes. Il suggère en effet qu'il est préférable de cibler le tissu musculaire plutôt que la moelle épinière qui, par ailleurs est beaucoup moins accessible.

142-Etude préliminaire sur les RACHs dans les cellules musculaires.

Une étude préliminaire conduite sur des cellules musculaires seules a permis de mettre en évidence un défaut d'agrégation des RACH dans les cellules provenant de malades atteints de SMA. On a vu que ce phénomène constitue la première étape de la maturation de la JNM (cf. SECTION 12 de ce CHAPITRE). Cette expérience confirme que les cellules musculaires des malades atteints de SMA sont immatures. Les résultats demandent à être confirmés, car ils ne permettent pas de déterminer si ce défaut résulte d'un défaut du

processus d'agrégation lui-même, ou d'une diminution de l'expression des RACH qui seraient moins nombreux dans les cellules malades.

15-Objectifs de cette étude.

Les résultats que nous venons de résumer nous ont amené à envisager de cibler le muscle pour y corriger le défaut d'expression du gène *SMN*. Comme le phénotype anormal des cellules musculaires des malades est dû à la mutation de ce gène, on suppose que l'introduction de sa forme normale dans les cellules musculaires devrait restituer à ces dernières un phénotype normal. En coculture, cette restitution doit se traduire par une absence de dégénérescence des cellules musculaires malades transfectées par un gène *SMN* normal.

Notre travail a comporté plusieurs étapes. Nous avons d'abord construit le plasmide contenant le gène d'intérêt, puis nous avons choisi le vecteur de transfection le plus adéquat pour des cellules musculaires humaines primaires. Une fois transfectées, les cellules ont ensuite été sélectionnées puis innervées afin d'observer l'effet de la surexpression de *SMN* sur le comportement des cocultures.

Nous avons également poursuivi l'étude de l'anomalie d'agrégation des RACH dans les cellules musculaires afin d'y trouver une explication.

Nous désirons apporter ici une preuve non équivoque du rôle du muscle dans la pathogénie de SMA. Si le phénotype des cocultures préparées avec des cellules musculaires malades et transfectées par le gène *SMN* est normal, nous aurons en effet démontré que la thérapie génique musculaire doit être très sérieusement envisagée, ou à tout le moins que la stimulation de la production de la protéine non tronquée dérivée de *SMN2* doit viser préférentiellement le muscle.

**2-MATERIELS ET
METHODES.**

21-Culture cellulaire.

211-Culture primaire de cellules musculaires satellites humaines.

Les cultures primaires de cellules musculaires satellites humaines sont préparées à partir de biopsies musculaires humaines comme déjà décrit (Askanas et Engel 1975 ; Askanas et Gallez-Hawkins 1985).

2111-Obtention des biopsies.

Les échantillons de tissus musculaires humains sont prélevés lors d'interventions chirurgicales. Les sujets sains sont le plus souvent opérés pour une scoliose et, par conséquent, le muscle prélevé est en général le muscle paravertébral. Il peut également s'agir de prélèvements embryonnaires obtenus après interruptions volontaires ou thérapeutiques de grossesse. Immédiatement après le prélèvement, la biopsie est placée dans un flacon stérile contenant une solution saline équilibrée de Hanks contenant des ions calcium et magnésium [HBSS+] (Gibco, Life technologies, Cergy-Pontoise, France), et additionné de 1 % d'une solution aqueuse — concentrée 100 fois — d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline, streptomycine, amphotéricine B) (Gibco). Dans une telle solution, le tissu musculaire se conserve pendant 2 à 3 jours à 4°C.

Les prélèvements sont centralisés à la Banque de Tissus pour la Recherche de l'Association Française contre les Myopathies, localisée à l'Hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Le Docteur S. Vasseur, responsable de cette banque, se charge de répartir les échantillons entre les différents laboratoires demandeurs. Le délai qui s'écoule entre le prélèvement et la réception de la biopsie au laboratoire n'excède jamais 48 h.

2112-Traitement de la biopsie et inclusion dans un coagulum.

Dès sa réception, la biopsie est débarrassée sous la loupe binoculaire de tout les tissus non musculaires qui pourraient y être intégrés (nerfs, gaines et tendons, graisse, vaisseaux). Elle est ensuite découpée en explants d'environ 1 mm³ qui sont plongés dans un milieu dit de conditionnement, constitué de 61,25 % de milieu 199 (Gibco), 37,5 % de sérum fœtal de veau [SFV] (HyClone Europe, Paris, France) et de 1,25 % du mélange d'antibiotiques et d'antifongiques. Les explants sont ainsi laissés une nuit à 37°C dans une atmosphère d'air

(95 %)-CO₂ (5 %). Ils contiennent des cellules musculaires et des fibroblastes. Les derniers poussent beaucoup plus vite que les premières et il est impératif de les éliminer pour qu'ils n'envahissent pas la culture. A cette fin, les explants sont emprisonnés dans un milieu semi-solide, appelé coagulum de fibrine, constitué de 5 volumes de milieu de conditionnement pour 1 volume de plasma humain. Après 5 à 7 jours, une grande partie des fibroblastes infiltrant l'explant migrent à la périphérie de celui-ci. Cette étape est suffisante pour éliminer la majeure partie des fibroblastes.

2113-Explantation.

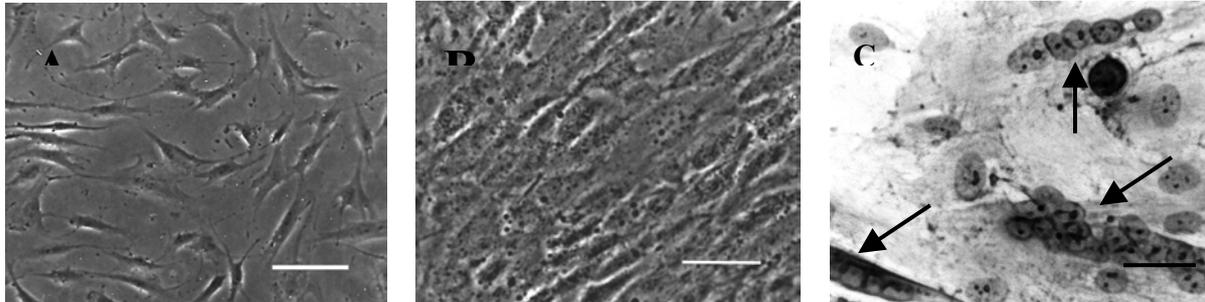
Les explants sont ensuite transférés dans des boîtes de Petri de 60 mm de diamètre [BP60] (Falcon, Polylabo, Strasbourg, France) pré-revêtues d'une solution à 1 volume de plasma humain pour 2 volumes de solution aqueuse de gélatine à 1,5 % (Sigma, l'Isles d'Abeau-Chênes, France) afin de favoriser l'adhérence des explants sur le support. Ceux-ci sont ensuite recouverts par 5 mL d'un milieu dit aneural, constitué de milieu F14 (Gibco, délivré avec l'autorisation du Dr. Askanas) additionné de 10 % de SFV, de 10 µg/mL d'insuline (Sigma), de 2 mmol/L de glutamine (Gibco), de 5 ng/mL de b-FGF [*basic fibroblast growth factor*] (Pepro Tech, Tebu, Le-Perray-en-Yvelines, France) de 10 ng/mL d'EGF [*epidermal growth factor*] (Prepro Tech) et de 1 % du mélange d'antibiotiques et d'antifongiques en solution aqueuse concentrée évoqué plus haut. Après quelques jours, de chaque explant émerge une population riche en cellules satellites qui constitue la culture de primo-explantation. Les explants sont alors enlevés de la boîte pour être soit congelés soit réutilisés pour une deuxième explantation.

2114-Subculture des cellules musculaires.

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Petri de 35 mm de diamètre [BP35] pré-revêtues d'une solution aqueuse de gélatine à 0,1 %. Après ensemencement, les BP35 sont incubées à 37°C dans une étuve à air (95 %)-CO₂ (5 %). Les cellules prolifèrent sur leur support (Figure 2.1.A) jusqu'à ce qu'elles soient confluentes, et forment un tapis cellulaire de l'épaisseur d'une cellule appelé monocouche (Figure 2.1.B). Les cellules cessent alors de se multiplier car elles sont soumises à l'inhibition de contact. Quand elles sont confluentes, les cellules musculaires commencent à fusionner et à donner naissance à des structures multinucléées appelées des myotubes (Figure 2.1.C). Il est possible d'induire la fusion des

cellules non confluentes en les cultivant dans un milieu à 5 % de SVF au lieu des 10 % habituels.

FIGURE 2.1.
Différents stades de maturation d'une culture de cellules musculaires humaines.



[A] Cellules musculaires satellites humaines en prolifération : grossissement x 100.

[B] Cellules musculaires satellites humaines confluentes : grossissement x 100.

[C] Cellules musculaires humaines fusionnées colorées au MGG : grossissement x 200. Les flèches montrent les myotubes.

Pour constituer un stock de cellules, il est possible de trypsiner celles-ci de leur support avant qu'elles n'aient atteint la confluence. La trypsine dégrade la composante protéique des contacts intercellulaires et de la lame basale et dissocie les cellules. On utilise une solution saline de trypsine (Sigma) à 0,025 % dont la composition est donnée en ANNEXE. La suspension cellulaire obtenue par trypsination est centrifugée à 250 x g pendant 10 min, puis le culot est repris dans du milieu aneural et l'on ensemence les cellules sur des supports prétraités par une solution aqueuse de gélatine à 0,1 %, en utilisant un rapport de démultiplication de 3. Cette dilution permet aux cellules d'avoir de l'espace pour proliférer. L'étape de subculture d'une culture de primo-explantation permet d'amplifier la population cellulaire ; elle ne peut être répétée que 8 à 12 fois, après quoi la capacité proliférative des cellules est perdue ou profondément altérée.

2115-Congélation et décongélation.

A n'importe quel moment de la culture, les cellules peuvent être congelées et conservées dans l'azote liquide à -196°C sans perte de viabilité ni de pouvoir prolifératif. Après trypsination, les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 250 x g puis reprises dans un milieu de congélation composé de 82 % de milieu minimal essentiel de Eagle [MEM]

(Gibco), de 10 % de SVF et de 8 % de diméthylsulfoxyde [DMSO] (Sigma) qui est un excellent agent cryoprotecteur. Le récipient utilisé pour la congélation est un cryotube de polypropylène (Costar, Dutscher, Brumath, France) capable de supporter des températures très basses. La congélation proprement dite se fait grâce à un minicongélateur progressif Nicool LM10 (Air liquide, Bussy-Saint-Georges, France) qui permet une diminution de la température de 1°C/minute. Si le refroidissement est trop brutal, la cellule ne peut pas perdre d'eau suffisamment rapidement pour maintenir l'équilibre entre les potentiels chimiques de l'eau extra- et intracellulaires. En-dessous de -130°C, il n'existe plus d'eau liquide, l'eau est totalement solidifiée et n'existe plus que sous 2 états, vitreux ou cristallin, de viscosité élevée. A cette température, l'énergie thermique est insuffisante pour autoriser des réactions chimiques.

La décongélation, doit se faire très rapidement : dès sa sortie de l'azote liquide, le cryotube est plongé dans un bain-marie à 37°C, puis on y ajoute 5 mL d'une solution saline équilibrée de Hanks sans calcium ni magnésium [HBSS-] pour diluer le DMSO qui à température ambiante est toxique pour les cellules. La suspension est centrifugée pendant 5 min à 250 x g et le culot cellulaire est dispersé dans du milieu aneural pour être distribué dans des BP prétraitées par une solution aqueuse de gélatine à 0,1 %.

2116-Marquage immunocytochimique de la desmine.

Afin de déterminer la proportion de cellules musculaires satellites par rapport aux fibroblastes, on met en évidence un marqueur spécifique des cellules musculaires, la desmine. Les cellules sont lavées avec de la solution saline tamponnée aux phosphates [PBS], puis elles sont fixées pendant 30 min à température ambiante avec une solution de paraformaldéhyde [PFA] à 4 % dans du PBS. Après 2 rinçages au PBS, la préparation est perméabilisée pendant 30 min à 4°C avec une solution de Triton X 100 à 0,1 % dans du PBS puis elle est traitée pendant 30 min à température ambiante avec une solution de gélatine à 0,5 % dans du PBS pour saturer les sites de liaison non spécifiques. La couche cellulaire est alors rincée avec une solution à 0,1 % de gélatine et 0,05 % de tween 20 dans du PBS. On ajoute alors l'anticorps primaire anti-desmine (anticorps monoclonal se Souris antidesmine humaine, clone, D33, ref. N 1526 ; DAKO, Trappes, France) dilué au 1/200 dans la solution de rinçage. Le traitement dure 2 h et se pratique à température ambiante. Après 3 rinçages, les cellules sont incubées pendant 1 h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à la cyanine 5 (Chemicon International, Euromedex) dilué au 1/2000. Les

cellules sont rincées une fois encore avant d'être montées entre lame et lamelle pour être observées au microscope confocal.

212-Cocultures nerf-muscle.

Dans la composante musculaire de la coculture nerf-muscle (Askanas *et al.*, 1987), les seules cellules indispensables à l'innervation sont les cellules satellites et les fibroblastes musculaires en des proportions respectives de 75 % et 25 % (Guettier-Sigrist *et al.*, 1998). Les fibroblastes produisent la lame basale de la structure. Si l'on dépose des motoneurons seuls sur des cellules musculaires, l'innervation ne peut se faire car les conditions nécessaires à son succès ne sont pas toutes remplies ; il ne se forme pas de lame basale. En outre, il faut associer aux motoneurons des neurones sensitifs ainsi qu'un facteur soluble favorisant l'innervation et produit par les cellules de Schwann (Guettier-Sigrist *et al.*, 2000).

En déposant des explants de moelle épinière d'embryons de Rat sur une culture de myotubes telles qu'elle vient d'être décrite dans la SECTION 2114 du présent CHAPITRE, toutes les conditions sont réunies pour que les myofibres arrivent à maturation.

2121-Coculture classique : myotubes humains et explants de moelle épinière de Rat.

La coculture classique consiste à innover des myotubes — obtenus après fusion de cellules musculaires satellites humaines de primo-explantation — par des tranches de moelle épinière d'embryons de Rat au treizième jour de gestation. Les moelles épinières sont disséquées de manière à leur conserver 1 ou 2 ganglions rachidiens dorsaux par explant. Les cellules musculaires sont cultivées dans des BP35 pendant quelques jours jusqu'à l'apparition des myotubes. Le milieu aneural classique est alors remplacé par un milieu dit d'innervation ou de coculture, composé de 68 % de MEM, de 25 % de milieu 199, de 5 % de SVF, et additionné de 10 µg/mL d'insuline et de 1 % d'antibiotiques. Les explants de moelle sont simplement déposés sur la couche de cellules musculaires, et très rapidement apparaissent des axones moteurs (neurites) qui entrent en contact avec les myotubes. Après 1 à 2 semaines, les fibres musculaires se contractent, des JNM se sont formées. Après 1 mois de coculture, les myotubes innervés arrivent à maturation et deviennent de véritables myofibres (Kobayashi *et al.*, 1987). Cette maturation s'exprime : (a) au plan morphologique par l'apparition de plaques motrices présentant des replis jonctionnels, par des striations transversales caractéristiques et des tubules T bien développés (Askanas et Gallez-Hawkins 1985 ; Braun *et al.*, 1992) ; (b) au

plan fonctionnel, par la concentration des RACH à la JNM et par la colocalisation de ces derniers avec l'acétylcholinestérase ; (c) au plan biochimique, par l'expression de certaines isoenzymes comme la créatine kinase, la lactate deshydrogénase, la phosphoglycérate mutase et la glycogène phosphatase dans leur forme adulte ; (d) et au plan histologique, par la tendance des myotubes à se différencier en fibres de type I ou II (Martinuzzi *et al.*, 1986 ; Martinuzzi *et al.*, 1988).

2122-Coculture myotubes humains/motoneurones de Rat purifiés.

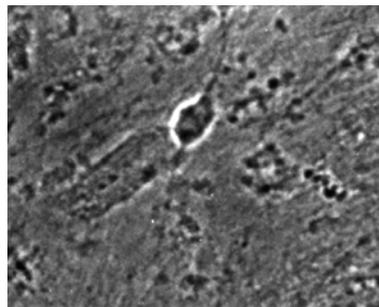
Dans la coculture classique, le versant nerveux est constitué d'explants de moelle épinière non dissociés qui contiennent différents types cellulaires dont il est difficile d'étudier le statut apoptotique par les méthodes classiques. Pour surmonter cette difficulté, nous avons ajouté des motoneurones purifiés sur des myotubes humains afin d'évaluer leur degré d'apoptose quand ils sont mis en contact de cellules musculaires malades et de le comparer au degré d'apoptose observé au contact de cellules témoins, et ce après que les cellules malades ont été transfectées ou non par un vecteur exprimant *SMN*.

Les motoneurones de Rat sont préparés, selon un protocole adapté d'une méthode préexistante (Martinou *et al.*, 1992), à partir d'embryons de Rat prélevés au quatorzième jour de gestation. Les racines ganglionnaires dorsales et les méninges sont enlevées, puis la moelle épinière est découpée en petits fragments qui sont transférés dans une BP60 contenant une solution isotonique de trypsine à 0,025 %, pendant 20 min à température ambiante. Ce traitement permet de digérer les tissus interstitiels. Après addition de milieu de Leibowitz (Gibco), les explants sont dissociés par aspirations et refoulements réitérés à travers une aiguille de 0,8 mm montée sur une seringue de 20 mL. La suspension est alors centrifugée à 700 x g à température ambiante pendant 10 min. Une deuxième dissociation mécanique selon la même méthode est alors réalisée, puis la culture est enrichie en motoneurones par une centrifugation à 180 x g à température ambiante pendant 10 min sur un coussin constitué d'une solution fraîchement préparée d'albumine de bœuf (*bovine serum albumin* [BSA]) (Sigma) à 3,5 % dans du milieu de Leibowitz. La centrifugation doit être ménagée, et, en particulier, ni les dispositifs de freinage, ni les dispositifs d'accélération rapide de la centrifugeuse ne doivent être utilisés. Cette première centrifugation permet de séparer grossièrement les différents types de cellulaires. Le culot de cellules dissociées est repris dans du milieu de Leibowitz et la préparation est centrifugée à 320 x g pendant 20 min sur un coussin d'Optiprep (densité 1,06 g/mL ; Nycomed Pharma AS, Oslo, Norvège) à température

ambiante en prenant les mêmes précautions de centrifugation. La phase supérieure, qui contient les motoneurones purifiés, est alors prélevée et centrifugée à 700 x g pendant 10 min à température ambiante. Enfin, le culot est repris dans 2 mL de milieu d'innervation et la suspension est déposée sur les cellules musculaires fusionnées.

FIGURE 2.2.

Motoneurones de Rat déposés sur une culture de cellules musculaires humaines.



Grossissement x100

22-Augmentation de l'expression de la protéine SMN dans des cellules musculaires satellites humaines de primo-explantation.

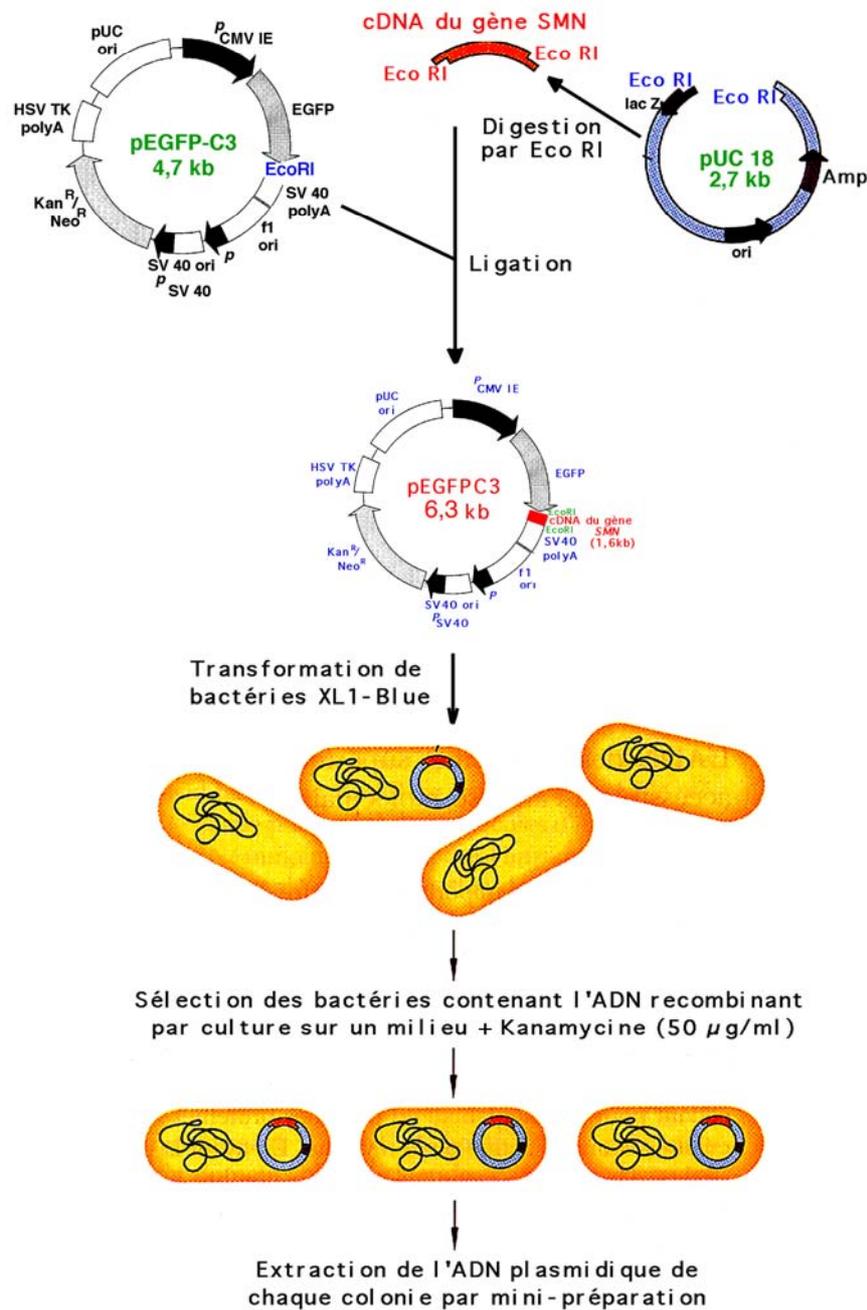
221-Construction du plasmide pEGFP-C3/SMN.

La première étape de notre travail a consisté à construire un plasmide contenant la séquence d'intérêt, le gène *SMN*, capable de s'exprimer dans des cellules eucaryotes et pouvant être facilement détecté une fois exprimé dans les cellules (Arnold *et al.*, 2002). Les différentes étapes conduisant à l'obtention de ce plasmide sont illustrées sur la figure 2.4.

2211-Le plasmide pEGFP-C3.

Le plasmide pEGFP-C3 (Clontech, Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France, N° d'accès à la banque de données U57607) (Figure 2.5) est un vecteur d'expression eucaryote de 4,7 kb qui possède la séquence de l'EGFP sous le contrôle du promoteur précoce du

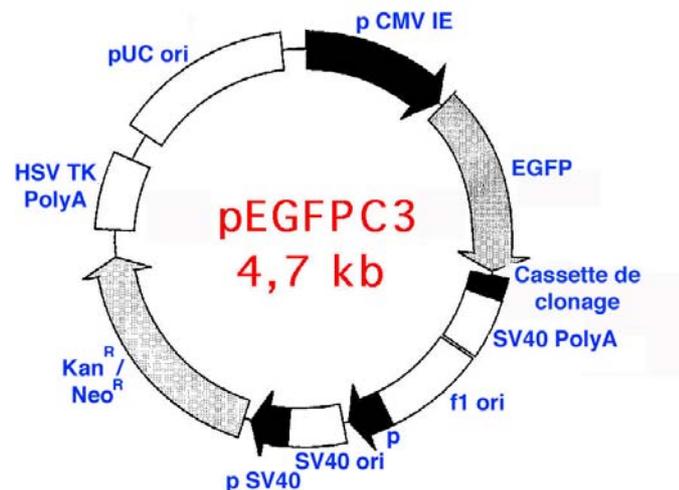
FIGURE 2.4.
Protocole de construction du plasmide pEGFP-C3/SMN.



cytomégalo virus [CMV]. Cette protéine code un variant de la forme sauvage de la GFP [pour *green fluorescent protein*] appelé GFPmut1 (Cormack *et al.*, 1996) qui contient une double substitution à hauteur des AA S64 → L et S65 → T. Ces substitutions en augmentent l'expression dans les cellules de Mammifères. La longueur d'onde d'excitation de l'EGFP est

de 488 nm, et elle émet à 507 nm. Le plasmide pEGFP-C3 porte également le gène de résistance à la kanamycine et de la résistance à la néomycine, contrôlés par le promoteur du SV40. Cette disposition permet de sélectionner les cellules exprimant le plasmide, soit dans un système procaryote soit dans un système eucaryote, respectivement. La cassette de clonage de ce plasmide est située en 3' de la séquence de l'EGFP. Les gènes clonés dans ce vecteur, s'ils sont dans le même cadre de lecture, sont exprimés sous forme d'une protéine de fusion à l'extrémité carboxyterminale de l'EGFP. Il n'existe aucun codon stop entre ces 2 séquences.

FIGURE 2.5.
Structure du plasmide pEGFP-C3.



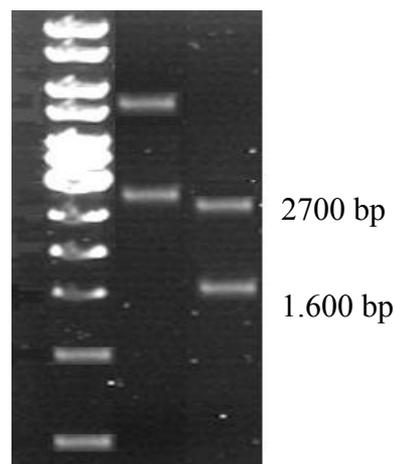
2212-Isolement de l'insert.

Nous disposions pour commencer du vecteur bactérien pUC18 ; le cDNA du gène *SMN* y était cloné dans le site de restriction EcoRI de la cassette de clonage. Baptisé pUC18/SMN, ce plasmide nous avait été aimablement donné par le Professeur Arnold Münnich (Hôpital Necker, Paris, France). En cette forme, il ne pouvait être utilisé pour nos expériences, puisqu'il ne dispose que d'une origine de réplication bactérienne et qu'il ne pouvait s'exprimer dans des cellules eucaryotes comme les cellules musculaires. Le plasmide pUC18/SMN nous a simplement servi à isoler l'insert correspondant au cDNA du gène *SMN*.

Pour ce faire, 5 μL de préparation de pUC18/SMN à 2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ sont digérés par 10 μL de solution d'enzyme de restriction EcoRI (Promega, Charbonnières, France) à 12 U/ μL . Cette enzyme coupe le DNA double brin à une séquence palindrome spécifique, la séquence

GAATTC. La réaction se pratique en présence de 4 μL de tampon de digestion concentré 10 x (Promega) et de 21 μL d'eau stérile. Le tube est mis au bain-marie à 37°C pendant 4 h puis la réaction est stoppée par une incubation de 10 min à 65°C qui a pour effet de dénaturer l'enzyme. Afin de récupérer le fragment de DNA correspondant à l'insert, le produit de digestion est soumis à une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % (NuSieve[®] 3 : 1, FMC BioProducts, Tebu) additionné de bromure d'éthidium (Sigma). Une préparation de marqueurs (Promega) est déposée sur le même gel. Elle permet de déterminer la taille des bandes de DNA obtenues car elle contient des polynucléotides de longueurs connues, allant de 500 pb à 10.000 pb. Deux bandes sont ainsi obtenues sur le gel : une bande de 2,7 kbp correspondant au vecteur pUC18, et une bande de 1,6 kbp correspondant à l'insert (Figure 2.6).

FIGURE 2.6.
Bandes obtenues sur gel d'agarose après digestion de pUC18/SMN par EcoRI.



Quand le gel est exposé aux rayons ultraviolets [UV], les 2 bandes sont bien visibles et il est donc possible de découper la bande correspondant à l'insert de 1,6 kb dans le gel d'agarose. Cette bande est alors traitée par les différentes solutions du kit Quantum Prep[®] Gel Slice (Biorad, Ivry-sur Seine, France) ; on en récupère ainsi le DNA. Les préparations obtenues contiennent 34,2 ng d'insert par μL .

2213-Déphosphorylation du vecteur.

Le plasmide pEGFP-C3 est circulaire. Pour le linéariser, on le digère par l'enzyme EcoRI. Cinq μL de préparation de pEGFP-C3 à $2,1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ sont mis en présence de $5 \mu\text{L}$ de solution d'EcoRI à $12 \text{ U}/\mu\text{L}$ (Promega), de $5 \mu\text{L}$ de tampon de digestion 10 fois concentré et de $35 \mu\text{L}$ d'eau stérile. Puis le mélange est traité comme dans le cas de la digestion du plasmide pUC18/SMN. Cette réaction permet non seulement de linéariser le plasmide, mais aussi de faire apparaître à ses extrémités le site spécifique monocaténaire et son complément GAATTC identiques à ceux que porte l'insert. (Les extrémités du plasmide et de l'insert peuvent se reconnaître car elles sont cohésives.) Pour éviter une recircularisation prématurée du plasmide, on le déphosphoryle. Pour cela, $50 \mu\text{L}$ du mélange de digestion sont mélangés à $3 \mu\text{L}$ de solution de *calf intestinal alkaline phosphatase* [CIAP] à $1 \text{ U}/\mu\text{L}$ (Promega) en présence de $10 \mu\text{L}$ de tampon CIAP 10 fois concentré (Promega) et de $37 \mu\text{L}$ d'eau stérile. On laisse la réaction se dérouler à 37°C pendant 4 h, puis on l'arrête par un chauffage de 20 min à 65°C . Le DNA est ensuite extrait par le phénol. A la fin de ce traitement, la préparation contient $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ de vecteur pEGFP-C3 déphosphorylé

2214-Ligation du cDNA du gène *SMN* avec pEGFP-C3.

L'insert et le vecteur ayant des extrémités cohésives, il est possible après qu'elles se sont reconnues, de les lier l'une à l'autre par une réaction de ligation. A cette fin, $2,9 \mu\text{L}$ de préparation d'insert à $34,2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ (environ 100 ng de DNA) et $1 \mu\text{L}$ de préparation de vecteur pEGFP-C3 linéarisé déphosphorylé à $100 \text{ ng}/\mu\text{L}$ sont mélangés à $1 \mu\text{L}$ de solution de ligase (fournie par le Dr Jean-Paul Behr, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France), de $2 \mu\text{L}$ de tampon de ligation et de $13,1 \mu\text{L}$ d'eau stérile. Les tubes sont laissés une nuit à $13-16^\circ\text{C}$.

Le produit de ligation peut être conservé à -20°C . Dix μL de ce dernier servent à transformer $100 \mu\text{L}$ de bactéries *E.coli* XL1 *Blue* compétentes (don du Dr Mireille Gaire, UMR 7034, Faculté de Pharmacie, Illkirch) dont le génotype est le suivant : *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F', *proAB*, *lac I^dZAM15*, *Tn10* (Tet^r)].

Le mélange des bactéries et du produit de ligation est laissé pendant 30 min sur de la glace, puis pendant 1 min 30 s à 42°C puis de nouveau pendant 5 min sur de la glace afin de soumettre les bactéries à un choc thermique. Ces dernières sont transvasées dans $800 \mu\text{L}$ de milieu de Luria-Bertani [LB] et laissées pendant 45 min sous agitation à 37°C . Cette étape permet d'amplifier le plasmide. Les bactéries sont alorsensemencées en boîte de Petri

contenant une agarose nutritive additionnée de 50 µg/mL de kanamycine. Seules les bactéries effectivement transformées, — exprimant par conséquent le gène de résistance à la kanamycine codé par le plasmide —, croissent sur un tel milieu. Les BP sont incubées à 37°C pendant 24 h. Chaque colonie correspond à un clone unique de bactéries et ne porte qu'un seul type de plasmide.

2215-Orientation de l'insert dans le vecteur.

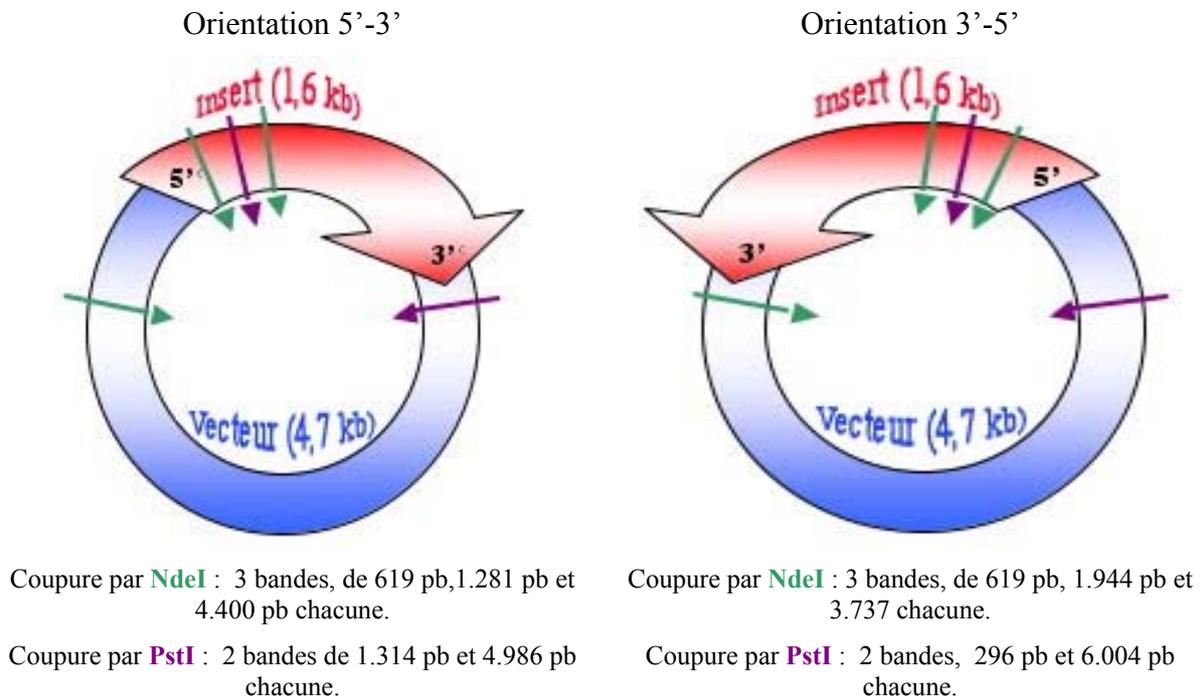
Les 2 acteurs de la ligation possèdent chacun à leur extrémité le site de restriction EcoRI. Trois événements peuvent se produire au cours de la réaction de ligation : (a) le vecteur se recircularise sans l'insert ; (b) l'insert vient se placer dans le sens 3' → 5' dans le vecteur et le cadre de lecture n'est pas conservé ; (c) l'insert se place dans le sens 5' → 3' et dans ce cas, le cadre de lecture est conservé.

A partir des séquences nucléotidiques d'intérêt, que l'on peut connaître en consultant le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query>, le logiciel *DNA Strider* permet d'obtenir tous les sites de restriction présents dans l'insert (N° d'accès ncbi : U18423) et dans le vecteur (N° d'accès ncbi : U57607). En utilisant ces outils, nous avons pu repérer des sites spécifiques de restriction de diverses enzymes, présents à la fois dans l'insert et dans le vecteur ; leur coupure engendre des fragments de DNA de tailles différentes et prédictibles en fonction de l'orientation de l'insert dans le vecteur (Figure 2.8) ; ces fragments peuvent être visualisés après électrophorèse en gel d'agarose. Les 2 enzymes choisies pour cette étude sont Nde I et Pst I.

Pour connaître l'orientation de l'insert dans le vecteur, le DNA plasmidique de chaque colonie obtenue sur la gélose a été extrait. A cette fin, on a réalisé des mini-préparations de DNA par lyse alcaline des bactéries au moyen du kit Quantum Prep® Plasmid Miniprep (Biorad). Une partie de chaque colonie est diluée dans 2 mL de milieu LB et laissée sous agitation toute la nuit à 37°C. La culture est centrifugée et les cellules sont traitées selon le protocole fourni par le fabricant du kit. Cinq µL de préparation de DNA de chaque colonie sont digérés par 1 µL de chaque solution d'enzyme à 10 U/µL (Promega) en présence de 2 µL de tampon de digestion 10 fois concentré et de 12 µL d'eau stérile. La taille des fragments obtenus est visualisée après une électrophorèse en gel d'agarose à 0,8 % comme il est décrit ci-dessus.

FIGURE 2.8.

Taille des bandes obtenues après digestion du plasmide pEGFP-C3/SMN par *NdeI* et *PstI* en fonction de l'orientation de l'insert.



2216-Maxi-préparation du plasmide pEGFP-C3/SMN.

Après qu'un clone ayant intégré l'insert dans la bonne orientation a été repéré, le DNA qu'il contient est amplifié à l'aide du kit EndoFree Plasmid Maxi kit® (Qiagen, Courtabœuf, France). Ce kit permet d'obtenir des préparations purifiées de DNA dépourvues d'endotoxines, et dont l'efficacité de transfection dans les cellules eucaryotes sensibles se trouve ainsi augmentée. Les endotoxines sont des lipopolysaccharides [LPS] composant la membrane des bactéries Gram négatives comme *E.coli*. Au moment de la lyse bactérienne réalisée dans les premières étapes de la maxi-préparation, du LPS est libérées dans le lysat. La structure chimique et la tendance du LPS à former des micelles font qu'il copurifie avec les plasmides de DNA. Le kit Qiagen EndoFree ajoute une étape aux étapes des méthodes classiques et cette étape supplémentaire empêche les molécules de LPS de se lier à la résine utilisée pour adsorber puis éluer le DNA.

Afin d'obtenir un meilleur rendement de purification, il est recommandé de commencer le protocole de maxi-préparation par la préculture d'une colonie dans 2 mL de milieu LB ; la colonie est prélevée sur une gélose fraîchement ensemencée — il faut en effet

éviter de commencer l'opération en utilisant des bactéries qui viennent juste d'être décongelées —. La préculture est laissée à 37°C, sous agitation, pendant une nuit, ensuite et dans les mêmes conditions, pendant 8 h dans du milieu LB contenant 50 µg/mL de kanamycine (milieu sélectif). Elle est diluée au 1/500 dans 100 mL de milieu LB sélectif, puis laissée à 37°C, sous agitation, pendant 12 à 16 h avant d'être centrifugée à 6.000 x g pendant 15 min à 4°C. Le culot bactérien est traité selon dans les conditions décrites par le fabricant du kit Quiagen EndoFree.

Une fois le DNA récupéré, il faut en vérifier la pureté et en estimer la concentration. On mesure la densité optique [DO] de la solution de DNA entre 220 et 320 nm. L'allure du spectre d'absorption fournit une première indication sur la composition de la solution. L'on calcule alors le rapport 260nm/DO 280nm : il doit être compris entre 1,8 et 2 pour que la préparation soit considérée comme pure. S'il est inférieur à 1,8, la solution est contaminée par du RNA, et s'il est supérieur à 2, la solution contient des protéines. Une unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg de DNA/mL. Un calcul simple permet donc d'obtenir la concentration en DNA de la solution obtenue.

2217-Microscopie de fluorescence et confocale.

Si le plasmide est fonctionnel, les cellules transfectées expriment l'EGFP et apparaissent en vert fluorescent quand la GFP est excitée à la bonne longueur d'onde. Pour vérifier qu'il en est bien ainsi, des cellules musculaires humaines en culture primaire ont été transfectées par le plasmide pEGFP-C3/SMN. Le lendemain, les préparations sont rincées 3 fois avec du PBS, puis elle sont fixées avec une solution de PFA à 4 % dans du PBS , pendant 20 min à 4°C. Après 3 rinçages au PBS, une goutte d'un mélange glycérol/PBS est déposée sur la couche cellulaire et une lamelle est déposée sur la BP35. Les cellules sont observées au microscope de fluorescence équipé des filtres adéquats.

Pour l'observation au microscope confocal, les cellules sont cultivées en BP35 sur le fond desquelles est déposée une lamelle de verre. Les boîtes sont revêtues d'une solution de collagène à 1 mg/mL dilué au 1/100 dans du HBSS- afin de faciliter l'adhérence des cellules musculaires à la lamelle de verre préalablement déposée. Les autres conditions de culture et de fixation sont strictement identiques à celles qui prévalent pour l'observation au microscope de fluorescence. Après fixation, la lamelle de verre est prélevée et déposée par sa face cultivée sur une lame porte-objet dans une goutte de mélange glycérol/PBS. Les préparations sont observées au microscope confocal inversé (Eclipse TE300, Nikon, Tokyo, Japon) couplé à un

système confocal de laser scanning MRC-1024 (Bio-Rad) en utilisant un objectif d'épifluorescence à immersion 40 x (n.a.1.4, Nikon). La GFP est excitée à 488 nm avec un laser Kr-Ar et la fluorescence cellulaire est observée à 522 nm.

222-Choix de l'agent de transfection.

Nous avons évalué la capacité de 3 vecteurs synthétiques à introduire le plasmide pEGFP-C3/SMN dans les cellules musculaires satellites humaines, afin de déterminer lequel des 3 était le plus efficace en transfection, tout en étant le moins cytotoxique. Nous avons choisi l'ExGen 500 (aimablement fourni par le Dr Jean-Paul Behr), le FuGENE 6 (Roche, Meylan, France) et l'Effectene (Qiagen). Les expériences de transfection sont réalisées en plaques à 6 puits, préalablement revêtues d'une solution aqueuse de gélatine à 0,1 %, et ensemencées la veille de l'expérience à raison de 10^5 cellules par puits. Pour chaque condition expérimentale, différentes quantités de DNA sont utilisées (0,5 µg, 1 µg, 2 µg et 4 µg/puits) et le volume adéquat de vecteur à rajouter est calculé de façon à obtenir le rapport DNA/vecteur aux valeurs désirées. Les volumes indiqués sont ceux que l'on utilise pour traiter une BP35. Les expériences ont été réalisées systématiquement en triple. Les volumes utilisés pour chacun des vecteurs sont donnés en ANNEXE.

2221-Formation des complexes de transfection.

(1) FuGENE 6.

On dispose de très peu d'informations sur ce vecteur de transfection, tant sur sa composition que sur son mécanisme d'action. Le FuGENE 6 est constitué d'un mélange de lipides cationiques et d'autres composants ; il est fourni en solution dans 80 % d'éthanol. En dépit de nos demandes réitérées, nous n'avons pu obtenir plus de renseignements sur ce produit auprès du fournisseur, c'est pourquoi sa description s'arrête prématurément.

Le FuGENE 6 est utilisé à raison de 2 µL, 3 µL, 4 µL, 5 µL ou 6 µL par puits, en combinaison avec différentes quantités de DNA. Selon les recommandations du fabricant, seuls les rapports pour lesquels le volume de FuGENE 6, exprimé en µL, est supérieur à la quantité de DNA, exprimé en µg, ont été étudiés.

Nous avons utilisé le protocole suivant. Dans un tube Eppendorf stérile, le volume de FuGENE 6 requis est dilué dans du milieu F14 à un volume final de 100 µL. Le tube est laissé

5 min à température ambiante. Le volume adéquat de DNA est versé au fond d'un autre tube Eppendorf stérile. La solution de FuGENE 6 en milieu F14 est alors ajoutée goutte à goutte à la préparation de DNA, puis le tube est laissé 15 min à température ambiante. Les complexes sont enfin ajoutés, goutte à goutte et directement, au milieu de culture. Avec cet agent de transfection, il n'est pas nécessaire de changer le milieu de culture avant de mesurer l'expression des protéines d'intérêt.

(2) Effectene.

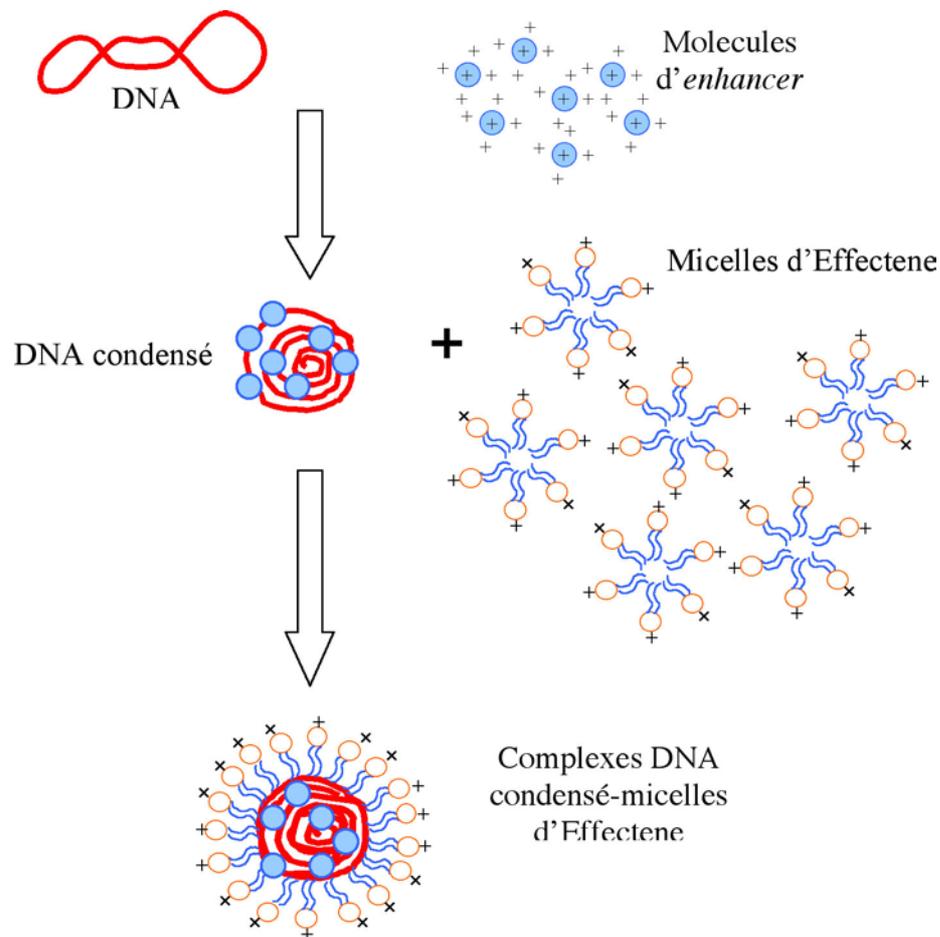
L'Effectene est un mélange de lipides cationiques non liposomiques. Il est utilisé en conjonction avec un *enhancer* et un tampon de condensation du DNA. Cet agent forme spontanément des micelles avec le DNA (Figure 2.9).

Pour les transfections faisant appel à l'Effectene, le DNA est dilué dans du tampon de condensation dans un volume final de 100 μ L. Après addition de l'*enhancer*, le tube est brièvement agité au vortex et abandonné à température ambiante pendant 5 min. Puis le volume requis d'Effectene est versé dans le même tube. Après incubation de 10 min, les complexes sont directement ajoutés au milieu de culture cellulaire. Les cultures sont placées à 37°C dans un incubateur à air (95 %)-CO₂ (5 %) humidifié, pendant 12 à 16 h, après quoi le milieu est changé. La révélation de l'expression de la protéine se fait 24 h après.

(3) ExGen 500.

L'Exgen 500 est le nom commercial du polyéthylèneimine (PEI). Il s'agit d'un polymère cationique composé d'unités linéaires $\text{CH}_3\text{-NH-(CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH)}_n\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$ d'une MM de 22 kD. Il est généralement utilisé à la concentration de 10 mmol/l d'atomes d'azote. Les polymères formés avec l'ExGen 500 pénètrent dans la cellule par un processus spontané d'endocytose ; il en résulte une forte accumulation de PEI dans l'endosome. A l'intérieur de la cellule, le pouvoir tampon du PEI, lequel est fortement protonisable, retarde l'action des nucléases lysosomiques et perturbe l'osmolarité des vésicules. L'accumulation

FIGURE 2.9.
Mécanisme d'action de l'Effectene.



massive de protons couplés aux ions Cl^- engendre une augmentation importante de la concentration ionique du contenu endosomique ; il en résulte un gonflement du polymère par répulsion interne des charges et une entrée d'eau par osmose. Ce polymère se comporte comme une véritable éponge à protons, capable d'empêcher la dégradation du DNA (Figure 2.10) (Behr, 1997).

L'unité utilisée pour l'emploi de l'ExGen 500: est l'équivalent [Eq.]. L'Eq. correspond au nombre de moles d'azote du vecteur par mole de phosphate du DNA.

Le protocole de formation des complexes DNA/ExGen 500 est illustré dans la Figure 2.11.

Les boîtes sont laissées pendant 4 h à 37°C en incubateur à air (95 %)-CO₂ (5 %) humidifié, avant que l'on n'en change le milieu. L'expression protéique est étudiée le lendemain.

FIGURE 2.10.
Mécanisme d'action de l'ExGen 500. (D'après Behr, 1997.)

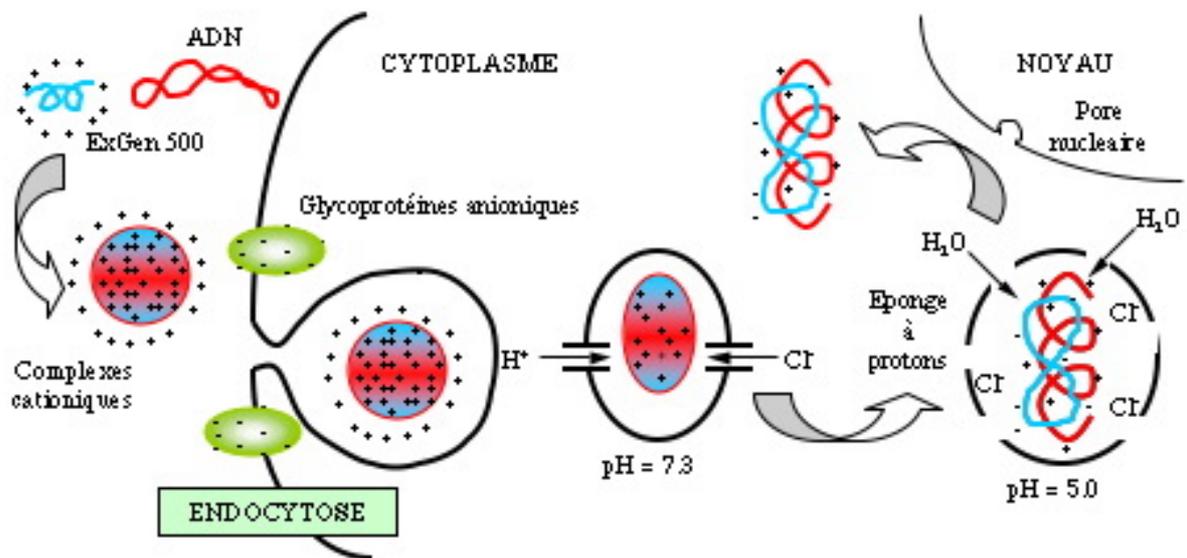
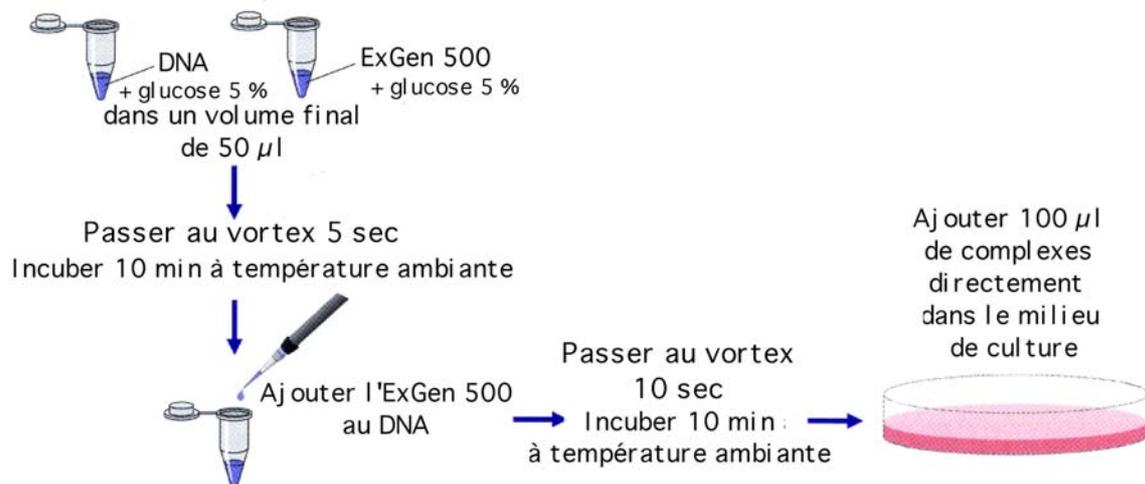


FIGURE 2.11.
Protocole de formation des complexes entre le DNA et l'ExGen 500.



2222-Estimation de la taille des complexes formés.

(1) Diffusion quasi-élastique de la lumière.

Le principe de la diffusion quasi-élastique de la lumière, ou *quasi-elastic light scattering* [QUELS] est fondé sur la mesure de l'angle de dispersion de la lumière par une particule, mesure qui sert à mesurer la taille par un calcul utilisant la transformée de Fourier. L'appareil utilisé est un Zetamasters 3.

Pour estimer la taille des complexes formés entre le plasmide et les différents vecteurs de transfection, des complexes de transfection ont été préparés comme pour une transfection classique, à différents rapports de concentrations de DNA et de vecteur, et ils ont été analysés par QUELS. L'appareil établit une moyenne de la taille des complexes analysés, exprimée en nm. La mesure a été réalisée dans le laboratoire du Dr Jean-Paul Behr par le Dr. Patrick Erbacher.

(2) Microscopie électronique.

Les complexes préparés pour l'analyse par QUELS ont été utilisés pour l'observation en microscopie électronique. Une goutte de complexe est déposée sur une grille porte-objet préalablement enduite d'un film continu de formvar. Au bout d'1 min, l'excès de liquide est absorbé avec une pointe de papier-filtre et les complexes sont colorés négativement avec une solution aqueuse d'acide phosphotungstique à 1 %, ajustée à pH 6,5. Les grilles sont observées avec un microscope électronique Philips EM 410 à 40 kV au grossissement x 16.400. Ces observations ont été réalisées dans notre laboratoire par le Dr. Vincent Laporte.

2223-Estimation de l'efficacité de transfection par FACS.

L'efficacité de transfection est estimée à l'aide du FACS. Une surpression de l'ordre du bar exercée sur l'échantillon permet aux cellules de progresser vers le centre d'une veine liquide d'entraînement soumise à une pression à peu près identique. Ce système de 2 flux laminaires positionne les cellules avec précision les unes derrière les autres lors de leur interception par le faisceau de lumière excitatrice, généralement émise par un laser. Les cellules émettent divers signaux optiques guidés par des miroirs et des filtres vers des photomultiplicateurs. Pour séparer physiquement les cellules, la veine liquide conductrice est

fractionnée en gouttelettes chargées différemment selon la sous-population à isoler ; ces gouttelettes sont déviées de leur trajectoire lorsqu'elles passent dans un champ électrique et elles sont recueillies dans des récipients différents. La vitesse de passage des cellules est de l'ordre de 3.00 à 5.000/s.

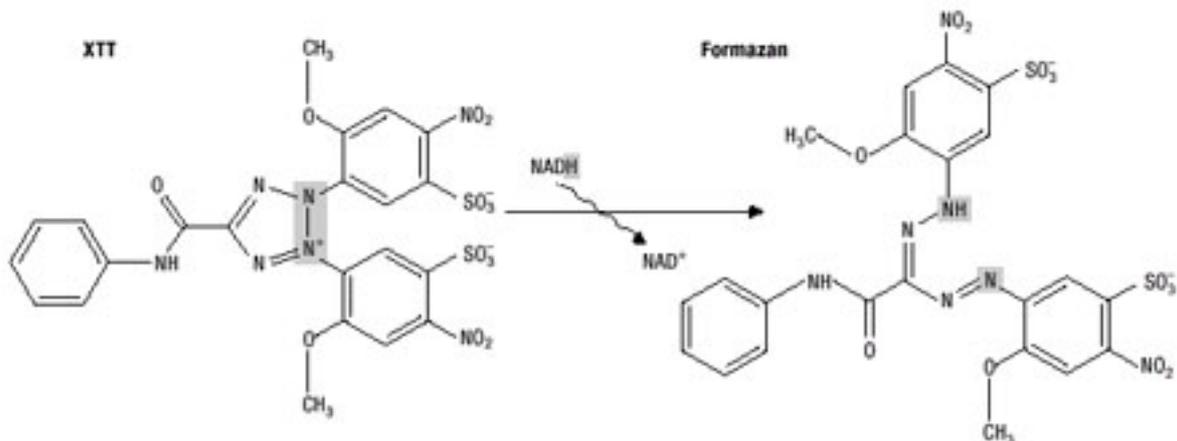
La cytométrie de flux se distingue des autres techniques analytiques par 5 caractéristiques essentielles : (a) l'analyse quantitative, (b) la sensibilité de détection, (c) la rapidité, (d) l'analyse multiparamétrique de chaque cellule, et (e) le tri. Contrairement au microscope, elle fournit peu de données morphologiques précises, mais elle permet en revanche d'analyser individuellement les cellules, avec précision et à une très grande vitesse.

En pratique, le lendemain de la transfection, les cellules sont dissociées par une solution isotonique stérile de trypsine à 0,025 %, leur suspension est centrifugée à 250 x g pendant 10 min et le culot est repris dans une solution de fixation appelée CellFIX (Becton Dickinson, Le Pont de Claix) qui permet de conserver les cellules en suspension à 4°C pendant un laps de temps suffisant pour réaliser l'analyse. Des cellules non transfectées servent de témoin. Elles permettent de définir la fenêtre des cellules ayant la taille adéquate et d'éliminer ainsi de l'analyse tous les débris cellulaires et éventuellement d'autres types cellulaires à la taille différente. Dans ces conditions, toutes les cellules et même les débris de l'échantillon apparaissent sur l'écran, mais l'appareil ne prend en compte que les cellules qui entrent dans la fenêtre pré-définie. Ce témoin permet aussi d'apprécier l'autofluorescence spécifique des cellules, autofluorescence qu'il faut déduire de la valeur de fluorescence totale pour déterminer celle qui est imputable à l'EGFP. Les échantillons à analyser sont triés et le pourcentage de cellules fluorescentes qu'ils contiennent est directement calculé par l'appareil. Ce pourcentage est reflet direct de l'efficacité de transfection puisqu'il représente la proportion de cellules qui, dans l'échantillon, expriment le gène de l'EGFP introduit par le plasmide.

2224-Estimation de la cytotoxicité des complexes par la méthode au XTT.

On estime la cytotoxicité des complexes au moyen d'une épreuve colorimétrique qui fait appel au 2,3-bis(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfopényl)2H-tétrazolium-5-carboxyanilide [XTT]. Dans les cellules vivantes, le XTT est réduit en un composé orange— soluble dans l'eau et appartenant à la série des formazans — par les déshydrogénases mitochondriales. La DO de la solution de ce formazan dans un puits donné est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes (Figure 2.11).

FIGURE 2.11.
Réduction du XTT en formazan.



Pour l'épreuve au XTT, les cellules sont ensemencées en plaques de 96 puits à raison de 3.300 cellules par puits. La mesure de la viabilité est pratiquée parallèlement aux transfections en plaques de 6 puits, et 1/30 du volume de complexe utilisé dans ces dernières est ajouté à chaque puits des premières. (Les différents volumes de réactifs utilisés sont indiqués en ANNEXE). Les cellules ensemencées dans les puits situés à la périphérie de la plaque ne sont pas transfectées ; elles servent de témoins du 100 % de viabilité. Vingt-quatre h après l'exposition des cellules aux complexes de transfection, le milieu de culture est remplacé par un milieu dépourvu de SVF et de rouge de phénol car ces 2 substances interfèrent dans la réaction de transformation du XTT. Le mélange réactionnel est préparé extemporanément. Il est constitué d'une solution de XTT à 1,53 mg/mL dans du MEM dépourvu de rouge de phénol et d'une solution de méthosulfate de phénazine [PMS] à 1 mg/ml dans du PBS. On mélange 200 volumes de solution de XTT à 1 volume de solution de PMS. Puis 50 μ L de ce mélange sont ajoutés à chaque puits et la plaque est laissée à l'étuve pendant 4 h. La cytotoxicité est mesurée par simple lecture de la DO du milieu de culture à 450 nm sur un lecteur de plaques de 96 puits. Puis la DO de chaque puits est rapportée à la DO du milieu de culture des puits témoins. On en déduit le pourcentage de cellules vivantes pour chaque condition de transfection.

2225-Effet du sérum sur la transfection.

Dans les systèmes de culture cellulaire, les transfections non-virales sont généralement pratiquées dans des milieux dépourvus de sérum afin d'éliminer l'effet inhibiteur qu'exercent

certaines molécules sériques sur l'ingestion des complexes. Cependant, cette privation peut avoir un effet toxique pour les cellules. Nous avons étudié l'effet de la présence du sérum sur l'efficacité des divers agents de transfection pour un rapport de concentration vecteur/DNA donné. Les myoblastes sont transfectés par 2 μg de DNA combinés soit à 5 μL de FuGENE 6, soit à 20 μL d'Effectene, soit à 12,5 Eq. d'Exgen 500, dans un milieu de culture dépourvu de sérum ou en contenant 10 % ou 5 %. Le lendemain, les cellules sont fixées par une solution de PFA à 4 % dans du PBS puis elles sont observées au microscope à fluorescence. L'efficacité de transfection est estimée par le rapport du nombre de cellules fluorescentes au nombre total de cellules observées dans le champ. Les expériences sont faites 3 fois et l'on a compté 10 champs. Le choix de l'observation au microscope à fluorescence plutôt que le dénombrement des cellules fluorescentes au FACS est délibéré ; il permet en effet de comparer l'aspect des cellules transfectées à celui des cellules témoins.

2226-Sélection des cellules transfectées au moyen du G418.

Le taux de transfection n'est pas suffisant pour passer directement à l'étape d'innervation des cellules transfectées. Il faut enrichir la culture en cellules exprimant la protéine SMN. A cette fin, on utilise le gène de résistance à la néomycine porté par le plasmide pEGFP-C3/SMN. Quarante huit heures après la transfection, le milieu de culture est additionné de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418 (ou généticine) qui est un analogue de la néomycine. Dans de telles conditions, seules les cellules hébergeant le plasmide survivent. La durée de cette phase dépend de l'efficacité de sélection du G418 — qui varie d'une expérience à l'autre, pour des raisons contingentes que nous n'avons pas cherché à élucider dans le détail ; on note simplement que l'efficacité de sélection varie avec les donneurs — et de l'efficacité de transfection de départ. A l'issue de cette phase, la culture ne contient que ces cellules exprimant SMN ; on les subcultive comme des cellules normales.

23-Effet de l'augmentation d'expression de SMN dans les cellules musculaires.

231-Observation de la dégénérescence des cocultures.

Les cocultures nerf-muscle réalisées à partir de myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites de patients souffrant de SMA I dégèrent normalement au bout de 1 à 3 semaines (cf SECTION 1.4. du CHAPITRE 1). On a donc réalisé des cocultures avec des myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites de patients souffrant de SMA I après qu'elles ont été transfectées avec le plasmide pEGFP-C3/SMN puis sélectionnées au G418, et l'on a observé leur comportement au microscope à contraste de phase à intervalles réguliers afin de déterminer si l'expression de SMN retardait l'apparition de la dégénérescence ou en inhibait la survenue.

232-Etude de l'apoptose.

Séverine Guettier-Sigrist avait montré au laboratoire que des motoneurones d'embryon de Rat meurent par apoptose 24 h après qu'ils ont été mis au contact de myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites de sujets atteints de SMA I. Les mêmes expériences ont été refaites avec des myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites de patients souffrant de SMA I après qu'elles ont été transfectées avec le plasmide pEGFP-C3/SMN puis sélectionnées au G418 et des motoneurones purifiés d'embryon de Rat.

2321-Coloration des noyaux par le colorant de Hoechst 33.258.

Le colorant de Hoechst 33.258 ou bis-benzimide est un agent fluorescent qui s'intercale entre les bases A et T du DNA. La longueur d'onde optimale d'excitation du complexe est de 346 nm ; ce dernier émet à 460 nm.

Pour colorer les noyaux des cellules, ces dernières sontensemencées à raison de 5.10^5 dans des BP35, et que l'on a pré-revêtues par une solution aqueuse de gélatine 0,1 %. Les cellules sont cultivées dans du milieu d'innervation pour favoriser leur fusion en myotubes; on dépose sur ces derniers, 5 jours après l'ensemencement, 2.000 motoneurones purifiés d'embryon de Rat. Le lendemain, les cocultures sont rincées 3 fois au PBS, elles sont fixées par une solution de PFA à 4% dans du PBS, pendant 20 min, rincées à nouveau 3 fois au PBS.

On y dépose alors la solution de colorant, préparée extemporanément à partir d'une solution-mère à 1 mg/mL dans du PBS que l'on dilue au 1/500 dans le même tampon ; on la laisse 5 min au contact des cellules, à l'obscurité ; on rince 2 fois au PBS, après quoi une goutte de glycérol/PBS est déposée sur la culture et l'on recouvre le fond de la boîte avec une lamelle de verre. Les préparations sont observées au microscope à fluorescence équipé d'un filtre adéquat.

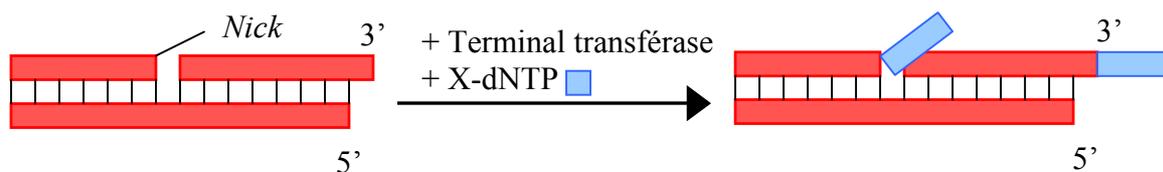
2322-Marquage des fragments de DNA par la méthode du *TdT-mediated dUTP nick end labelling*.

(1) Principe.

Lors de l'apoptose, la fragmentation du noyau s'accompagne d'importants dommages de la chromatine et d'un clivage du DNA en petits fragments dont la taille variable est conditionnée par l'activation d'une endonucléase endogène dépendante des ions calcium. Cette endonucléolyse est un élément majeur de l'apoptose C'est sur ce phénomène qu'est fondée la technique décrite dans le PARAGRAPHE (2) de la présente SECTION.

L'endonucléolyse génomique engendre en effet des coupures [en anglais, *nick*] qui donnent naissance à des fragments de DNA mono- et bicaténaires dont l'extrémité 3' est libre. Ces extrémités servent de cible à une enzyme cellulaire appelée la désoxynucléotidyltransférase terminale [TdT] qui lie des nucléotides à l'extrémité 3' libre des DNA. La méthode dite TUNEL [*TdT-mediated dUTP nick end labelling*] exploite cette réaction en faisant ajouter préférentiellement du dUTP à l'extrémité 3' des fragments de DNA apoptotiques (Figure 2.12).

FIGURE 2.12.
Principe de la méthode du TUNEL.



(2) Protocole.

Les fragments de DNA sont marqués par de la dUTP conjuguée à de la fluorescéine. Ce marqueur est directement détecté en microscopie de fluorescence après la réaction du TUNEL (Sgonc *et al.* ; 1994). A cette fin, les préparations de myotubes humains sur lesquels sont déposés les motoneurones purifiés de Rat sont rincées 3 fois au PBS ; elles sont fixées à l'aide d'une solution de PFA à 4 % dans du PBS. Elles sont placées sur de la glace, et les cellules qui les composent sont alors perméabilisées par une solution de triton X 100 à 0,1 % dans du PBS qu'on laisse agir pendant 2 min. Après un rinçage au PBS, les boîtes sont traitées par le mélange TUNEL (Roche), contenant le TdT et la dUTP-fluorescéine, pendant 1 h à 37°C. Après un nouveau rinçage au PBS et montage dans un mélange de glycérol/PBS recouvert d'une lamelle, les boîtes sont observées au microscope à fluorescence.

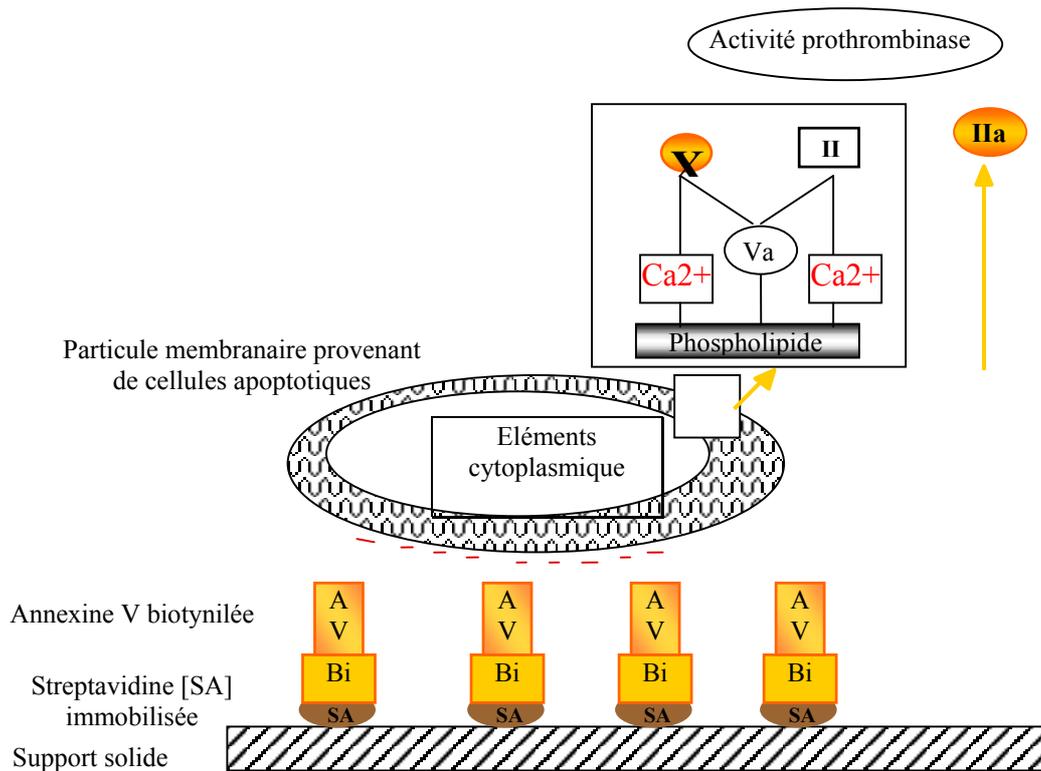
2323-Marquage par la méthode à l'annexine V.

(1) Principe.

Tout au début de l'apoptose, il se produit une redistribution des phospholipides entre les 2 feuillets de la membrane plasmique : la phosphatidylsérine [PS] y est transloquée du feuillet interne au feuillet externe, et la cellule libère des microvésicules ou particules apoptotiques limitées par cette membrane remaniée. La PS, exposée à la surface de la cellule et à celle des particules apoptotiques, peut fixer l'annexine V. Celle-ci, en effet, se lie aux phospholipides en général et préférentiellement à la PS. La liaison est dépendante du calcium. L'annexine V est utilisée comme sonde pour évaluer le degré d'exposition de la PS à la face externe de la membrane plasmique et à celle des vésicules. On apprécie le degré d'apoptose atteint par les cellules de la préparation par la quantité d'annexine V fixée.

Il a été mis au point, à la Faculté de Médecine de Strasbourg, un système spécifique de capture de microparticules membranaires, fondé sur ce principe (Aupeix *et al.*, 1998). C'est en collaboration avec les membres de cette équipe que nous avons réalisé ces expériences. La méthode utilise 3 propriétés de la PS ou des cellules apoptotiques : (a) la tendance de la PS à s'accumuler préférentiellement dans le feuillet externe de la double couche lipidique de ces cellules ; (b) la capacité de la PS à lier l'annexine V ; et (c) la capacité de la PS à promouvoir l'activation de la prothrombine en thrombine selon un processus très complexe.

FIGURE 2.12.
Capture de microparticules apoptotiques par la méthode de l'annexine V.



L'annexine V biotynilée est d'abord immobilisée sur une microplaque revêtue de streptavidine. L'affinité de la PS pour l'annexine V permet de capturer les microparticules. Après la capture, la quantification des microparticules relarguées fait appel à l'activation de la prothrombine en thrombine par la PS. La concentration en PS est le facteur limitant de cette réaction (Figure 2.12). Grâce à ce système, il est possible de quantifier l'apoptose totale (cellules musculaires et cellules nerveuses).

(2) Mode opératoire (Guettier-Sigrist *et al.*, 2002).

Les réactifs nécessaires ainsi que leur origine sont décrits dans la publication citée en référence dans le titre de ce PARAGRAPHE.

Le milieu de culture à étudier est clarifié par centrifugation pendant 10 min à 600 x g.

L'annexine V biotynilée est déposée dans des microplaques de 96 puits pré-revêtues de streptavidine ; pendant 30 min à température ambiante. Cent µL de milieu de culture clarifié sont ajoutés à chaque puits ; on laisse réagir pendant 2 h à 37°C. Le contenu en

phospholipides anioniques est déterminé par la mesure de l'activité prothrombinase laquelle dépend de la quantité de PS présente dans la préparation. La prothrombinase transforme la prothrombine en thrombine. C'est donc l'activité de cette enzyme que l'on mesure *in fine*. Après incubation de 2 h à 37°C, le chromozyme TH, un substrat chromogénique de la thrombine, est ajouté et la densité optique du produit coloré formé est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque équipé du logiciel adéquat. Les résultats sont exprimés en nmol/L d'Eq. de PS. A cette fin, on se rapporte à une courbe standard réalisée en utilisant des vésicules phospholipidiques de composition connue en PS pour mesurer l'activité prothrombinase.

24-Défauts fonctionnels des cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA et des myotubes formés par fusion de ces dernières.

Dans cette étude nous nous proposons de confirmer le rôle des cellules musculaires dans la pathogénie des SMA. C'est pourquoi seules les cellules musculaires sont mises en jeu dans les expériences décrites ci-dessous, puisqu'il s'agit de mettre en évidence des défauts qui seraient propres à la composante musculaire de l'unité motrice.

241-Fusion des cellules musculaires satellites humaines.

Comme il est indiqué dans le PARAGRAPHE 2.1.1.4. de la présente SECTION, les cellules musculaires humaines en culture présentent la particularité de fusionner en myotubes quand elles sont confluentes ou qu'elles sont cultivées dans un milieu pauvre en sérum. Ce phénomène peut être quantifié par le calcul de l'indice de fusion. Celui-ci est défini par le pourcentage de noyaux de cellules myogènes présents dans des myotubes par rapport au nombre total de noyaux de cellules myogènes (myotubes et cellules musculaires satellites). Les cellules provenant de donneurs témoins ou de patients souffrant de SMA I, II ou III sontensemencées à J 0 (premier jour de l'expérience) dans une BP35, pré-revêtue par une solution aqueuse de gélatine 0,1 %, à raison de 10^5 cellules par boîte. Pour faciliter le dénombrement, les cellules sont colorées par les colorants de May-Grünwald et Giemsa. A partir de J 1 et pendant 6 jours, l'indice de fusion est calculé ; on observe 10 champs par boîte sur 3 boîtes à

l'aide d'un microscope à contraste de phase (grossissement x 400). Les champs sont choisis au hasard.

242-Induction de l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine par l'agrine.

L'un des phénomènes précoces de la formation de la JNM est l'agrégation des RACH induite par l'agrine neuronale, libérée dans la lame basale par la terminaison nerveuse. Cette agrégation peut être déclenchée de façon artificielle dans une culture de cellules musculaires par une solution d'agrine neuronale.

Les cellules musculaires sontensemencées dans des BP35, à raison de 10^5 cellules par boîte. Les conditions d'ensemencement et de fixation des cellules sont celles qui ont été décrites au PARAGRAPHE 2.2.1.6. du présent CHAPITRE.

Les cellules sont cultivées dans du milieu d'innervation, et placées à 37°C dans un incubateur à air (95 %)-CO₂ (5 %) humidifié, pendant 5 jours. On ajoute alors la solution d'agrine soluble au milieu de culture à la concentration finale de 2 nmol/L et les boîtes sont remises dans l'incubateur pour une période de 16 h, temps nécessaire à l'agrégation des RACH. Pour visualiser les agrégats, une solution d' α -bungarotoxine [α -Bgtx] couplée au Texas Red[®] (Lot 71B1, Molecular Probes, Interchim, Montluçon, France) est diluée dans le milieu de culture à la concentration finale de 40 nmol/L et laissée pendant 1 h au contact des cellules maintenues dans l'incubateur. Ces dernières sont ensuite fixées selon la méthode classique avant d'être observées au microscope confocal. Le Texas Red a une longueur d'onde optimale d'absorption de 598 nm et il émet à 613 nm.

243-Liaison spécifique de l' α -bungarotoxine aux récepteurs de l'acétylcholine des myotubes humains.

Pour quantifier les RACH exprimés par les cellules musculaires humaines en culture, que les cellules proviennent de sujets sains ou de patients atteints de SMA, on mesure la liaison spécifique de l'¹²⁵I α -Bgtx.

A cette fin, les cellules, suspendues dans du milieu d'innervation sontensemencées en plaque de 6 puits pré-revêtues par une solution aqueuse de gélatine à 0,1 % à raison de 10^5 cellules par puits.

Après 5 jours de culture, tous les puits sont additionnés d'¹²⁵I α -Bgtx à la concentration désirée (les concentrations utilisées vont de 0,25 nmol/L à 8 nmol/L). Une

rangée de puits est traitée en outre par de l' α -Bgtx froide à la concentration de 300 nmol/L. Ces puits permettront de déterminer la liaison non spécifique de l' α -Bgtx tandis que les puits qui n'ont pas reçu d' α -Bgtx froide permettent de mesurer la liaison totale de l' ^{125}I α -Bgtx. Le plan du traitement des plaques est donné en ANNEXE. Parallèlement à ces manipulations, 3 BP 35,ensemencées dans les mêmes conditions que les plaques de 6 puits, sont rincées 3 fois au PBS puis elles sont additionnées de 37 μL d'un tampon de lyse dont la composition est donnée en ANNEXE, pendant 10 min à 4°C. La couche cellulaire est grattée, et l'on collecte la totalité du contenu dans un tube Eppendorf que l'on abandonne pendant 30 min dans la glace avant de le centrifuger à 10.000 x g pendant 10 min. Le surnageant contient la fraction protéique solubilisée. On en dose le contenu en protéines par la technique de Bradford dont le protocole est donné en ANNEXE.

La liaison spécifique est obtenue par soustraction de la liaison non spécifique à la liaison totale exprimée en coups par min [cpm]. Le résultat final est exprimé en fmol de toxine spécifiquement liée par mg de protéines, en utilisant comme base de calcul la radioactivité spécifique de la préparation d' ^{125}I α -Bgtx. On peut alors tracer une courbe de saturation, et utiliser la représentation de Scatchard pour déterminer les constantes de liaison de la toxine radioactive aux RACH, à savoir le K_d qui reflète l'affinité, et le B_{max} qui permet de déterminer le nombre de sites de liaison présents. Pour tracer cette courbe, on utilise le logiciel GraphPad Prism4 (San Diego, CA, Etats Unis) qui fournit la meilleure représentation pour une expérience donnée et fournit directement les valeurs de K_d et de B_{max} .

3-RESULTATS ET DISCUSSIONS.

31-Construction du plasmide pEGFP-C3/SMN.

La seule séquence du gène *SMN* n'est pas suffisante pour transfecter des cellules en culture. Il est nécessaire d'y adjoindre d'autres éléments qui en permettent l'expression dans les cellules eucaryotes. C'est pourquoi le cDNA du gène *SMN* a été introduit dans le plasmide pEGFP-C3 qui possède tous les gènes indispensables à cette expression.

311-Etapes de la construction du plasmide.

3111-Séquençage du cDNA du gène *SMN*.

Le gène *SMN* introduit dans les cellules doit être normal. Pour s'assurer de son intégrité, son cDNA préparé à partir du plasmide pUC18/SMN a été séquencé dans le service de séquençage de l'Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (Dr.P.Hammann). Les résultats obtenus ont été comparés à la séquence publiée dans la littérature (N° d'accès à la banque de donnée : U18423) au moyen du logiciel DNA Strider 1.3.1 (Marque déposée par le CEA, Paris, France). Cette comparaison a permis de mettre en évidence 3 mutations : T609C, G1.254A et C1.255G qui n'ont aucune conséquence puisque la première est silencieuse, et les 2 autres sont situées dans une région non codante du gène, l'exon 8.

Cet insert peut donc être utilisé en l'état pour la construction du plasmide d'intérêt.

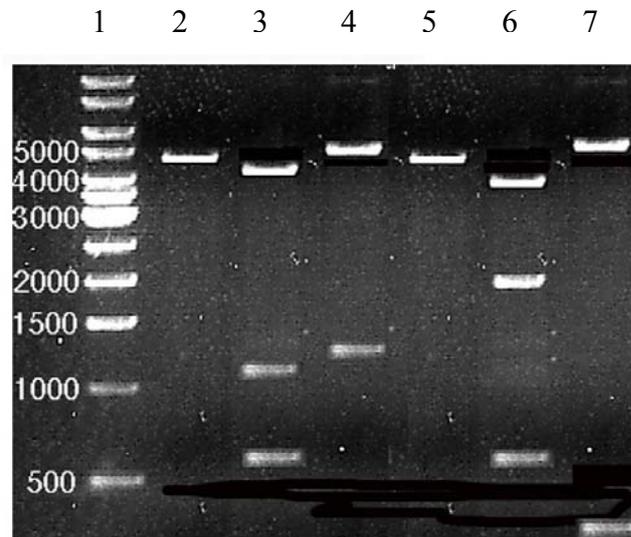
3112-Orientation de l'insert dans le vecteur.

Pour connaître l'orientation de l'insert dans le vecteur (3'-5' ou 5'-3'), des mini-préparations de DNA de chaque colonie obtenue consécutivement à la ligation ont été digérées par les enzymes de restriction Nde I et Pst I. Ces enzymes possèdent des sites spécifiques et dans l'insert et dans le vecteur ; elles engendrent des fragments de taille différente selon l'orientation de l'insert dans le vecteur. Les produits de ces digestions ont été analysés sur gel d'agarose à 0,8 % afin de déterminer la taille des bandes obtenues (Figure 3.1).

Dans la majorité des cas, le vecteur s'est refermé sur lui-même sans intégrer d'insert, et la bande obtenue a une taille de 4.700 pb (canaux 2 et 5 ; colonies a et c). Si l'insert est orienté dans le sens 5'-3', qui permet de conserver le bon cadre de lecture, la digestion par

FIGURE 3.1.

Analyse des produits de digestion par Nde I ou Pst I du DNA provenant de 4 colonies distinctes.



- Canal 1 : Marqueurs de masse moléculaires 1 kb (Promega).
 Canal 2 : Produits de digestion du DNA de la colonie a par Nde I.
 Canal 3 : Produits de digestion du DNA de la colonie b par Nde I.
 Canal 4 : Produits de digestion du DNA de la colonie b par Pst I
 Canal 5 : produits de digestion du DNA de la colonie c par Pst I.
 Canal 6 : produits de digestion du DNA de la colonie d par Nde I
 Canal 7 : Produits de digestion du DNA de la colonie d par Pst I.

Nde I engendre 3 bandes de 619 pb, 1281 pb et 4.400 pb (canal 3 ; colonie b) et la digestion par Pst I engendre 2 bandes de 1.314 pb et 4.986 pb (puits 4 ; colonie b). Quand l'insert n'est pas correctement orienté (canaux 5 à 7 correspondant respectivement aux produits de digestion par Nde I et Pst I ; colonie d), la taille des bandes est différente.

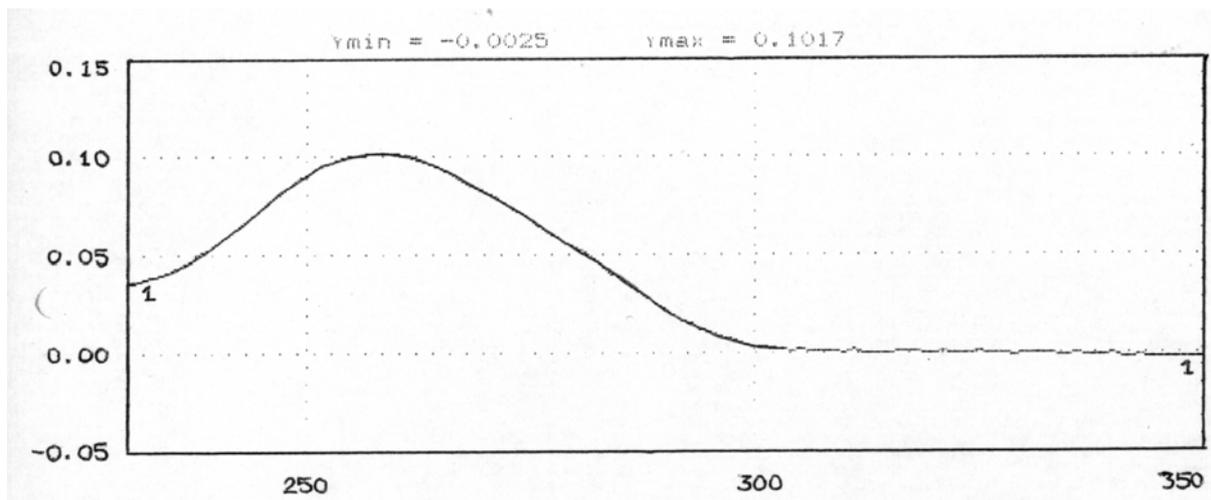
C'est donc le DNA de la colonie b que nous avons choisi d'amplifier puisqu'il correspond à la construction désirée, celle d'un plasmide pEGFP-C3 contenant le cDNA du gène *SMN* orienté dans le sens 5'-3'.

3113-Spectre d'absorption du plasmide.

Le DNA d'intérêt a été amplifié par la technique des maxi-préparations à l'aide du kit EndoFree Plasmid Maxi kit Qiagen, afin de constituer un stock suffisant pour toutes les expériences ultérieures. On a également déterminé le spectre d'absorption du DNA de cette préparation pour des radiations de longueur d'onde comprise entre 220 et 320 nm (Figure 3.2).

Les DO à 260 et 280 nm permettent de déterminer la concentration de la préparation et d'en déterminer la pureté. La DO à 260 nm est de 0,1018 et à 280 nm elle est de 0,0537. Le rapport DO260/DO280 est de 1,89. La préparation n'est donc pas contaminée. La DO260 permet de calculer la concentration de la préparation en DNA : elle est de 0,509 mg/mL.

FIGURE 3.2.
Spectre d'absorption du plasmide pEGFP-C3/SMN obtenu après maxi-préparation.



312-Validation de la construction.

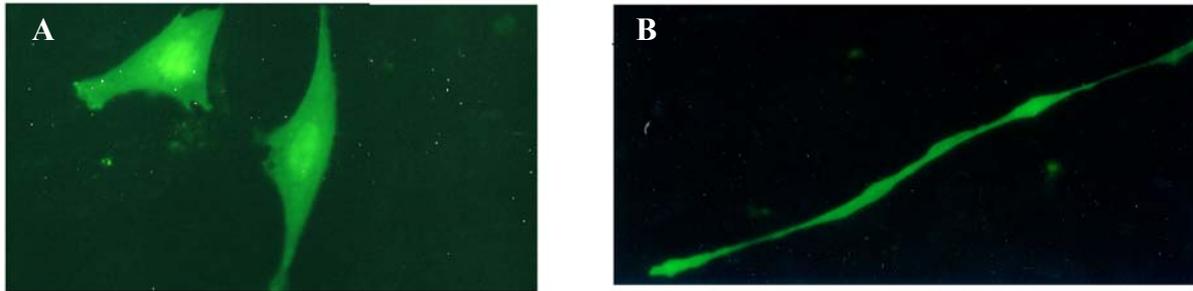
3121-Microscopie à fluorescence.

Une validation préliminaire a consisté à transfecter des cellules musculaires satellites humaines de primo-explantation par le plasmide pEGFP-C3/SMN. Les préparations ont été fixées puis observées au microscope à fluorescence équipé du filtre adéquat pour visualiser la GFP (Figure 3.3).

Les cellules transfectées apparaissent en vert : le gène de l'EGFP porté par le plasmide introduit dans les cellules est donc capable de s'y exprimer. Il est important de noter que les cellules musculaires sont transfectées quel que soit leur état de différenciation, aussi bien sous forme de cellules satellites (Figure 3.3 A) que de myotubes (Figure 3.3 B). Dans la perspective d'une application thérapeutique, ces données sont évidemment d'un grand intérêt. Elles indiquent que le vecteur peut pénétrer aussi bien dans le muscle que dans ses précurseurs.

FIGURE 3.3.

Observation au microscope à fluorescence de cellules musculaires et de myotubes humains en culture primaire, transfectés par pEGFP-C3/SMN.



[A] Cellules musculaires transfectés (grossissement x 400).

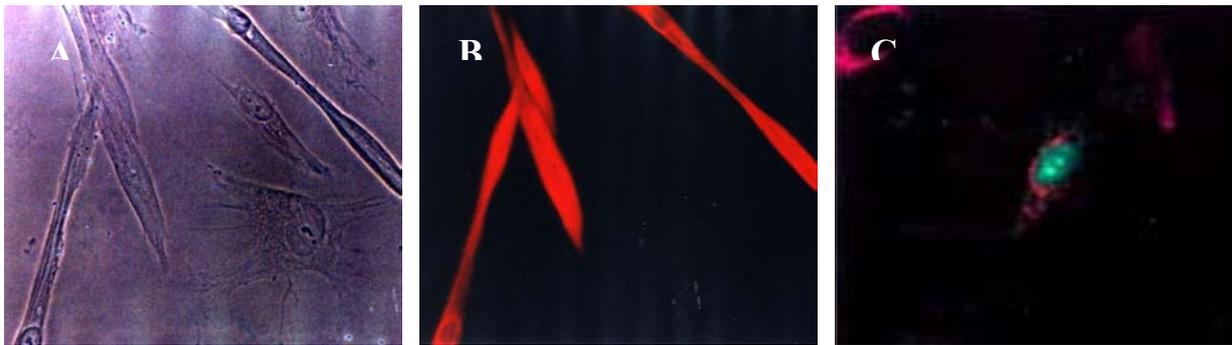
[B] Myotube transfecté (grossissement x 400).

Cependant, ces observations ne permettent pas de différencier infailliblement les fibroblastes des cellules musculaires satellites. La seule morphologie ne suffit pas et si l'on désire déterminer le pourcentage de cellules musculaires satellites transfectées, il vaut mieux identifier ces dernières. En effet, les 2 types cellulaires sont présents dans les cultures ; les fibroblastes sont moins fragiles et plus faciles à transfecter. Or ce sont les cellules musculaires satellites qui doivent exprimer la protéine SMN. En outre, la microscopie à fluorescence ne donne aucune indication sur la fonctionnalité du gène *SMN* fusionné à celui de l'*EGFP*. L'expression du gène de l'*EGFP* n'implique pas *ipso facto* celle du gène *SMN*. C'est pourquoi nous avons eu recours à la microscopie confocale pour parachever la validation de la construction pEGFP-C3/SMN.

3122-Microscopie confocale.

La desmine est une protéine spécifique des cellules musculaires. C'est donc un marqueur que l'on peut mettre à profit pour identifier les cellules musculaires satellites des cultures. On met cette protéine en évidence par des méthodes immunocytochimiques. L'observation des cultures en microscopie confocale révèle qu'il y a dans une suspension cellulaire environ 75 % de cellules musculaires satellites pour 25 % de fibroblastes (Figure 3.4 A et B). Le double marquage desmine-GFP prouve que les pourcentages de transfection déterminés ne sont pas surévalués par une inclusion induite des fibroblastes puisque les cellules musculaires marqués pour la desmine (en rouge) expriment également la GFP (en vert) (Figure 3.4 C).

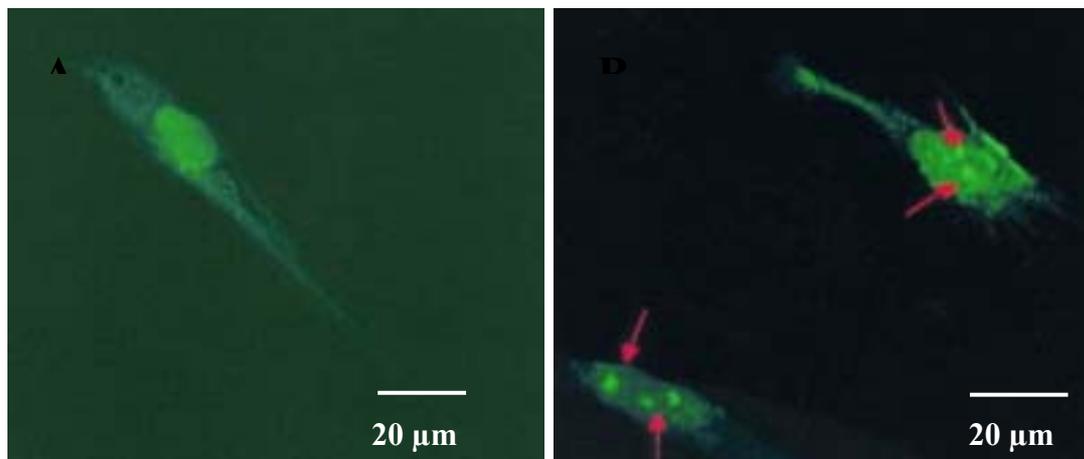
FIGURE 3.4.
Marquage immunocytochimique anti-desmine.



[A] Observation en microscopie à contraste de phase d'une culture de cellules musculaires humaines. (Grossissement : x 400.)
 [B] Observation en microscopie confocale d'une culture de cellules musculaires humaines. (Grossissement : x 400.)
 [C] Observation en microscopie confocale d'une culture de cellules musculaires humaines transfectée par pEGFP-C3/SMN. (Grossissement : x 400.)

Afin d'étudier la distribution de la protéine SMN fusionnée à l'EGFP, des cellules musculaires satellites humaines de primo-explantation ont été fixées 48 h après transfection transitoire par le plasmide pEGFP-C3/SMN ou par le plasmide pEGFP-C3, puis les cellules ont été observées par microscopie confocale (Figure 3.5).

FIGURE 3.5.
Observation de cellules musculaires satellites humaines transfectées, en microscopie confocale.



[A] Cellules musculaires satellites humaines transfectées par pEGFP-C3.
 [B] Cellules musculaires satellites humaines transfectées par pEGFP-C3/SMN. Les flèches rouges indiquent les probables concentrations de la protéine SMN dans les *gems*.

Dans les cellules transfectées par pEGFP-C3, la fluorescence nucléaire de la GFP est uniforme. En revanche, dans les cellules transfectées par pEGFP-C3/SMN, la fluorescence nucléaire apparaît comme mouchetée, ponctiforme, siégeant sur un fond d'un vert uniforme mais beaucoup moins intense. Les taches ponctiformes fluorescentes se situent très probablement là où s'exprime normalement la protéine SMN constitutive, dans les *gems*.

313-Discussion.

Nous avons transfecté des cellules musculaires satellites humaines par pEGFP-C3 ou par pEGFP-C3/SMN dans le but de mettre en évidence une éventuelle différence de coloration des cellules selon le plasmide utilisé. Dans les cellules transfectées uniquement par pEGFP-C3, la fluorescence est uniforme dans le compartiment cellulaire considéré (nucléaire ou cytoplasmique), même si elle n'y a pas la même intensité. La GFP n'a pas de fonction précise et diffuse dans toute la cellule ; dans le cytoplasme, elle s'associe aux microfilaments. Ces observations sont en accord avec des résultats antérieurs qui montrent que la GFP a ordinairement une distribution cytoplasmique homogène (Schmitz et Bereiter-Hahn, 2001). Le motif de distribution de l'EGFP porté par le plasmide pEGFP-C3 est similaire à celui de la GFP seule.

En revanche, la situation est différente lorsque les cellules surexpriment SMN. L'aspect punctiforme de la fluorescence nucléaire des cellules transfectées par pEGFP-C3/SMN est cohérent avec ce que l'on sait de la localisation de la protéine SMN (Young *et al.*, 2000) et notamment de sa localisation nucléaire prédominante dans les cellules musculaires squelettiques, telle que la révèle l'immunomarquage (Williams, 1999). En bon accord avec ces résultats, nos propres observations indiquent (a) que la construction pEGFP-C3/SMN est très probablement fonctionnelle et (b) que la protéine de fusion GFP-SMN s'exprime dans son intégralité sous forme d'une protéine distribuée dans la cellule comme la protéine SMN endogène.

Ces résultats ont fait l'objet de la Publication n°1.

32-Choix de l'agent de transfection.

Une fois que nous disposions de la construction contenant le gène d'intérêt, il s'agissait de trouver un vecteur capable de l'introduire dans les cellules. Les cellules musculaires satellites humaines sont directement impliquées dans de nombreuses maladies musculaires ; cependant peu d'études ont été réalisées sur ce type de cellules connues pour être très fragiles. Nous avons comparé l'aptitude de 3 vecteurs synthétiques courants à transfecter des cellules musculaires satellites humaines en culture primaire afin de déterminer lequel des 3 combinerait la plus grande efficacité à la moindre cytotoxicité.

C'est le plasmide pEGFP-C3/SMN que l'on a utilisé pour toutes les expériences décrites ci-dessous, expériences qui, sauf mention contraire, ont été conduites en présence de 10 % de SVF. Les essais de transfection ont été réalisés en parallèle avec les 3 agents et ils ont été répétés 3 fois, chaque fois sur des cultures indépendantes. Les résultats sont analysés au moyen du *test* de Fischer.

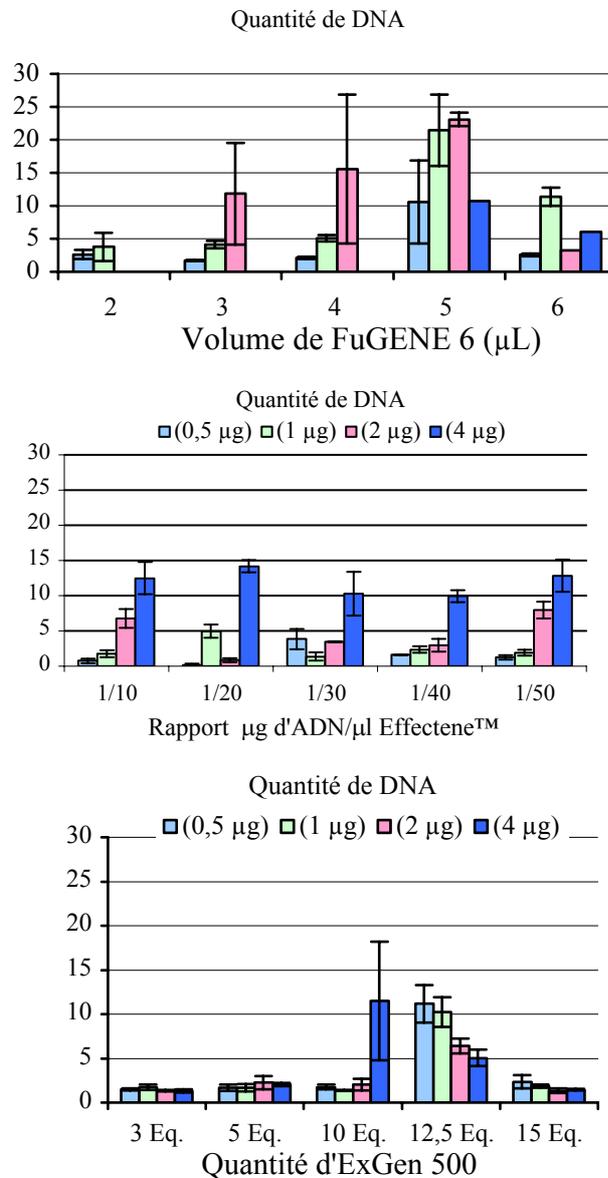
321-Optimisation des conditions de transfection.

L'un des éléments déterminants d'une transfection efficace est le rapport des charges positives du vecteur cationique aux charges négatives du DNA. Un mélange de ces composants dans des proportions différentes engendrent des complexes dont les caractéristiques physicochimiques sont différentes. Ces différences ont elles-mêmes des répercussions significatives sur le mode d'ingestion des complexes par la cellule et par conséquent sur leur trafic intracellulaire.

Des quantités de DNA, comprises entre 0,5 μg et 4 μg , ont été combinées à différentes quantités de chacun des 3 vecteurs pour déterminer le rapport de concentration permettant une transfection optimale des cellules. Les cellules sont analysées au FACS, 24 h après avoir été transfectées. Le pourcentage de cellules fluorescentes est corrélatif à l'efficacité de transfection. On utilise comme témoins des cellules non transfectées provenant du même donneur (Figure 3.6).

Dans le cas du FuGENE 6, il est intéressant de noter que le volume de réactif, plus que la quantité de DNA est un facteur critique pour le succès de la transfection. C'est avec un volume de 5 μL de FuGENE 6 que l'on obtient la meilleure efficacité de transfection, quelle

FIGURE 3.6.
Optimisation des conditions de transfection.



que soit la quantité de DNA utilisée. Le meilleur rapport vecteur/DNA est de 5 µL de FuGENE 6 pour 2 µg de DNA (23,1 ± 11,2 % de cellules transfectées).

Pour une concentration donnée de DNA, le fait d'augmenter le volume d'Effectene n'a pas de répercussion sur l'efficacité de transfection. Les complexes formés avec 4 µg de DNA possèdent la meilleure efficacité de transfection (14,1 ± 0,8 % de cellules transfectées dans le cas d'un rapport d'1/20), mais ce réactif est moins efficace que le FuGENE 6 pour transfecter les cellules musculaires satellites humaines. Il faut utiliser au moins 2 µg de DNA par expérience pour que le vecteur soit efficace.

Avec l'Exgen 500, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence aux conditions extrêmes de l'expérience (à 3 Eq., 5 Eq. et 15 Eq.). A 12,5 Eq. l'efficacité de transfection est significativement supérieure à celle que l'on observe à d'autres rapports DNA/vecteur ($11,1 \pm 2,1$ % de cellules transfectées), sauf lorsque l'on complexe 10 Eq. d'ExGen 500 à 4 μg de DNA. A ce rapport, on observe une bonne efficacité de transfection ($11,5 \pm 6,7$ % de cellules transfectées).

Les résultats de cette expérience nous amènent à conclure que le FuGENE 6 semble être l'agent de transfection le plus efficace pour les cellules musculaires satellites humaines en culture. Mais il faut encore déterminer la taille des complexes pour tenter d'expliquer les différences d'efficacité observées. Il faut aussi en déterminer la cytotoxicité afin de choisir, parmi les 3 vecteurs candidats, l'agent de transfection le plus approprié aux cellules musculaires satellites humaines en culture primaire.

322-Taille des complexes formés.

La taille des complexes formés entre différentes quantités de FuGENE 6, Effectene et ExGen 500 d'une part, et de DNA, de l'autre, a été déterminée par QUELS (Figure 3.7) et par microscopie électronique (Figure 3.8).

Le manque d'informations sur la composition des agents de transfection et de leur tampon rend délicate l'interprétation des résultats avec le FuGENE 6 et l'Effectene. Les complexes formés avec le FuGENE 6 sont énormes (jusqu'à 3 μm pour un rapport de 3 $\mu\text{L}/0,5$ μg par exemple) ; ils sont pléiomorphes et ont tendance à s'agréger. Le vecteur lui-même a tendance à l'auto-agrégation (cf. la Figure 3.8 A : une structure agrégée correspondant probablement à du vecteur auto-agrégé est observée à côté des complexes). Ce phénomène explique sans doute la variabilité d'efficacité de transfection et par conséquent les tailles très élevées des barres d'erreur de la figure 3.6. Les rapports de concentration 3 $\mu\text{L}/0,5$ μg et 6 $\mu\text{L}/1$ μg correspondent à des rapports de charges et résultent en la formation de complexes de taille identique.

FIGURE 3.7.
Analyse par QUELS de la taille des complexes formés entre les vecteurs de transfection et le plasmide pEGFP-C3/SMN.

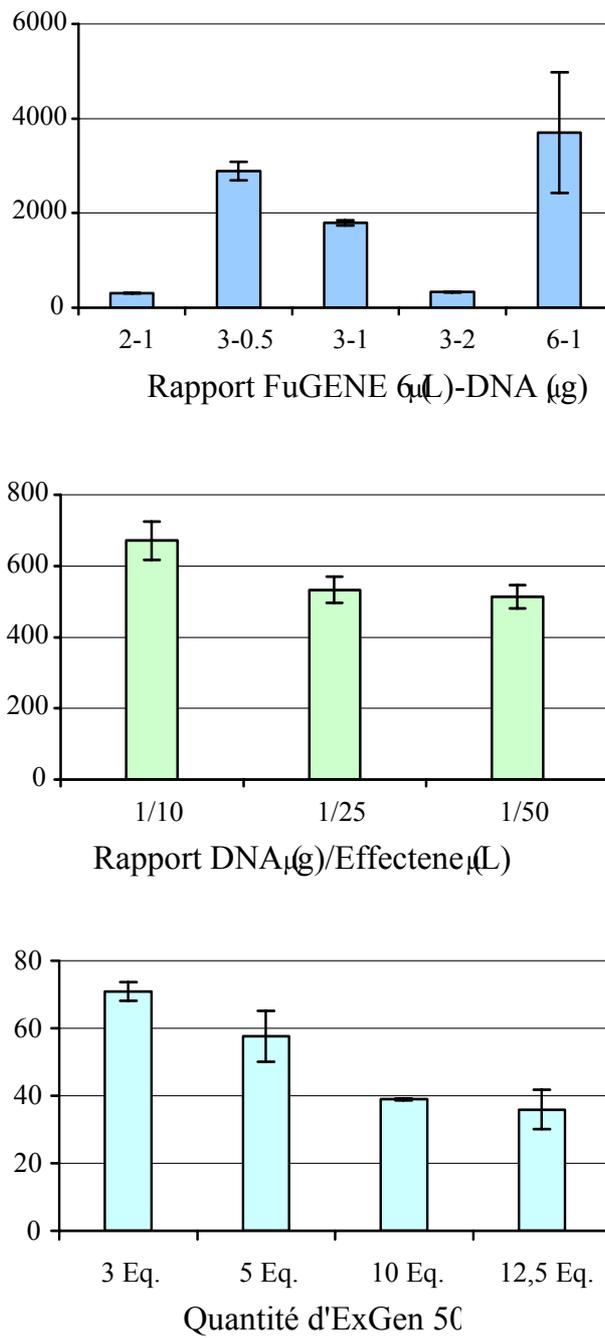
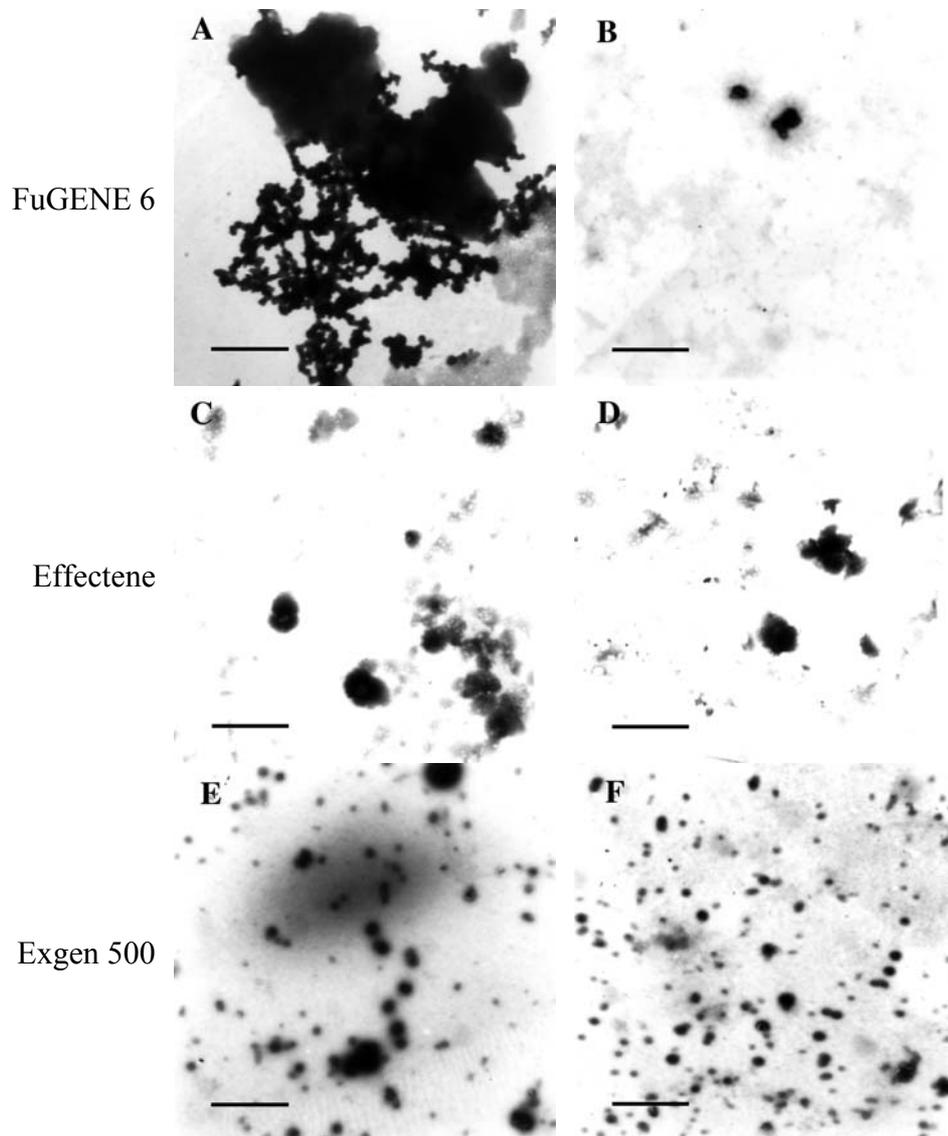


FIGURE 3.8.

Observation au microscope électronique de complexes formés entre le FuGENE 6, l'Effectene ou l'ExGen 500 et le plasmide pEGFP-C3/SMN.



- [A] Complexes formés avec 3 μL de FuGENE et 1 μg de DNA.
 [B] Complexes formés avec 3 μL de FuGENE et 2 μg de DNA.
 [C] Complexes formés avec 1 μg de DNA et 10 μL d'Effectene.
 [D] Complexes formés avec 1 μg de DNA et 25 μL d'Effectene.
 [E] Complexes formés avec 3 éq d'ExGen 500 pour 2 μg de DNA.
 [F] Complexes formés avec 5 éq d'ExGen 500 pour 2 μg de DNA.
 La barre représente 591 nm.

Les tailles des complexes d'Effectene, tout comme leur efficacité de transfection ne semblent pas fortement dépendre du rapport agent de transfection/DNA (1/10 en fig 3.8 C, 1/25 en fig 3.8 D). Elles sont respectivement de $513,3 \text{ nm} \pm 32,4 \text{ nm}$ et de $670,9 \text{ nm} \pm 44 \text{ nm}$ et ne diffèrent pas significativement l'une de l'autre.

La taille des complexes formés d'ExGen 500 est inversement proportionnelle au rapport N/P. Elle passe de $70,9 \text{ nm} \pm 2,72 \text{ nm}$ pour 3 Eq. (Fig 3.8 E) à $35,9 \text{ nm} \pm 5,8 \text{ nm}$ pour 12,5 Eq. (Fig. 3.8 F). Les complexes ne sont pas pléiomorphes mais affectent une forme régulière. Les complexes formés avec 15 Eq. d'ExGen 500 sont très petits ($< 35 \text{ nm}$) ; nous ne pouvons en donner la taille moyenne en raison de la limitation du pouvoir de résolution de l'appareil de QUELS dont nous disposons. Le fait d'augmenter la concentration d'amine dans les complexes conduit à une condensation accrue du DNA et à une meilleure efficacité de transfection, jusqu'à un certain point toutefois. A partir de 15 Eq., les complexes sont trop petits et moins efficaces en transfection.

Ainsi, les complexes les plus gros formés avec le FuGENE 6 aboutissent à une meilleure efficacité de transfection que celle des complexes plus petits formés avec l'Effectene et surtout que celle des minuscules particules résultant de l'association de l'ExGen 500 au DNA.

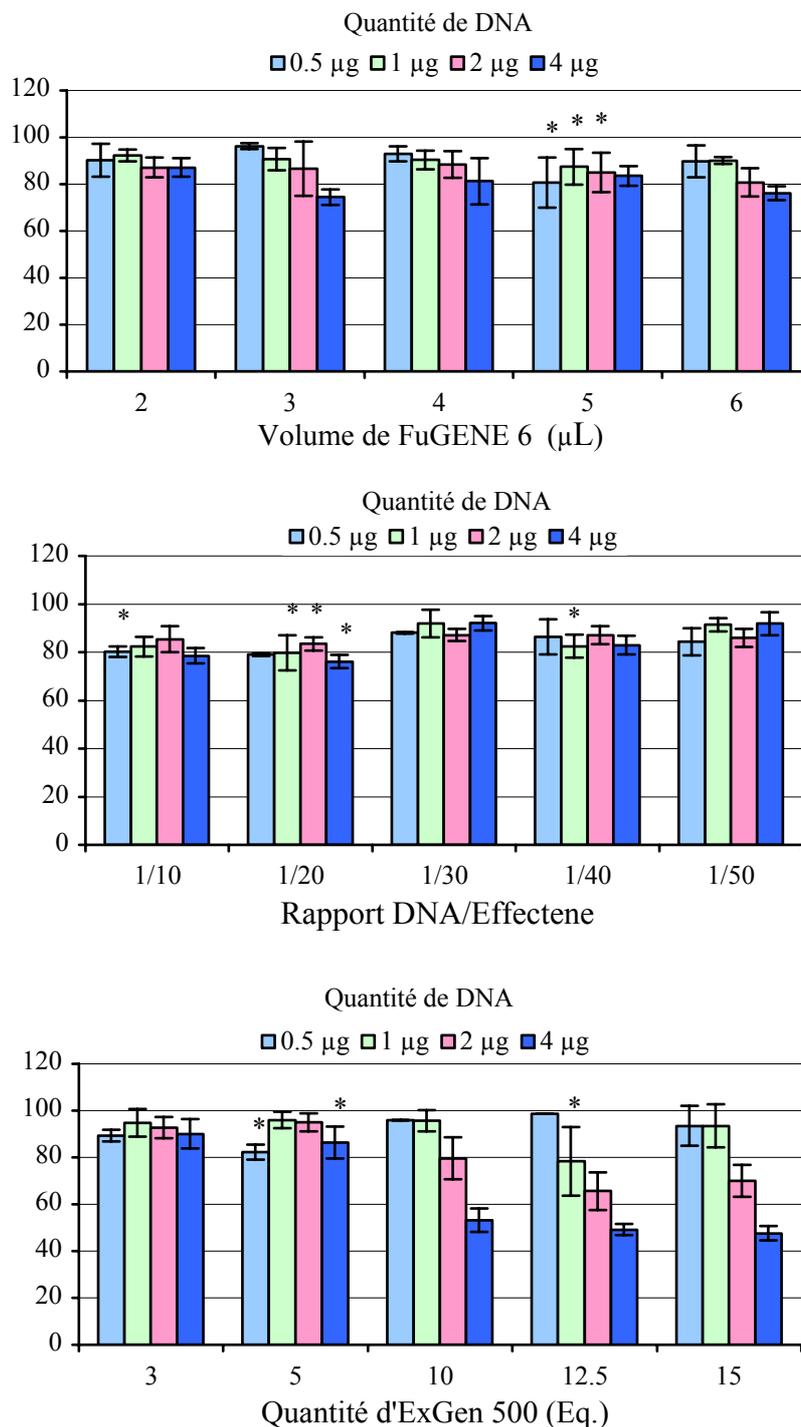
323-Cytotoxicité des complexes pour les cellules musculaires satellites humaines.

La cytotoxicité des complexes pour les cellules musculaires satellites humaines en culture primaire a été mesurée par l'épreuve au XTT (Figure 3.9). Des cellules non transfectées (disposés dans 30 des 96 puits de la plaque) servent de témoins. La moyenne des DO de la solution de formazan qu'elles engendrent est prise comme le 100 % de viabilité cellulaire. Les DO des autres puits (qui contiennent des cellules traitées) sont exprimées en pourcent de cette valeur. Ce pourcentage permet d'évaluer la viabilité résiduelle des cellules transfectées

Le FuGENE 6 présente une cytotoxicité significative ($p < 0,001$) quand les complexes sont formés avec un volume de réactif excessif par rapport à la quantité de DNA. Et le mélange n'a aucune efficacité de transfection (résultats non représentés) ; les complexes ne se forment pas. Aux volumes adéquats de FuGENE 6, la cytotoxicité est moins importante mais encore significative ($p < 0,01$). Au rapport vecteur/DNA ayant une activité de transfection optimale ($5 \mu\text{L}/2 \mu\text{g}$), la cytotoxicité est faible.

Dans le cas de l'Effectene, le fait d'augmenter la quantité de vecteur n'a aucun effet sur la cytotoxicité des complexes. Quels que soient les rapports vecteur/DNA, la cytotoxicité ne varie guère, comme il en était pour l'efficacité de transfection et la taille des complexes.

FIGURE 3.9.
Estimation de la cytotoxicité des complexes par l'épreuve au XTT.



* p < 0,01, ** p < 0,001 (versus témoins).

En raison du grand nombre de puits de cellules non traitées pris en compte pour calculer la DO correspondant aux 100 % de viabilité, certaines valeurs qui ne semblent pas significativement différentes graphiquement le sont pourtant statistiquement.

La situation est tout autre pour l'ExGen 500 : les complexes qu'il forme à 10 Eq. et avec 2 µg et 4 µg de DNA sont très cytotoxiques. Dans ces conditions, la mortalité cellulaire est supérieure à 50 % et les cellules perdent leur aspect fusiforme caractéristique.

Les petits complexes formés avec l'ExGen 500 sont donc plus toxiques pour les cellules musculaires satellites humaines en culture primaire que ne le sont les complexes formés avec l'Effectene, et les complexes FuGENE 6/DNA sont peu toxiques pour ces cellules.

Ainsi, le FuGENE 6 semble bien être le meilleur agent de transfection pour les cellules musculaires satellites humaines en culture primaire.

324-Effet du sérum sur l'efficacité de transfection.

Le sérum contient des molécules qui protègent la cellule contre toute agression venant du milieu extérieur y compris la transfection. C'est pourquoi, pour éliminer l'effet inhibiteur de certaines de ces molécules sériques, les transfusions non-virales de cellules en culture sont en général effectuées dans un milieu dépourvu de sérum. Les agents de transfection doivent cependant être efficaces en présence de sérum, car le plasma dont il dérive est bien l'un des milieux dans lequel les complexes peuvent être introduits *in vivo*. L'efficacité de transfection des différents vecteurs en présence de sérum et pour certains rapport de concentration vecteur/DNA a donc été déterminée. Ces expériences ont été réalisées avec un lot de cellules

TABLEAU 3.1.
Effet du sérum sur l'efficacité de transfection.

Vecteur	Pourcentage de cellules transfectées à une concentration de sérum de		
	0 %	5 %	10 %
FuGENE 6	9,8 ± 9,0	5,2 ± 1,8	13,7 ± 1,0
Effectene	8,5 ± 7,0	5,8 ± 3,1	4,1 ± 2,0
ExGen 500	13,5 ± 0,2	13,7 ± 1,3	13,6 ± 1,0

musculaires satellites différent de ceux qui ont été utilisés dans les expériences déjà décrites. Cet état de fait explique la différence d'efficacité de transfection observée. En absence de sérum, chacun des 3 agents de transfection se comporte d'une manière qui lui est propre. En outre, les cellules réagissent plus ou moins bien à la privation de sérum et il en résulte une variabilité de l'efficacité de transfection du vecteur qui ne peut être prédite. Selon toute probabilité, ce phénomène est imputable à la variation de sensibilité des différents lots de cellules à cette condition extrême. L'ExGen 500 ainsi que, dans une moindre mesure, le FuGENE 6 semblent être insensibles ou peu sensibles à la variation de concentration du milieu en sérum. Le FuGENE 6 est même plus efficace en présence de 10 % de SVF ; le pourcentage de cellules transfectées diffère significativement selon que le milieu contient 5 % ou 10 % de SVF. Les efficacités de transfection sont assez importantes dans les conditions standard de transfection (10 % de SVF). Comme on s'y attendait, le pourcentage de cellules transfectées par l'Effectene est inversement proportionnel au taux de sérum présent dans le milieu.

Ainsi, (a) le FuGENE 6, l'Effectene et l'Exgen 500 peuvent transférer efficacement les cellules musculaires satellites humaines en culture primaire, même en présence de sérum et (b) l'Effectene est le vecteur le plus sensible au sérum.

325-Discussion.

Les cellules musculaires satellites humaines constituent une cible de choix pour le transfert de gènes ; elles sont impliquées dans de nombreuses maladies musculaires héréditaires. Pour traiter ces maladies génétiques, on peut envisager d'utiliser la thérapie par transfert de myoblastes (*myoblast transfer therapy* [MTT]) (Smythe *et al.*, 2000). — Nous utilisons ici le mot myoblaste dans le sens que lui donnent certains auteurs anglo-saxons, à tort selon nous, celui de cellule musculaire satellite ; nous réservons l'usage du terme myoblaste à la désignation des cellules embryonnaires précurseurs des muscles squelettiques. — La MTT consiste à transplanter des cellules musculaires satellites normales dans le muscle de patients atteints de maladies musculaires héréditaires comme la myopathie de Duchenne (*Duchenne muscular dystrophy* [DMD]) ou la SMA, afin de restituer l'expression du gène muté responsable de la maladie dans le muscle malade. Les cellules satellites musculaires se prêtent particulièrement bien à cette technique (Wolff *et al.*, 1992) car elles fusionnent complètement avec les fibres du muscle dans lequel elles sont injectées, et elles s'adaptent aux signaux locaux émis par leur environnement immédiat (Bowie et Chang,

1998). Le bon déroulement de ce processus est cependant entravé par la mort massive des cellules du donneur consécutive à la réponse immunitaire développée par l'hôte. Il est possible d'améliorer la technique, en sélectionnant rigoureusement les cellules du greffon et les hôtes, afin qu'ils expriment la même isoforme de chaîne lourde de la myosine (Qu et Huard, 2000). Les problèmes soulevés par cette technique ont été largement inventoriés, et les équipes de recherche qui s'efforcent d'améliorer le MTT sont très nombreuses (Partridge, 2002 ; Qu *et al.*, 1998 ; Seigneurin-Venin *et al.*, 2000 ; Smythe *et al.*, 2001). L'une des solutions envisagées consiste à isoler les cellules musculaires satellites du patient lui-même, à les transfecter *ex vivo*, et à les réimplanter chez le patient. Cette approche écarte complètement tout risque de rejet ou de développement de réaction immunitaire liés à une incompatibilité des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (Smythe et Grounds, 2001). C'est dans les cellules musculaires que les résultats de transfert direct de DNA ont été les plus prometteurs (Wolff *et al.*, 1992). Il a été prouvé que l'électroporation *in vivo* augmente au moins d'un facteur 10 le degré d'expression des transgènes portés par du DNA nu dans le muscle (Hartikka *et al.*, 2001). Une autre approche consiste à injecter le DNA plasmidique par voie intraportale ; il en résulte un marquage de près de 10 % des hépatocytes (Herweijer *et al.*, 2001). Avec cette technique, cependant, on observe une diminution rapide de l'expression du transgène après la libération du plasmide. L'injection intra-artérielle de plasmide nu, vecteur d'un gène rapporteur, permet de marquer 1 à 30 % des fibres musculaires, dans les muscles des membres antérieurs et postérieurs du singe (Zhang *et al.*, 2001). Les expériences de transfection ayant fait appel au DNA nu ont fait l'objet d'une revue générale (Herweijer et Wolff, 2003). Il ressort de cette revue et de la littérature qu'à l'heure actuelle la solution la plus efficace consiste à recourir aux vecteurs synthétiques, surtout lorsqu'il s'agit de traiter des cellules en culture primaire, cellules qui, habituellement, ne se laissent pas facilement transfecter. Dans le cas des cellules musculaires humaines, il semblerait que le cheminement intracellulaire particulier du DNA fût responsable des faibles niveaux de transfection observés. Le complexe ingéré serait plus rapidement dirigé vers le compartiment lysosomique (Pampinella *et al.*, 2002). On peut transfecter environ 3 % de cellules musculaires satellites de Souris en culture primaire en utilisant la Lipofectamine (Dodds *et al.*, 1998) et le DOSPER ou le mélange DODAC : DOPE (Vitiello *et al.*, 1998). Il a été possible d'introduire un gène de minidystrophine couplé à l'EGFP dans des cellules musculaires satellites humaines en culture primaire en utilisant un vecteur complexe constitué du DNA d'intérêt lié par du PEI à un adénovirus (Campeau *et al.*, 2001). Ce complexe très particulier permet des taux de transfection de 3 à 5 %. Enfin, l'usage de liposomes a permis

de transfecter 40 % de cellules C2C12 (lignée de myoblastes de Souris) mais ces mêmes vecteurs ne permettent de transfecter que 10 % de cellules musculaires satellites de Souris en culture primaire (Trivedi et Dickson, 1995).

Les taux de transfection obtenus dans l'étude que nous avons conduite sont très satisfaisants en comparaison des taux publiés dans la littérature, surtout pour des cellules humaines en culture primaire. Par la mesure de la taille des complexes (Figures 3.7 et 3.8), nous confirmons que les plus volumineux d'entre eux, ceux qui sont formés avec le FuGENE 6, ont une efficacité de transfection optimale, et ce résultat est en bon accord avec ceux de la littérature (Ogris *et al.*, 1998). La transfection des cellules musculaires satellites humaines est optimale avec des lipoplexes dont la taille va de 500 nm et 1 μ m. Les complexes formés par l'Effectene ont une taille de cet ordre de grandeur à tous les rapports de concentration vecteur/DNA, mais il ne leur suffit pas de remplir cette condition pour posséder une grande efficacité de transfection (Figure 3.6). Les petits complexes formés avec l'Exgen 500 rentrent plus facilement dans la cellule, leur importante charge en amines les rend très stables mais cette stabilité leur confère une moindre efficacité de transfection et ils sont beaucoup plus cytotoxiques (Figure 3.9). La concentration du milieu en SVF intervient dans l'efficacité de transfection ; nous montrons ici que les 3 vecteurs étudiés demeurent efficaces dans un milieu contenant 10 % de SVF (Table 3.1). Il en résulte que les expériences de transfection peuvent être réalisées en présence de sérum. Il s'agit là d'un point essentiel quand on envisage de pratiquer des transfusions *ex vivo* en vue de pratiquer une MTT. Le FuGENE 6 s'est montré le plus efficace pour transfecter des cellules musculaires satellites humaines en culture primaire, comme il l'avait fait dans le cas des cellules musculaires satellites de Rat (Seigneurin-Venin *et al.*, 2000).

Le problème se présente très différemment quand on envisage de transfecter directement le tissu musculaire *in vivo*. La masse des tissus à transfecter est beaucoup trop importante pour pouvoir être atteinte dans son intégralité par la technique du MTT. Mais la transfection directe par administration de complexes est une solution qui paraît réaliste. Les muscles respiratoires seraient des candidats très crédibles au traitement par cette technique (a) car les patients atteints de maladies musculaires meurent le plus souvent d'atteintes respiratoires et (b) car le muscle diaphragmatique n'est pas d'un volume trop considérable. D'autres muscles pourraient d'ailleurs être visés. Une des solutions techniques possibles consisterait à transférer le gène dans le muscle choisi soit par injection *in situ* soit par injection systémiques de complexes de DNA couplé au FuGENE 6. Des lipoplexes de DODAC ont été administrés à l'animal par voie intraveineuse, intracardiaque ou intra-

artérielle et se sont montrés capables de transférer un gène rapporteur (celui de la luciférase) dans des muscles en régénération. La voie intra-artérielle s'est montrée de loin la plus efficace (Pampinella *et al.*, 2000).

En résumé, la présente étude démontre que le FuGENE 6 est un meilleur vecteur que l'Effectene ou l'ExGen 500 pour transfecter des cellules musculaires satellites humaines en culture primaire ; il permet d'obtenir des taux de transfection de l'ordre de 20 %. Elle permet d'envisager le développement de nouveaux protocoles sûrs et efficaces de thérapie génique de maladies musculaires ou neuromusculaires héréditaires — comme la SMA ou la DMD — par transfection *ex vivo* de cellules musculaires satellites.

Ces résultats ont fait l'objet de la Publication N° 2.

33-Effet de l'augmentation d'expression de la protéine SMN dans les cellules musculaires provenant de patients atteints d'amyotrophie spinale progressive de type I.

331-L'expression de SMN empêche-t-elle la dégénérescence des myotubes innervés ?

Les cocultures réalisées par innervation de myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I dégèrent en 1 à 3 semaines (cf. PARAGRAPHE 141 du CHAPITRE 1). Le but des expériences décrites ci-dessous est de déterminer si la restitution d'un niveau d'expression normal ou quasi-normal de la protéine SMN dans ces cellules musculaires satellites — au moyen d'une transfection par le plasmide pEGFP-C3/SMN — confère un phénotype normal aux myotubes innervés. Après transfection des cellules musculaires satellites de patients atteints de SMA I, sélection des cellules transfectées par le G418 puis innervation, une simple observation des cocultures au microscope à contraste de phase permet déjà d'en étudier le comportement (Tableau 3.2).

Le développement des différentes cocultures dans les premiers jours qui suivent l'innervation est identique. Des neurites émergent de chaque explant spino-médullaire pour aller innover les myotubes environnants. Les contractions qui apparaissent normalement 4 jours après l'innervation n'apparaissent que 5 à 6 jours après celle-ci lorsque les cellules musculaires sont transfectées par pEGFP-C3 ou par pEGFP-C3/SMN. Après 3 semaines d'innervation, les myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I et transfectées par pEGFP-C3 dégèrent comme les myotubes homologues innervés mais non transfectées. En revanche, lorsque les myotubes proviennent de la fusion de cellules musculaires satellites de malades, préalablement transfectées par pEGFP-C3/SMN, ils se comportent comme des cocultures témoins et ne dégèrent plus.

On peut donc imaginer que la transfection par le plasmide pEGFP-C3/SMN a suscité la production d'une protéine SMN fonctionnelle. Ces hypothèses très préliminaires ne sont fondées que sur l'observation microscopique et doivent être complétées par des expériences permettant de conclure sans équivoque que l'expression de la protéine SMN dans des cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA I est bien responsable de l'apparente correction du phénotype, en culture.

TABLEAU 3.2.
Comportement des myotubes en cocultures selon l'origine des cellules musculaires satellites.

Cellules musculaires satellites provenant (traitement)	Jour d'apparition des neurites	Jour d'apparition des contractions	Jour d'apparition de la dégénérescence
D'un sujet témoin (non transfectées)	J 1	J 4	/
D'un sujet témoin (transfectées par pEGFP-C3/SMN)	J 1	J 5	/
D'un patient atteint de SMA I (non transfectées)	J 1	J 4	J 20-J 21
D'un patient atteint de SMA I (transfectées par pEGFP-C3)	J 1	J 5-J 6	J 20-J 21
D'un patient atteint de SMA I (transfectées par pEGFP-C3/SMN)	J 1	J 5-J 6	/

332-Apoptose.

3321-Cocultures de myotubes et de motoneurones purifiés de Rat.

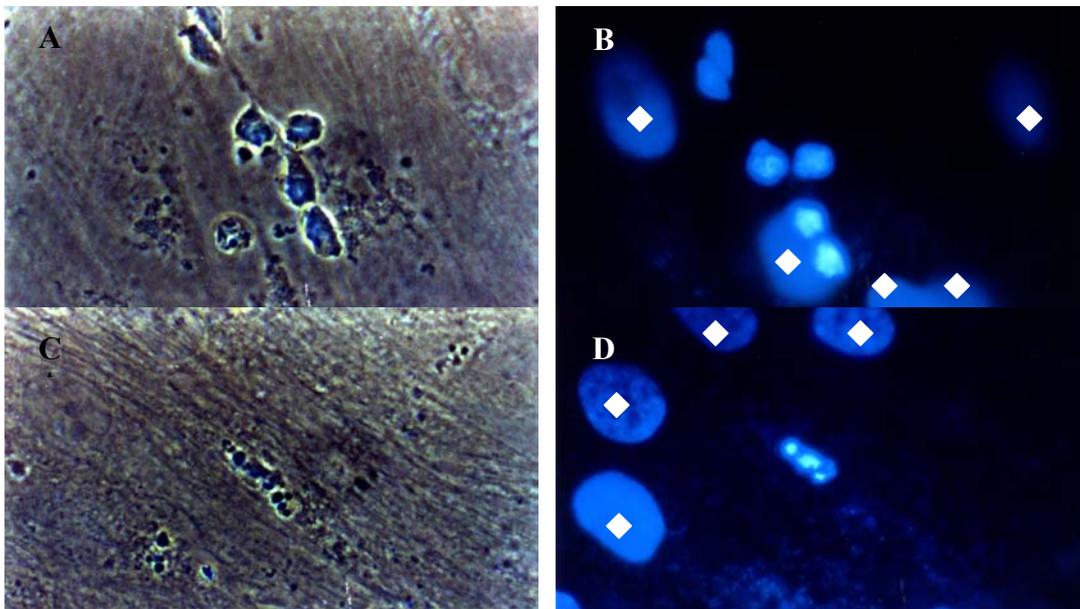
La coloration au Hœchst 33.258 permet de détecter les cellules apoptotiques car elle visualise la condensation caractéristique des noyaux qui accompagne l'apoptose. Le noyau des cellules vivantes est homogène.

Vingt quatre heures après avoir déposé des motoneurones de Rat sur des myotubes formés après la fusion de cellules satellites provenant de patients SMA I, les cellules nerveuses dégénèrent par apoptose, leur noyau apparaît fragmenté après coloration de Hœchst (Figure 3.10 C et D) alors que lorsque les cellules satellites proviennent de sujets sains, les noyaux des motoneurones marqués par la même technique sont homogènes (Figure 3.10 A et B).

Les noyaux des myotubes sont également marqués par le colorant de Hœchst, mais comme ils ne sont pas situés dans le même le même plan focal, ils apparaissent flous. Nous les avons identifiés par des losanges blancs sur la photographie.

FIGURE 3.10.

Aspects de motoneurones purifiés de Rat déposés sur une culture de myotubes humains sains ou malades^(a) et non transfectés (Grossissement : x 400.)



^(a) Par myotubes sains ou malades, on entend myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de sujets sains ou de patients atteints de SMA I.

[A] Motoneurones sur myotubes sains. Contraste de phase.

[B] Motoneurones sur myotubes sains. Microscopie de fluorescence après marquage au Hœchst 33.258.

[C] Motoneurones sur myotubes malades. Contraste de phase.

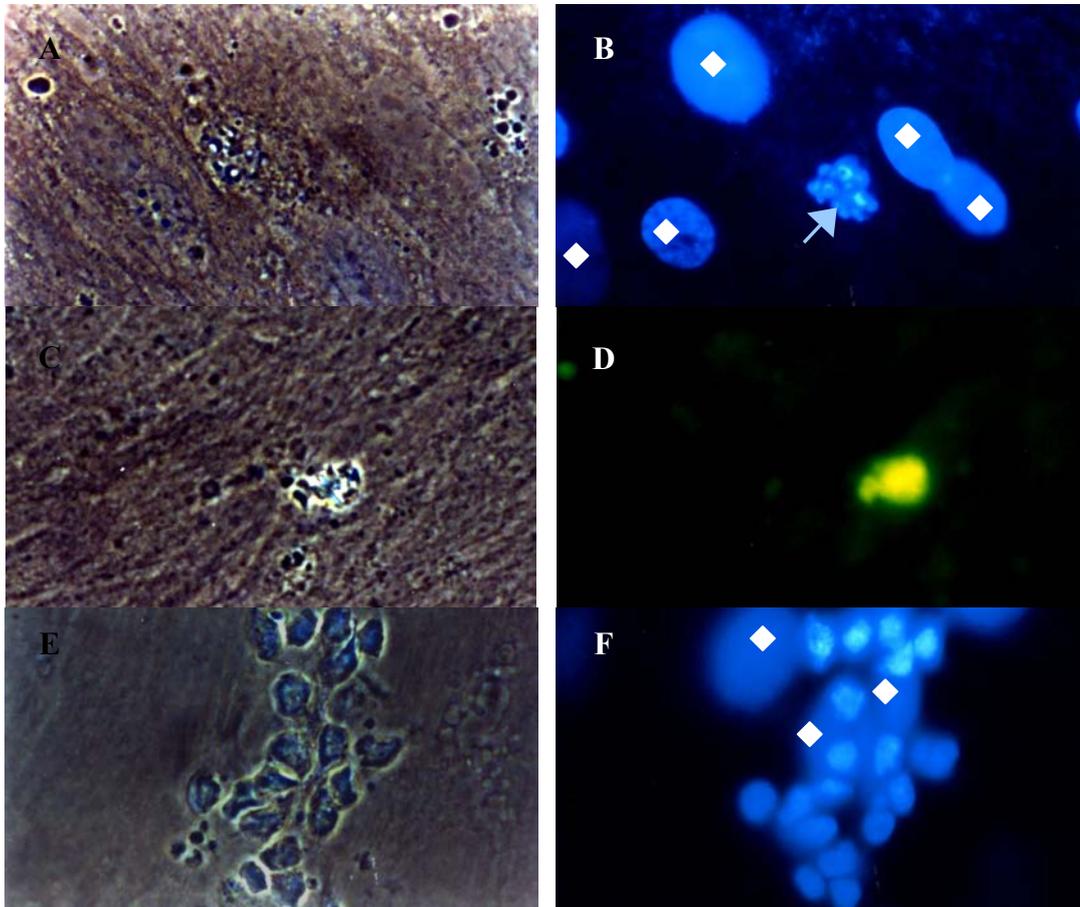
[D] Motoneurones sur myotubes malades. Microscopie de fluorescence après marquage au Hœchst 33.258.

La flèche montre les noyaux des motoneurones en apoptose, les noyaux des myotubes sont repérés par des losanges blancs.

La transfection de cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I, par le plasmide pEGFP-C3 n'a aucun effet sur la survie des motoneurones de Rat (Figure 3.11 A à D) déposés sur les myotubes qui en dérivent. Ceux-ci dégénèrent par apoptose comme le confirment les marquages par le colorant de Hœchst ou par la technique du TUNEL. En revanche, la transfection de ces mêmes cellules par le plasmide pEGFP-C3/SMN empêche la dégénérescence des motoneurones de Rat (Figure 3.11 E et F).

FIGURE 3.11.

Aspect de motoneurones purifiés de Rat déposés sur des myotubes malades^(a) transfectés par pEGFP-C3 ou par pEGFP-C3/SMN (Grossissement x 400).



^(a) Par myotubes sains ou malades, on entend myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de sujets sains ou de patients atteints de SMA I.

[A] Motoneurones sur myotubes malades transfectés par pEGFP-C3. Contraste de phase.

[B] Motoneurones sur myotubes malades transfectés par pEGFP-C3. Microscopie de fluorescence après marquage au Hœchst 33.258.

[C] Motoneurones sur myotubes malades transfectés par pEGFP-C3. Contraste de phase.

[D] Motoneurones sur myotubes malades par pEGFP-C3. Microscopie de fluorescence après marquage par la méthode TUNEL.

[E] Motoneurones sur myotubes malades transfectés par pEGFP-C3/SMN. Contraste de phase.

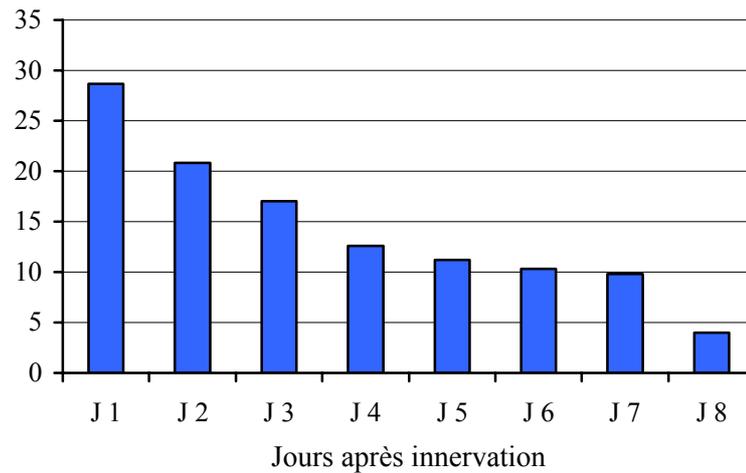
[F] Motoneurones sur myotubes malades transfectés par pEGFP-C3/SMN. Microscopie de fluorescence après marquage au Hœchst.

3322-Cocultures de myotubes innervés par des explants de moelle épinière de Rat.

La quantification, au moyen de la technique à l'annexine V, des microparticules relarguées par les cellules en apoptose a été pratiquée sur des cultures innervées de myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I,

préalablement transfectées par le plasmide pEGFP-C3 (Figure 3.12) ou par le plasmide pEGFP-C3/SMN (Figure 3.13 B).

FIGURE 3.12.
Cinétique de relargage des microparticules produites en cultures innervées de myotubes malades transfectés par pEGFP-C3.

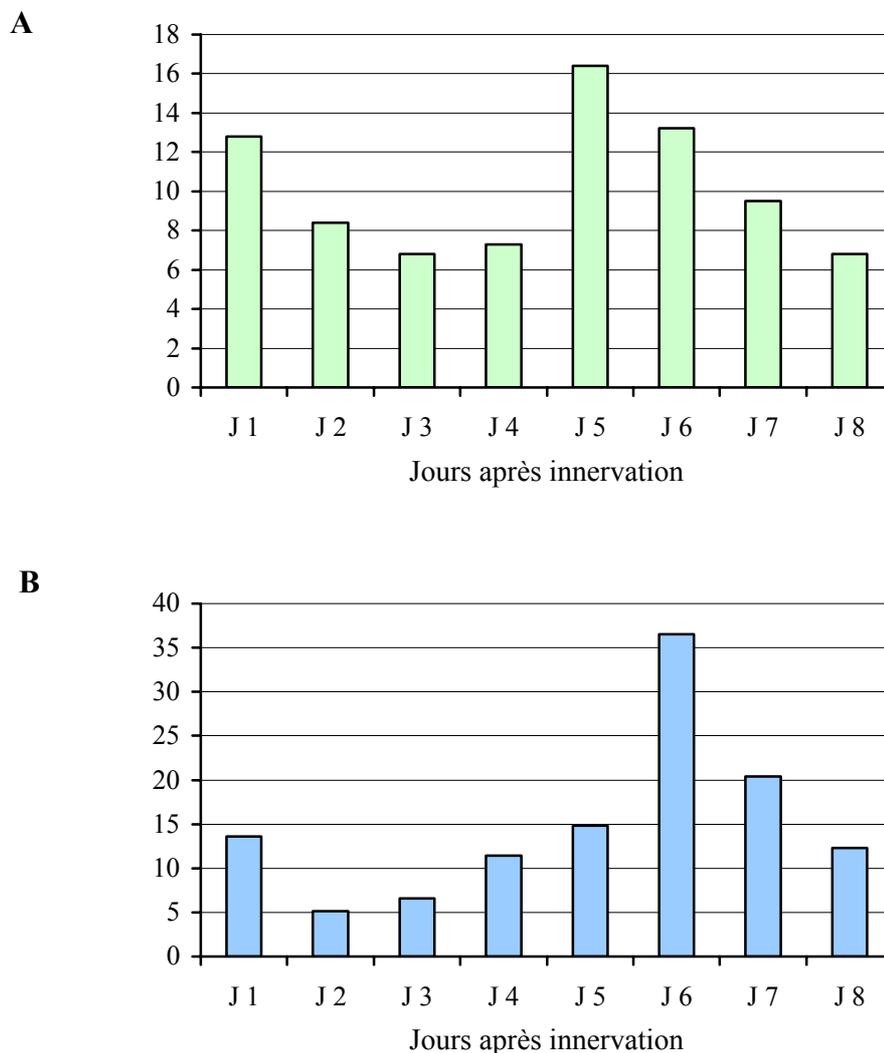


La cinétique de relargage des microparticules produites en cocultures impliquant des cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I et transfectées par pEGFP-C3 (Figure 3.12) est identique à celle des microparticules produites en cocultures impliquant des myotubes malades non transfectés (résultats non montrés). On observe un pic de relargage dès le premier jour qui suit l'innervation, puis la quantité de microparticules relarguées diminue progressivement. La transfection des cellules musculaires satellites par pEGFP-C3 n'a aucun effet sur le comportement des cocultures.

La transfection de cellules musculaires satellites témoins par le plasmide pEGFP-C3/SMN a pour effet de retarder d'un jour l'apparition du second pic de relargage des microparticules. Celui-ci apparaît à J 4 lorsque les cellules ne sont pas transfectées (résultats non montrés). Ce pic coïncide avec l'apparition des premières contractions musculaires. Un tel résultat est cohérent avec celui que fournit l'observation des cocultures en microscopie à contraste de phase. En transfectant des cellules musculaires satellites de patients atteints de SMA I par le plasmide pEGFP-C3/SMN, on restitue aux cocultures qui en dérivent un phénotype similaire à celui des cocultures témoins. En outre, l'étude de la cinétique de

relargage des microparticules par ces cocultures fait apparaître un pic 6 jours après l'innervation ; ce pic est complètement absent lorsque le versant musculaire de la coculture est constitué de myotubes dérivés de cellules musculaires satellites non transfectés ou transfectés par pEGFP-C3 (Figure 3.13).

FIGURE 3.13.
Cinétique de relargage des microparticules produites en cocultures impliquant des cellules musculaires d'individus sains ou de patients atteints de SMA I, transfectées par pEGFP-C3/SMN.



[A] Taux de relargage total des microparticules par des cocultures dont les cellules musculaires satellites proviennent de sujets sains et ont été transfectées par pEGFP-C3/SMN, après innervation.

[B] Taux de relargage total des microparticules par des cocultures dont les cellules musculaires satellites proviennent de patients atteints de SMAI et ont été transfectées par pEGFP-C3/SMN, après innervation.

333-Discussion.

Les expériences qui viennent d'être décrites s'inspirent de celles qu'a conçues Séverine Guettier-Sigrist dans notre laboratoire (Guettier-Sigrist *et al.*, 2002). Ses travaux mettaient en évidence des différences de comportement des motoneurones purifiés de Rat selon qu'ils étaient déposés sur des myotubes sains ou malades. Nous montrons ici que la transfection des cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I par le pEGFP-C3/SMN peut non seulement empêcher la dégénérescence des motoneurones de Rat cocultivés sur des myotubes qui dérivent de ces cellules, mais encore leur restituer un phénotype normal quand ils sont innervés par des explants de moelle épinière embryonnaire de Rat. Il s'agit là d'une conclusion très importante pour la mise au point de thérapies destinées à traiter des patients souffrant de SMA. Classiquement, cette maladie était considérée comme une maladie du motoneurone, et le seul versant nerveux de l'unité motrice était visé par les traitements potentiels. Il convient de revoir cette opinion. Le versant musculaire de l'unité motrice est aussi une cible thérapeutique. Voilà qui ouvre de nouvelles perspectives : le muscle, en effet, est beaucoup plus accessible que le système nerveux. Ces résultats apportent aussi une pierre supplémentaire à l'édifice de l'hypothèse musculaire de la SMA, édifice dont les fondations ont été posées au laboratoire il y a moins de 10 ans. Cette manière de voir est aujourd'hui partagée par de nombreuses équipes, et notamment par celle d'un des codécouvreurs du gène *SMN* (Cifuentes-Diaz *et al.*, 2001).

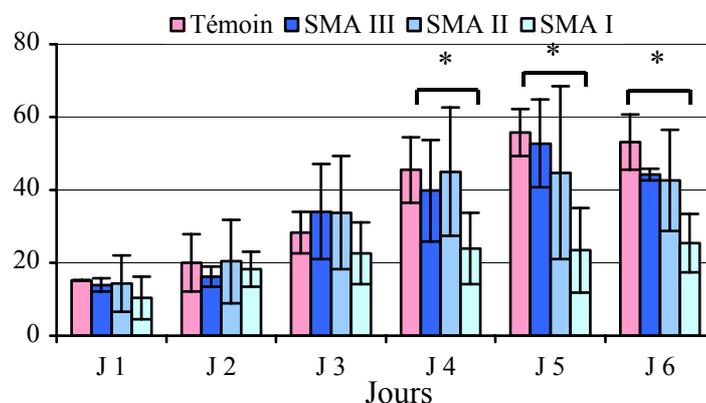
34-Défauts fonctionnels des cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA et des myotubes formés par fusion de ces dernières.

L'objectif de cette étude est de comparer certaines propriétés fonctionnelles des myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de sujets sains à celles des myotubes dérivés de ces mêmes cellules quand elles proviennent de patients atteints de SMA I, II ou III, en absence de tout compartiment nerveux. Toutes les expériences ont été réalisées avec 3 cultures indépendantes provenant chaque fois de 3 donneurs différents.

341-Indices de fusion.

Les cellules sont ensemencées dans des conditions permettant la fusion, en milieu de culture pauvre en sérum (5 %). Dans le cas des cellules témoin, l'indice de fusion maximal est obtenu à J 5 et atteint $55.7 \pm 7,6 \%$ (Figure 3.14). Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les indices de fusion des cellules musculaires satellites témoins, ou provenant de sujets atteints de SMA III et SMA II. En revanche, la situation est complètement différente dans le cas des cellules musculaires satellites provenant de patients atteints de SMA I dont l'indice de fusion maximal, à J 6, ne dépasse pas $25.4 \pm 9,2 \%$.

FIGURE 3.14.
Indice de fusion des cellules musculaires issues de témoins ou de patients SMA.

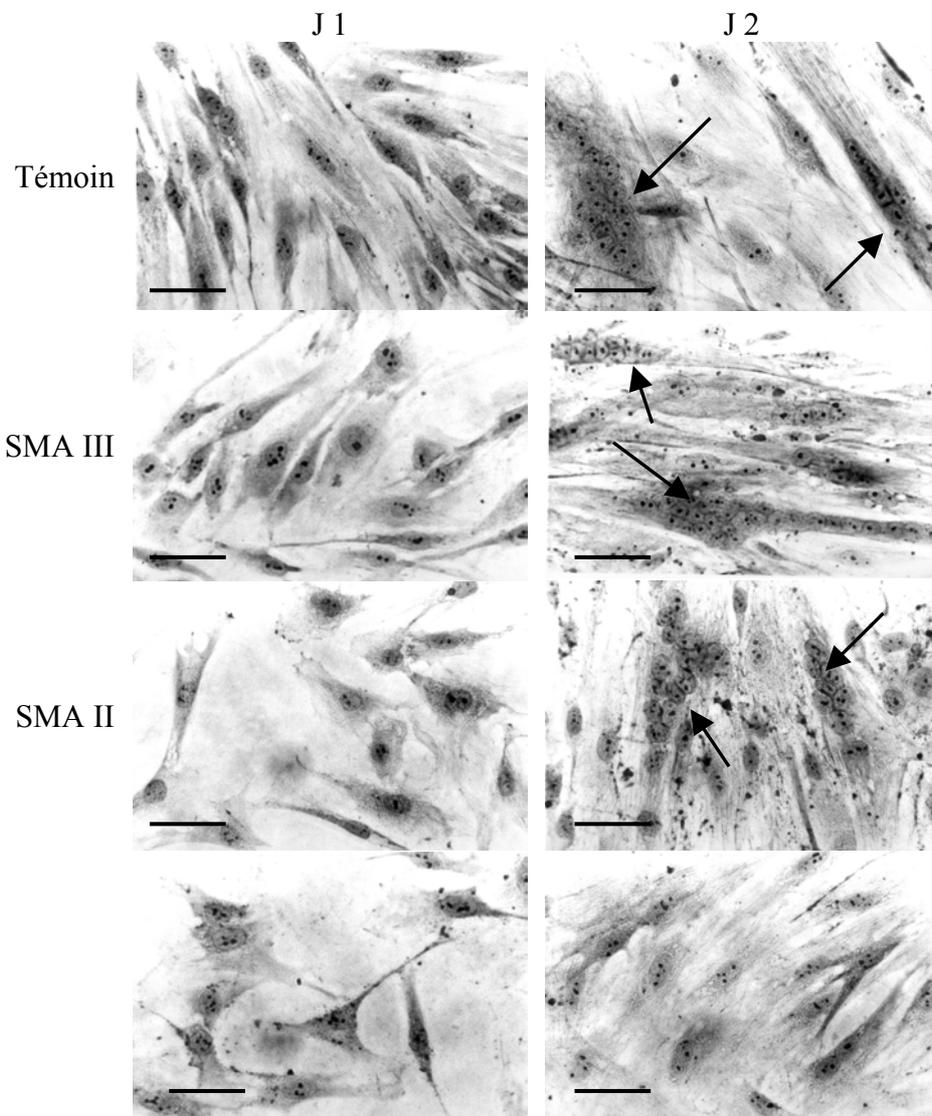


Les résultats sont représentés sous forme de moyenne \pm déviation standard (3 cultures indépendantes provenant de 3 donneurs différents). * $p < 0,05$ entre les cellules contrôles et SMA I au même jour.

Les différences entre les indices de fusion des cellules satellites musculaires témoins ou provenant de sujets atteints de SMA II et III d'une part, et l'indice de fusion des cellules musculaires satellites de sujets atteints de SMA I, de l'autre, deviennent significativement différentes entre les cellules témoin et les cellules SMA I à partir de J4.

Du reste, la simple observation des cultures en microscopie à contraste de phase met en évidence de manière flagrante la difficulté qu'ont les cellules musculaires satellites provenant de sujets atteints de SMA I à fusionner (Figure 3.15).

FIGURE 3.15.
Observation par microscopie en contraste de phase de cultures de myotubes humains.



La barre représente 12,5 μm . Les flèches désignent les myotubes.

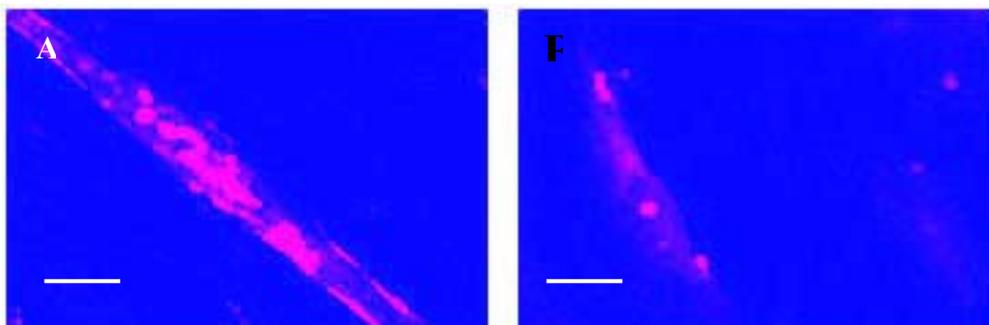
A J 5, les cultures de cellules musculaires témoin présentent des myotubes avec de très nombreux noyaux alors que les cultures de cellules SMA I ne forment que très peu de myotubes. Ainsi, les cellules musculaires satellites de patients atteints de SMA I sont incapables de fusionner correctement.

342-Induction de l'agrégation des récepteurs nicotiques par l'agrine.

Des cultures de myotubes ont été traitées par de l'agrine soluble à 2 nmol/L, puis par de l' α -Bgtx couplée au Texas Red[®]-X à 40 nmol/L. Elles ont été ensuite observées au microscope confocal afin d'y détecter l'éventuelle formation d'agrégats de RACH.

L'observation eu microscope confocal montre que l'agrine induit l'agrégation des RACH dans les myotubes témoins (Fig. 3.16 A), mais ces amas ne sont pas présents (ou en quantité de beaucoup moindre) dans les myotubes malades (Fig. 3.16 B). Ainsi, les défauts de fusion mis en évidence dans l'expérience décrites ci-dessus affectent une des étapes les plus précoces de la formation de la JNM, celle l'agrégation des RACH induite par l'agrine.

FIGURE 3.16.
Observation par microscopie confocale de l'agrégation des RACH induite par l'agrine dans une culture de myotubes humains.

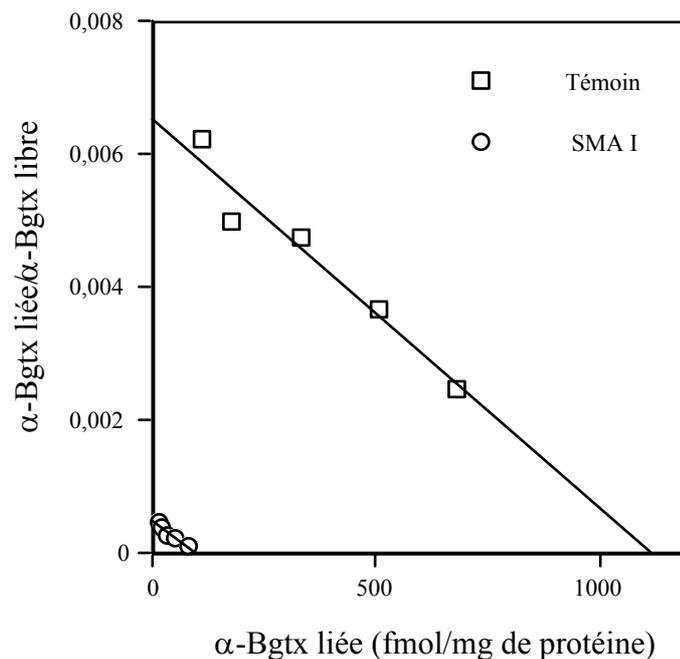


[A] Culture de myotubes humains contrôles
[B] Culture de myotubes humains SMA I
La barre représente 66,6 μ m.

343-Quantification des récepteurs de l'acétylcholine exprimés par les myotubes humains.

Le phénomène décrit au PARAGRAPHE 342 est-il dû à un défaut du mécanisme d'agrégation lui-même, ou les myotubes des patients atteints de SMA I expriment-ils moins de RACH que les myotubes témoins ? Pour répondre à cette question, des expériences de liaison spécifique ont été conduites sur différents types de myotubes en culture. La représentation de Scatchard a permis de déterminer le K_D apparent (reflétant l'affinité de l' α -Bgtx pour son récepteur), ainsi que le B_{max} (qui indique le nombre de sites de liaison de l' α -Bgtx présents dans les cultures, c'est-à-dire le nombre total de RACH exprimés) (Figure 3.17).

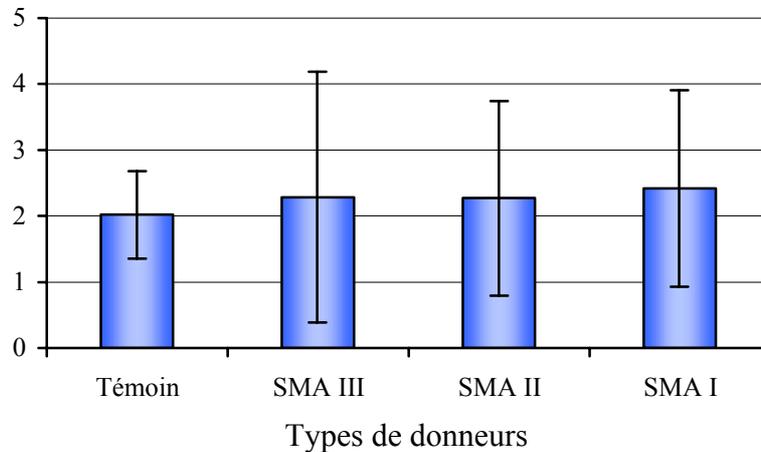
FIGURE 3.17.
Représentation de Scatchard correspondant à une expérience de liaison spécifique entre l' α -Bgtx et le RACH sur des cultures de myotubes témoin ou SMA I.



L'analyse statistique montre qu'il n'y a aucune différence significative du K_D de l' α -Bgtx d'une culture à l'autre : la maladie n'affecte donc pas l'affinité du ligand pour son récepteur. Les valeurs K_D sont du même ordre quelle que soit l'origine des cellules (Fig. 3.18).

FIGURE 3.18.

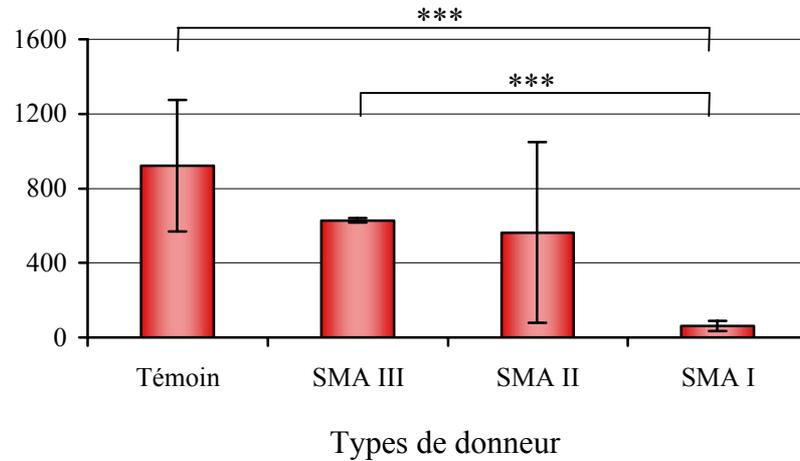
K_D de l' α -Bgtx pour son récepteur exprimé par des myotubes formés par fusion de cellules musculaires satellites provenant de sujets sains ou de patients de SMA I, SMA II ou SMA III.



Il n'existe aucune différence significative du nombre de sites de liaison de l' α -Bgtx entre myotubes provenant de patients atteints de SMA III et SMA II et myotubes provenant de témoins (Figure 3.19). On note cependant que les variations de B_{max} sont très importantes quand les cellules proviennent de sujets atteints de SMA II. En revanche, le nombre de sites de liaison de l' α -Bgtx, exprimé en fmoles de RACH par mg de protéines est significativement plus faible dans les cultures de myotubes provenant de sujets atteints de SMA I ($B_{max} = 61,36 \pm 27,56$ fmol/mg de protéines) que dans les cultures de myotubes contrôles ($B_{max} = 920,44 \pm 352,7$ fmol/mg de protéines).

En résumé, l'affinité de l' α -Bgtx pour son récepteur reste inchangée quelle que soit l'origine des myotubes, mais les cellules musculaires des patients SMA I expriment beaucoup moins de RACH (plus de 10 fois moins) que celles des témoins. Cet état de fait pourrait expliquer la moindre agrégation des RACH observée en microscopie confocale après induction du phénomène par l'agrine.

FIGURE 3.19.
Nombre total de sites de liaison de l' α -Bgtx dans des cultures de myotubes humains.



344-Discussion.

La JNM est une synapse hautement spécialisée qui sert d'interface entre les neurones et leurs cellules cibles, les muscles. Il a été prouvé que la protéine SMN jouait un rôle essentiel dans la maturation neuromusculaire, et plus précisément dans la croissance des neurites, ainsi que dans celle de la composante musculaire. La déficience des neurones et des muscles en protéines SMN semble bien contribuer à la pathogénie de la SMA (Fan et Simard, 2002).

Nous montrons ici, qu'en absence de tout élément nerveux, les cellules musculaires des patients atteints de SMA I présentent des anomalies qui peuvent affecter la formation de la JNM.

Les vésicules de la terminaison nerveuse relarguent des molécules d'ACh qui diffusent à travers la fente synaptique et activent les RACH nicotiniques de la membrane post-synaptique. Ces récepteurs doivent être présents en grande densité dans le compartiment musculaire et être placés précisément en face du site de relargage de l'ACh, afin d'assurer une transmission synaptique rapide et ordonnée. L'un des événements clés — le plus précoce dans la formation des synapses — est l'agrégation des RACH (cf PARAGRAPHE 1212 du CHAPITRE 1). Ce phénomène est soumis à une régulation spatiale et temporelle très stricte (Huh et Fuhrer, 2002 ; Sanes et Lichtman, 1999). Pendant longtemps, le nerf et ses dérivés ont été considérés comme les acteurs essentiels de la différenciation postsynaptique, et plus

particulièrement de l'agrégation des RACH. Puis il a été prouvé que le muscle joue aussi un rôle très important dans ce phénomène (Willmann et Fuhrer, 2002). En effet, les agrégats de RACH peuvent se former en l'absence de toute intervention du motoneurone : le muscle embryonnaire possède un programme de préassemblage qui lui permet de susciter l'agrégation des RACH sans intervention de la composante nerveuse de l'unité motrice (Yang *et al.*, 2001) et sans intervention de l'agrine, un protéoglycane à multidomaines. L'agrine est relarguée par le nerf, et elle intervient, on l'a vu, dans l'agrégation fine des RACH pré-existants (McMahan, 1990). Elle n'est pas nécessaire à la mise en place du préassemblage alors que MuSK l'est. Cependant, l'agrine neurale reste nécessaire pour obtenir des synapses fonctionnelles. Elle possède de très nombreuses fonctions. Elle induit la redistribution des RACH pré-existants et la synthèse de nouveaux RACH par son interaction avec la neuréguline-1 (Trinidad *et al.*, 2000). Elle interagit avec de nombreuses protéines dont la rapsyne qui est une protéine régulatrice active en amont de l'agrégation des RACH (Apel *et al.*, 1997), et MuSK qui est un élément du récepteur de l'agrine (DeChiara *et al.*, 1996 ; Jennings *et al.*, 1993 ; Valenzuela *et al.*, 1995). Toutes ces protéines sont capables de former un pré-complexe. Les myotubes possèdent donc la propriété intrinsèque d'assembler les protéines du complexe des RACH nicotiques en l'absence de tout motoneurone (Yang *et al.*, 2001). Le contact axonale ne fait que raffiner et préciser l'œuvre accomplie par le programme de préassemblage.

La présente étude a été conduite sur des cellules musculaires d'origine embryonnaire, en absence de cellules nerveuses. Elle montre que les cellules musculaires des patients atteints de SMA présentent des défauts intrinsèques. Elle confirme les résultats précédemment décrits par d'autres chercheurs du laboratoire et par nous-même, résultats qui suggéraient que, dans la SMA, les muscles squelettiques sont aussi des victimes de la déficience en protéine SMN. Nous observons que les cellules musculaires satellites de patients atteints de SMA I ne fusionnent pas correctement et qu'elles forment de très petits myotubes contenant très peu de noyaux (Figures 3.14 et 3.15). Cette observation confirme que les myotubes des patients atteints de SMA I sont immatures ; cette immaturité avait été mise en évidence par les méthodes de l'anatomopathologie au milieu des années 80 (Hausmanowa-Petrusewicz et Karwanska, 1986), sans émouvoir apparemment le milieu scientifique et médical, tout concentré qu'il était sur l'origine motoneuronale de la maladie. Il apparaît évident aujourd'hui que le degré de maturation du muscle doit être en harmonie avec le développement de l'activité motrice motoneuronale pour que la JNM se développe correctement. Si la maturation de l'un des 2 versants de l'unité motrice est plus lente, le système neuromusculaire

présentera probablement des défauts permanents (Vrbova *et al.*, 1985). Le fait que les cellules musculaires des patients atteints de SMA I expriment moins de RACH et forment de ce fait moins d'agrégats (Figure 3.16, Figure 3.19) suggère que les JNM ne peuvent pas s'installer correctement. Comme cet événement survient très précocement au cours du développement, nos résultats suggèrent que la SMA est une maladie embryo-fœtale. Le déficit des myotubes en agrégats est dû à une sous-expression des RACH (Figure 3.19), non à un déficit fonctionnel de ces derniers, car, dans des cellules musculaires provenant de sujets atteints de SMA, l'affinité de l' α -Bgtx pour ces récepteurs reste identique à celle qu'elle présente pour des RACH exprimés par des cellules musculaires provenant de sujets sains (Figure 3.18). La neuréguline-1 est capable d'induire la transcription des sous-unités de RACH nicotiques dans les myotubes (Fischbach et Rosen, 1997). Il serait donc intéressant d'associer cette protéine à de l'agrine soluble dans des expériences d'agrégation des RACH induite par cette dernière et de rechercher un éventuel effet de cette combinaison de molécules sur l'expression des RACH par des myotubes malades. Il est intéressant de noter que l'estimation électrophysiologique du nombre d'unités motrices chez des patients atteints de SMA indique que ce nombre est fortement diminué — ce qui est tout à compréhensible — mais qu'il n'y a pas de corrélation entre son degré de diminution et la sévérité des symptômes ; cette absence de corrélation serait à mettre au compte de l'existence d'unités motrices de grandes tailles, à potentiel très élevé, indice d'une réinnervation, ou d'anomalies de distribution des RACH (Galea *et al.*, 2001).

En résumé, dans la SMA, il existe une anomalie d'expression des RACH par les cellules musculaires. Il est probable que l'étape de la synaptogenèse qui est affectée est l'étape la plus précoce, celle qui commence dans le muscle. Pour modestes qu'elles soient, nos observations ouvrent des perspectives thérapeutiques : elles suggèrent que la restauration d'un niveau d'expression suffisant de la protéine SMN dans le muscle pourrait être un moyen de lutter contre les effets de la maladie, et font de ce tissu une cible de choix pour la thérapie génique de cette affection.

Ces résultats ont fait l'objet de la Publication n° 3.

4-CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Les résultats présentés dans ce manuscrit laissent entrevoir une série d'outils disponibles pour continuer le sujet, et nécessaires pour approfondir les nombreux points abordés.

Le premier outil dont nous disposons au laboratoire est le modèle d'étude lui-même, le système de coculture hétérologue qui permet de reconstituer une unité motrice fonctionnelle *in vitro*. Il pourrait facilement être utilisé pour faire un criblage de différents agents pharmacologiques dans un but thérapeutique par exemple. Différentes molécules permettant l'inclusion de l'exon 7 dans la protéine SMN ont déjà été identifiées, il doit en exister de nombreuses autres.

Nous disposons aussi d'une construction plasmidique possédant le gène responsable de la maladie que nous avons baptisée pEGFP-C3/SMN et que nous avons validé dans des cellules musculaires humaines primaires. Nous pensons que cette construction pourrait être utilisée avec profit pour de nombreuses études *in vitro*.

Nous avons identifié un vecteur de transfection très efficace sur des cellules musculaires satellites humaines en culture primaire, le FuGENE 6. Ce vecteur n'est pas toxique pour ces cellules. Les taux de transfection que nous avons observés (cf. PARAGRAPHE 32 du CHAPITRE 3) sont très encourageants ; on pourrait même considérer qu'ils serviraient de référence pour les équipes désireuses de transférer des cellules musculaires primaires, et notamment humaines.

Ces outils étant disponibles, nous avons pu les utiliser pour aborder le sujet de fond de ce travail de thèse : l'effet de l'expression de la protéine SMN dans des cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA. Nous montrons que la transfection de ces cellules par le plasmide pEGFP-C3/SMN y provoquerait très probablement une augmentation de l'expression de la protéine SMN ou en tout cas leur restituerait un phénotype normal, *in vitro*. Pour être validé, ce résultat devrait être complété par une série d'expériences utilisant des oligonucléotides antisens afin d'étudier l'effet de l'absence complète du gène *SMN* sur le comportement des cellules musculaires. Cette expérience serait difficile à mettre en place en raison de l'épissage tellement particulier des gènes *SMN*, mais elle constituerait un contrôle négatif indispensable à tout résultat. De plus, il nous faudrait connaître le niveau d'expression de la protéine SMN introduite dans les cellules. Pour cela, la technique d'immuno-empreinte de type Western blot suivie d'une analyse densitométrique des bandes obtenues après révélation sur film pourrait être utilisée. La différence d'intensité entre des cellules transfectées par le vecteur pEGFP-C3 seul ou par pEGFP-C3/SMN permettrait d'obtenir cette valeur. Nous avons commencé une telle étude, mais l'épitope de l'anticorps anti-SMN que

nous utilisons était situé dans la région amino-terminale de la protéine, à l'endroit où est greffée la séquence de l'EGFP. L'encombrement stérique dû à cette dernière empêche très probablement la liaison de l'anticorps à sa cible. C'est pourquoi nous avons construit un plasmide pEGFP-N1/SMN dans lequel le gène SMN est cloné en 3' de la séquence de l'EGFP pour que dans la protéine de fusion qui en résulte, la séquence amino-terminale de la protéine SMN soit accessible. Cette construction est en cours de séquençage et permettra d'étudier le niveau d'expression de SMN dans les cellules transfectées. Nous pourrions également envisager de doser la quantité de protéine SMN exprimée par les cellules transfectées par une technique de type ELISA, une technique quantitative plus précise et plus directe que l'analyse densitométrique des bandes.

Nous confirmons également dans cette étude que le muscle est probablement impliqué dans la pathogénie de la maladie en mettant en évidence des défauts fonctionnels jusqu'alors non reconnus ou peu reconnus, défauts qui semblent perturber l'installation d'une JNM normale. Ces expériences doivent également être complétées. En effet, nous observons un défaut de fusion des cellules musculaires malades, mais il nous faut en étudier les mécanismes biologiques. Il semble que l'expression du facteur de transcription myf 5, un facteur myogénique impliqué dans la fusion des myoblastes soit défectueux chez les malades (Guettier-Sigrist *et al.*, 2001) ce qui entraînerait un défaut de maturation des cellules musculaires. L'utilisation d'oligonucléotides antisens devrait permettre de savoir si SMN est indispensable ou non à la différenciation des cellules musculaires et à la survie des cocultures. Ceci viendrait renforcer le concept de l'implication musculaire dans la pathogénie de la SMA. De plus, il nous faut maintenant aller plus en amont dans la cascade de réactions induites par l'agrine, aboutissant à l'agrégation des RACH. Nous avons mis en évidence un défaut d'expression des RACH, mais qu'en est-il des autres protéines comme MuSK ou la rapsyne? Des expériences d'immunocytochimie pourraient être envisagées pour comparer l'expression de ces protéines entre les cellules normales et malades. La neuréguline 1 active l'expression des sous-unités des RACH. Un défaut de cette protéine pourrait être impliqué dans le manque d'expression des RACH, et l'ajout de neuréguline-1 soluble en même temps que l'agrine dans le milieu de culture des myotubes avant le dosage des RACH pourrait avoir un effet positif sur leur expression.

Les résultats présentés ici ouvrent tout un champ de perspectives thérapeutiques pour les malades. Les travaux du laboratoire et ceux menés par l'équipe de J.Melki suggèrent que la thérapie devrait s'adresser au versant musculaire de l'unité motrice. Le muscle étant, de

surcroît, plus accessible que le système nerveux, cette approche est pleine de promesses. Dans ce contexte, il convient de considérer néanmoins un certain nombre de barrières, telles que la nécessité de transférer efficacement le gène thérapeutique dans de larges territoires musculaires, la persistance d'expression de SMN requise et l'impact immunologique de l'expression de SMN chez des sujets jusqu'alors déficients en SMN.

Pour cibler le tissu musculaire, nous avons envisagé dans un premier temps de mettre au point un protocole de transfection *ex vivo* suivi d'un MTT en l'évaluant chez des animaux désormais disponibles et qui miment la maladie. Mais la thérapie cellulaire s'est révélée peu efficace comme le montrent les essais de greffe de myoblastes appliqués à la myopathie de Duchenne (Partridge, 2002 ; Hodgetts *et al.*, 2000). La thérapie génique est une alternative visant à introduire directement le gène dans des organismes malades. Des résultats récents (Zhang *et al.*, 2001), montrent que l'injection intra-artérielle de plasmide dans les membres de singe permet de transférer efficacement le transgène dans l'ensemble de la musculature considérée. Ceci laisse envisager que cette technique pourrait être appliquée à différents types de maladies neuromusculaires, et donc à la SMA. Dans notre cas, nous pourrions utiliser une construction plasmidique renfermant le cDNA du gène *SMN* sous la dépendance d'un promoteur spécifique du muscle, injectée par voie intra-vasculaire. C'est cette stratégie qui est poursuivie dans le cas de la thérapie génique de la myopathie de Duchenne (Thioudellet *et al.*, 2002 ; Romero *et al.*, 2002), une maladie héréditaire purement musculaire.

En ce qui concerne la durée d'expression de la protéine SMN, dans notre étude, le cDNA du gène *SMN* introduit dans les cellules musculaires est sous la dépendance du promoteur du CMV. Or, celui-ci ne permet qu'une expression transitoire de la protéine *in vitro* (Qin *et al.*, 1997). Une nouvelle construction devrait être envisagée, dans laquelle le promoteur du CMV serait remplacé par un promoteur spécifique du muscle, comme celui de la desmine, ou de la chaîne lourde de la myosine. Il serait également possible d'y introduire des séquences comme les régions LCR [*locus control region*] permettant une expression tissu-spécifique mais dépendante du nombre de copies (Li *et al.*, 1999). Dans ce cas, le niveau d'expression de SMN augmenterait au cours de la différenciation cellulaire ou pourrait se maintenir. Ceci améliorerait l'efficacité du traitement. Le vecteur de transfection utilisé étant non-viral, il y a très peu de risque qu'un phénomène d'intégration indésirable se produise (Ledwith *et al.*, 2000).

Cependant, les cocultures sont réalisées à partir de cellules musculaires transfectées, puis sélectionnées au moyen de la G418. Il peut s'écouler 3 semaines à 1 mois (selon les donneurs) entre le jour de la transfection et le jour de l'innervation. Or, malgré ce délai, le

phénotype des cellules musculaires semble être amélioré. Des analyses au FACS ont montré qu'au moins 70 % des cellules exprimaient l'EGFP après 3 semaines de sélection. Séverine Guettier-Sigrist avait démontré au laboratoire que 50 % de cellules musculaires saines ajoutées à des cellules malades aboutissaient à la formation d'hétéromyotubes qui ne dégénéraient pas après innervation (Guettier-Sigrist *et al.*, 1998). Il se pourrait qu'un très faible taux d'intégration du cDNA du gène *SMN* dans le génome des cellules transfectées *in vitro* suivi d'une sélection puis une amplification assez importante de ces cellules, suffisent à changer le phénotype de celles-ci. Dans un contexte *in vivo*, cela équivaldrait à considérer qu'une transfection même peu efficace des cellules musculaires permettrait de produire un effet bénéfique pour la SMA.

Risque immunologique : l'introduction d'une protéine normale chez des malades qui ne l'ont jamais exprimée pourrait induire une réaction immunitaire de rejet de cette protéine et donc des cellules qui l'expriment. Comme nous l'avons vu dans l'INTRODUCTION, l'apparition du phénotype SMA résulte de 2 phénomènes : la mutation de *SMN1* et l'épissage alternatif de *SMN2* conduisant principalement à la production de la forme tronquée SMN Δ 7 de la protéine. Il en résulte une quantité insuffisante de protéine complète SMN non compensée par le produit du gène *SMN1*, la forme tronquée SMN Δ 7 étant prédominante. Cependant, la forme intacte SMN est présente de façon endogène, certes en quantité fonctionnellement non efficace, mais tout de même probablement tolérogène. La protéine SMN introduite de façon exogène ne serait donc pas immunogène, et le risque qu'elle soit rejetée est donc très faible.

Nous nous proposons de montrer que l'induction de l'expression de la protéine SMN après transfection, dans des cellules musculaires provenant de patients atteints de SMA, a un effet bénéfique sur leur phénotype pathologique en culture. L'étude des amyotrophies spinales progressives par cette approche qui a commencé il y a moins de 10 ans au laboratoire est innovante, nous l'avons déjà souligné, puisque tous les chercheurs travaillant sur cette maladie la considéraient comme une maladie du motoneurone et uniquement du motoneurone. Or, dans l'organisme, un motoneurone fonctionnel est toujours connecté à sa cible, le muscle, et par conséquent, le dialogue entre ces partenaires est primordial. Les résultats que nous présentons ici constituent un pas supplémentaire en vue d'une thérapie génique des SMA.

Celle-ci pourrait consister à délivrer le gène *SMN* dans les muscles pour contribuer à rétablir un dialogue normal entre le muscle et les motoneurons qui l'innervent, préservant ainsi les unités motrices.

5-BIBLIOGRAPHIE.

- Acsadi G., Dickson G., Love D.R., Jani A., Walsh F.S., Gurusinghe A., Wolff J.A. et Davies K.E.
Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs.
Nature **352**: 815-8, 1991.
- Aerbajinai W., Ishihara T., Arahata K. et Tsukahara T.
Increased expression level of the splicing variant of SIP1 in motor neuron diseases.
Int J Biochem Cell Biol **34**: 699-707, 2002.
- Affleck D.G., Yu L., Bull D.A., Bailey S.H. et Kim S.W.
Augmentation of myocardial transfection using TerplexDNA: a novel gene delivery system.
Gene Ther **8**: 349-53, 2001.
- Akutsu T., Nishio H., Sumino K., Takeshima Y., Tsuneishi S., Wada H., Takada S., Matsuo M. et Nakamura H.
Molecular genetics of spinal muscular atrophy: contribution of the NAIP gene to clinical severity.
Kobe J Med Sci **48**: 25-31, 2002.
- Andreassi C., Jarecki J., Zhou J., Coovert D.D., Monani U.R., Chen X., Whitney M., Pollok B., Zhang M., Androphy E. et Burghes A.H.
Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients.
Hum Mol Genet **10**: 2841-9, 2001.
- Apel E.D., Glass D.J., Moscoso L.M., Yancopoulos G.D. et Sanes J.R.
Rapsyn is required for MuSK signaling and recruits synaptic components to a MuSK-containing scaffold.
Neuron **18**: 623-35, 1997.
- Araki S., Hayashi M., Tamagawa K., Saito M., Kato S., Komori T., Sakakihara Y., Mizutani T. et Oda M.
Neuropathological analysis in spinal muscular atrophy type II.
Acta Neuropathol **25**: 25, 2003.
- Ardehali A., Fyfe A., Laks H., Drinkwater D.C., Jr., Qiao J.H. et Lusic A.J.
Direct gene transfer into donor hearts at the time of harvest.
J Thorac Cardiovasc Surg **109**: 716-9; discussion 719-20, 1995.
- Arnold A.S., Gueye M., Ronde P., Warter J.M., Poindron P. et Gies J.P.
Construction of a plasmid containing human SMN, the SMA determining gene, coupled to EGFP.
Plasmid **47**: 79-87, 2002.
- Askanas V. et Engel W.K.
A new program for investigating adult human skeletal muscle grown aneurally in tissue culture.
Neurology **25**: 58-67, 1975.
- Askanas V. et Gallez-Hawkins G.
Synergistic influence of polypeptide growth factors on cultured human muscle.
Arch Neurol **42**: 749-52, 1985.
- Askanas V., Kwan H., Alvarez R.B., Engel W.K., Kobayashi T., Martinuzzi A. et Hawkins E.F.
De novo neuromuscular junction formation on human muscle fibres cultured in monolayer and innervated by foetal rat spinal cord: ultrastructural and ultrastructural--cytochemical studies.
J Neurocytol **16**: 523-37, 1987.
- Aupeix K., Hugel B., Martin T., Bischoff P., Lill H., Pasquali J.L. et Freyssinet J.M.
The significance of shed membrane particles during programmed cell death in vitro, and in vivo, in HIV-1 infection.
J Clin Invest **99**: 1546-54, 1997.
- Baccon J., Pellizzoni L., Rappsilber J., Mann M. et Dreyfuss G.
Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex.
J Biol Chem **277**: 31957-62, 2002.

- Bach J.R., Vega J., Majors J. et Friedman A.
Spinal muscular atrophy type 1 quality of life.
Am J Phys Med Rehabil **82**: 137-42, 2003.
- Barth S., Liss M., Voss M.D., Dobner T., Fischer U., Meister G. et Grasser F.A.
Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 binds via its methylated arginine-glycine repeat to the survival motor neuron protein.
J Virol **77**: 5008-13, 2003.
- Battaglia G., Princivalle A., Forti F., Lizier C. et Zeviani M.
Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system.
Hum Mol Genet **6**: 1961-71, 1997.
- Behr J.
The proton sponge - a trick to enter cells the viruses did not exploit.
CHIMIA **51**: 34-36, 1997.
- Berger A., Mayr J.A., Meierhofer D., Fotschl U., Bittner R., Budka H., Grethen C., Huemer M., Kofler B. et Sperl W.
Severe depletion of mitochondrial DNA in spinal muscular atrophy.
Acta Neuropathol (Berl) **105**: 245-51, 2003.
- Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G. et Thompson C.B.
bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.
Cell **74**: 597-608, 1993.
- Borges L.S. et Ferns M.
Agrin-induced phosphorylation of the acetylcholine receptor regulates cytoskeletal anchoring and clustering.
J Cell Biol **153**: 1-12, 2001.
- Borges L.S., Lee Y. et Ferns M.
Dual role for calcium in agrin signaling and acetylcholine receptor clustering.
J Neurobiol **50**: 69-79, 2002.
- Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., Mergny M.D., Scherman D., Demeneix B. et Behr J.P.
A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.
Proc Natl Acad Sci U S A **92**: 7297-301, 1995.
- Boussif O., Zanta M.A. et Behr J.P.
Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold.
Gene Ther **3**: 1074-80, 1996.
- Boussif O., Gaucheron J., Boulanger C., Santaella C., Kolbe H.V. et Vierling P.
Enhanced in vitro and in vivo cationic lipid-mediated gene delivery with a fluorinated glycerophosphoethanolamine helper lipid.
J Gene Med **3**: 109-14, 2001.
- Bowie K.M. et Chang P.L.
Development of engineered cells for implantation in gene therapy.
Adv Drug Deliv Rev **33**: 31-43, 1998.
- Brahe C., Clermont O., Zappata S., Tiziano F., Melki J. et Neri G.
Frameshift mutation in the survival motor neuron gene in a severe case of SMA type I.
Hum Mol Genet **5**: 1971-6, 1996.
- Brahe C.
Copies of the survival motor neuron gene in spinal muscular atrophy: the more, the better.
Neuromuscul Disord **10**: 274-5, 2000.

- Brahms H., Meheus L., de Brabandere V., Fischer U. et Luhrmann R.
Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSm4, and their interaction with the SMN protein.
Rna **7**: 1531-42, 2001.
- Branlant C., Krol A., Ebel J.P., Lazar E., Haendler B. et Jacob M.
U2 RNA shares a structural domain with U1, U4, and U5 RNAs.
Embo J **1**: 1259-65, 1982.
- Braun S., Askanas V. et Engel W.K.
Different degradation rates of junctional and extrajunctional acetylcholine receptors of human muscle cultured in monolayer and innervated by fetal rat spinal cord neurons.
Int. J. Dev. Neurosci. **10**: 37-44, 1992.
- Braun S., Croizat B., Lagrange M.C., Warter J.M. et Poindron P.
Constitutive muscular abnormalities in culture in spinal muscular atrophy.
Lancet **345**: 694-5, 1995.
- Braun S., Croizat B., Lagrange M.C., Warter J.M. et Poindron P.
Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures.
J Neurol Sci **136**: 17-23, 1996.
- Braun S., Croizat B., Lagrange M.C., Poindron P. et Warter J.M.
Degeneration of cocultures of spinal muscular atrophy muscle cells and rat spinal cord explants is not due to secreted factors and cannot be prevented by neurotrophins.
Muscle Nerve **20**: 953-60, 1997.
- Broccolini A., Engel W.K. et Askanas V.
Localization of survival motor neuron protein in human apoptotic-like and regenerating muscle fibers, and neuromuscular junctions.
Neuroreport **10**: 1637-41, 1999.
- Brzustowicz L.M., Lehner T., Castilla L.H., Penchaszadeh G.K., Wilhelmsen K.C., Daniels R., Davies K.E., Leppert M., Ziter F., Wood D. et al.
Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3.
Nature **344**: 540-1., 1990.
- Buhler D., Raker V., Luhrmann R. et Fischer U.
Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy.
Hum Mol Genet **8**: 2351-7, 1999.
- Burd C.G. et Dreyfuss G.
Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins.
Science **265**: 615-21, 1994.
- Burgess R.W., Nguyen Q.T., Son Y.J., Lichtman J.W. et Sanes J.R.
Alternatively spliced isoforms of nerve- and muscle-derived agrin: their roles at the neuromuscular junction.
Neuron **23**: 33-44, 1999.
- Burglen L., Amiel J., Viollet L., Lefebvre S., Burlet P., Clermont O., Raclin V., Landrieu P., Verloes A., Munnich A. et Melki J.
Survival motor neuron gene deletion in the arthrogryposis multiplex congenita-spinal muscular atrophy association.
J Clin Invest **98**: 1130-2, 1996 a.
- Burglen L., Lefebvre S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Cruaud C., Munnich A. et Melki J.
Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene.
Genomics **32**: 479-82, 1996 b.

- Burglen L., Patel S., Dubowitz V. et Melki J.
A novel point mutation in the SMN gene in a patient with type III spinal muscular atrophy.
First congress of the World Muscle Society, 1996 c.
- Burglen L., Seroz T., Miniou P., Lefebvre S., Burlet P., Munnich A., Pequignot E.V., Egly J.M. et Melki J.
The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease.
Am J Hum Genet **60**: 72-9, 1997.
- Burkin D.J., Kim J.E., Gu M. et Kaufman S.J.
Laminin and alpha7beta1 integrin regulate agrin-induced clustering of acetylcholine receptors.
J Cell Sci **113**: 2877-86, 2000.
- Burlet P., Huber C., Bertrand S., Ludosky M.A., Zwaenepoel I., Clermont O., Roume J., Delezoide A.L., Cartaud J., Munnich A. et Lefebvre S.
The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy.
Hum Mol Genet **7**: 1927-33, 1998.
- Bussaglia E., Clermont O., Tizzano E., Lefebvre S., Burglen L., Cruaud C., Urtizbera J.A., Colomer J., Munnich A., Baiget M et al.
A frame-shift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients.
Nat Genet **11**: 335-7, 1995.
- Campbell L., Potter A., Ignatius J., Dubowitz V. et Davies K.
Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype.
Am J Hum Genet **61**: 40-50, 1997.
- Campeau P., Chapdelaine P., Seigneurin-Venin S., Massie B. et Tremblay J.P.
Transfection of large plasmids in primary human myoblasts.
Gene Ther **8**: 1387-94, 2001.
- Carlsson L., Nystrom L.E., Sundkvist I., Markey F. et Lindberg U.
Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells.
J Mol Biol **115**: 465-83, 1977.
- Carter T.A., Bonnemann C.G., Wang C.H., Obici S., Parano E., De Fatima Bonaldo M., Ross B.M., Penchaszadeh G.K., Mackenzie A., Soares M.B., Kunkel L.M. et Gilliam T.C.
A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions.
Hum Mol Genet **6**: 229-36, 1997.
- Chan C.K., Hubner S., Hu W. et Jans D.A.
Mutual exclusivity of DNA binding and nuclear localization signal recognition by the yeast transcription factor GAL4: implications for nonviral DNA delivery.
Gene Ther **5**: 1204-12, 1998.
- Chan C.K. et Jans D.A.
Enhancement of MSH receptor- and GAL4-mediated gene transfer by switching the nuclear import pathway.
Gene Ther **8**: 166-71, 2001.
- Chang J.G., Hsieh-Li H.M., Jong Y.J., Wang N.M., Tsai C.H. et Li H.
Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate.
Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 9808-13, 2001.
- Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R.A., Shevchenko A., Mann M. et Dreyfuss G.
Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems.
J Cell Biol **147**: 1181-94, 1999.

- Charroux B., Pellizzoni L., Perkinson R.A., Yong J., Shevchenko A., Mann M. et Dreyfuss G.
Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli.
J Cell Biol **148**: 1177-86, 2000.
- Chen Q., Baird S.D., Mahadevan M., Besner-Johnston A., Farahani R., Xuan J., Kang X., Lefebvre C., Ikeda J.E., Korneluk R.G. et MacKenzie A.E.
Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP.
Genomics **48**: 121-7, 1998.
- Choi J.S., Lee E.J., Jang H.S. et Park J.S.
New cationic liposomes for gene transfer into mammalian cells with high efficiency and low toxicity.
Bioconjug Chem **12**: 108-13, 2001.
- Ciftci K. et Levy R.J.
Enhanced plasmid DNA transfection with lysosomotropic agents in cultured fibroblasts.
Int J Pharm **218**: 81-92, 2001.
- Cifuentes-Diaz C., Frugier T., Tiziano F.D., Lacene E., Roblot N., Joshi V., Moreau M.H. et Melki J.
Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy.
J Cell Biol **152**: 1107-14, 2001.
- Clermont O., Burlet P., Cruaud C., Bertrand S., Melki J., Munnich A. et Lefebvre S.
Mutation analysis of the SMN gene in undelated SMA patients.
Am J Hum Genet **61**: A329, 1997.
- Colin M., Moritz S., Fontanges P., Kornprobst M., Delouis C., Keller M., Miller A.D., Capeau J., Coutelle C. et Brahimi-Horn M.C.
The nuclear pore complex is involved in nuclear transfer of plasmid DNA condensed with an oligolysine-RGD peptide containing nuclear localisation properties.
Gene Ther **8**: 1643-53, 2001.
- Coovert D.D., Le T.T., McAndrew P.E., Strasswimmer J., Crawford T.O., Mendell J.R., Coulson S.E., Androphy E.J., Prior T.W. et Burghes A.H.
The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy.
Hum Mol Genet **6**: 1205-14, 1997.
- Corcia P., Mayeux-Portas V., Khoris J., de Toffol B., Autret A., Muh J.P., Camu W. et Andres C.
Abnormal SMN1 gene copy number is a susceptibility factor for amyotrophic lateral sclerosis.
Ann Neurol **51**: 243-6, 2002.
- Cormack B.P., Valdivia R.H. et Falkow S.
FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).
Gene **173**: 33-8, 1996.
- Crawford T.O. et Skolasky R.L., Jr.
The relationship of SMN to amyotrophic lateral sclerosis.
Ann Neurol **52**: 857-8; author reply 858-61., 2002.
- Crystal R.G.
Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.
Science **270**: 404-10, 1995.
- Daniels R.J., Suthers G.K., Morrison K.E., Thomas N.H., Francis M.J., Mathew C.G., Loughlin S., Heiberg A., Wood D., Dubowitz V. et al.
Prenatal prediction of spinal muscular atrophy.
J Med Genet **29**: 165-70, 1992.
- Das R., Zhou Z. et Reed R.
Functional association of U2 snRNP with the ATP-independent spliceosomal complex E.
Mol Cell **5**: 779-87, 2000.

- De Robertis E.M.
Nucleocytoplasmic segregation of proteins and RNAs.
Cell **32**: 1021-5, 1983.
- DeChiara T.M., Bowen D.C., Valenzuela D.M., Simmons M.V., Poueymirou W.T., Thomas S., Kinetz E., Compton D.L., Rojas E., Park J.S., Smith C., DiStefano P.S., Glass D.J., Burden S.J. et Yancopoulos G.D.
The receptor tyrosine kinase MuSK is required for neuromuscular junction formation in vivo.
Cell **85**: 501-12, 1996.
- Deveraux Q.L. et Reed J.C.
IAP family proteins--suppressors of apoptosis.
Genes Dev **13**: 239-52, 1999.
- DiDonato C.J., Chen X.N., Noya D., Korenberg J.R., Nadeau J.H. et Simard L.R.
Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene.
Genome Res **7**: 339-52, 1997.
- DiDonato C.J., Parks R.J. et Kothary R.
Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy.
Hum Gene Ther **14**: 179-88, 2003.
- Dodds E., Dunckley M.G., Naujoks K., Michaelis U. et Dickson G.
Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER.
Gene Ther **5**: 542-51., 1998.
- Dreyfuss G., Matunis M.J., Pinol-Roma S. et Burd C.G.
hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA.
Annu Rev Biochem **62**: 289-321, 1993.
- Dubowitz V.
Muscle disorders in childhood.
London, WB Saunders, 1978
- Echaniz-Laguna A., Miniou P., Bartholdi D. et Melki J.
The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements.
Am J Hum Genet **64**: 1365-70, 1999.
- Echaniz-Laguna A., Guiraud-Chaumeil C., Tranchant C., Reeber A., Melki J. et Warter J.M.
Homozygous exon 7 deletion of the SMN centromeric gene (SMN2): a potential susceptibility factor for adult-onset lower motor neuron disease.
J Neurol **249**: 290-3, 2002.
- Erbacher P., Bousser M.T., Raimond J., Monsigny M., Midoux P. et Roche A.C.
Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages.
Hum Gene Ther **7**: 721-9, 1996.
- Fan L. et Simard L.R.
Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development.
Hum Mol Genet **11**: 1605-14, 2002.
- Feldkotter M., Schwarzer V., Wirth R., Wienker T.F. et Wirth B.
Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy.
Am J Hum Genet **70**: 358-68, 2002.

- Felgner P.L. et Ringold G.M.
Cationic liposome-mediated transfection.
Nature **337**: 387-8, 1989.
- Ferrari S., Moro E., Pettenazzo A., Behr J.P., Zacchello F. et Scarpa M.
ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo.
Gene Ther **4**: 1100-6, 1997.
- Fidzianska A. et Rafalowska J.
Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses.
Acta Neuropathol (Berl) **104**: 363-8, 2002.
- Finsinger D., Remy J.S., Erbacher P., Koch C. et Plank C.
Protective copolymers for nonviral gene vectors: synthesis, vector characterization and application in gene delivery.
Gene Ther **7**: 1183-92, 2000.
- Fischbach G.D. et Rosen K.M.
ARIA: a neuromuscular junction neuregulin.
Annu Rev Neurosci **20**: 429-58, 1997.
- Fischer A.
Cautious advance. Gene therapy is more complex than anticipated.
EMBO Rep **1**: 294-6, 2000.
- Fischer U., Liu Q. et Dreyfuss G.
The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis.
Cell **90**: 1023-9, 1997.
- Francis M.J., Morrison K.E., Campbell L., Grewal P.K., Christodoulou Z., Daniels R.J., Monaco A.P., Frischauf A.M., McPherson J., Wasmuth J. et al.
A contig of non-chimaeric YACs containing the spinal muscular atrophy gene in 5q13.
Hum Mol Genet **2**: 1161-7, 1993.
- Friesen W.J. et Dreyfuss G.
Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN).
J Biol Chem **275**: 26370-5, 2000.
- Friesen W.J., Paushkin S., Wyce A., Massenet S., Pesiridis G.S., Van Duyne G., Rappsilber J., Mann M. et Dreyfuss G.
The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins.
Mol Cell Biol **21**: 8289-300, 2001.
- Frugier T., Tiziano F.D., Cifuentes-Diaz C., Miniou P., Roblot N., Dierich A., Le Meur M. et Melki J.
Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy.
Hum Mol Genet **9**: 849-58, 2000.
- Fu X.D. et Maniatis T.
Factor required for mammalian spliceosome assembly is localized to discrete regions in the nucleus.
Nature **343**: 437-41, 1990.
- Fuhrer C., Gautam M., Sugiyama J.E. et Hall Z.W.
Roles of rapsyn and agrin in interaction of postsynaptic proteins with acetylcholine receptors.
J Neurosci **19**: 6405-16, 1999.
- Galea V., Fehlings D., Kirsch S. et McComas A.
Depletion and sizes of motor units in spinal muscular atrophy.
Muscle Nerve **24**: 1168-72, 2001.

- Gambardella A., Mazzei R., Toscano A., Annesi G., Pasqua A., Annesi F., Quattrone F., Oliveri R.L., Valentino P., Bono F., Aguglia U., Zappia M., Vita G. et Quattrone A.
Spinal muscular atrophy due to an isolated deletion of exon 8 of the telomeric survival motor neuron gene.
Ann Neurol **44**: 836-9, 1998.
- Gao X. et Huang L.
Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations.
Biochemistry **35**: 1027-36, 1996.
- Gaucheron J., Wong T., Wong K.F., Maurer N. et Cullis P.R.
Synthesis and properties of novel tetraalkyl cationic lipids.
Bioconjug Chem **13**: 671-5, 2002.
- Gautam M., Noakes P.G., Mudd J., Nichol M., Chu G.C., Sanes J.R. et Merlie J.P.
Failure of postsynaptic specialization to develop at neuromuscular junctions of rapsyn-deficient mice.
Nature **377**: 232-6, 1995.
- Gautam M., DeChiara T.M., Glass D.J., Yancopoulos G.D. et Sanes J.R.
Distinct phenotypes of mutant mice lacking agrin, MuSK, or rapsyn.
Brain Res Dev Brain Res **114**: 171-8, 1999.
- Gennarelli M., Lucarelli M., Capon F., Pizzuti A., Merlini L., Angelini C., Novelli G. et Dallapiccola B.
Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients.
Biochem Biophys Res Commun **213**: 342-8, 1995.
- Germain-Desprez D., Brun T., Rochette C., Semionov A., Rouget R. et Simard L.R.
The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation.
Gene **279**: 109-17, 2001.
- Gesemann M., Cavalli V., Denzer A.J., Brancaccio A., Schumacher B. et Ruegg M.A.
Alternative splicing of agrin alters its binding to heparin, dystroglycan, and the putative agrin receptor.
Neuron **16**: 755-67., 1996.
- Giesemann T., Rathke-Hartlieb S., Rothkegel M., Bartsch J.W., Buchmeier S., Jockusch B.M. et Jockusch H.
A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems.
J Biol Chem **274**: 37908-14, 1999.
- Gilliam T.C., Brzustowicz L.M., Castilla L.H., Lehner T., Penchaszadeh G.K., Daniels R.J., Byth B.C., Knowles J., Hislop J.E., Shapira Y. et al.
Genetic homogeneity between acute and chronic forms of spinal muscular atrophy.
Nature **345**: 823-5, 1990.
- Glass D.J., Bowen D.C., Stitt T.N., Radziejewski C., Bruno J., Ryan T.E., Gies D.R., Shah S., Mattsson K., Burden S.J., DiStefano P.S., Valenzuela D.M., DeChiara T.M. et Yancopoulos G.D.
Agrin acts via a MuSK receptor complex.
Cell **85**: 513-23, 1996.
- Godbey W.T., Wu K.K., Hirasaki G.J. et Mikos A.G.
Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency.
Gene Ther **6**: 1380-8, 1999.
- Gonzales M., Haan K., Baker S.E., Fitchmun M., Todorov I., Weitzman S. et Jones J.C.
A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation.
Mol Biol Cell **10**: 259-70, 1999.
- Gotz R., Karch C., Digby M.R., Troppmair J., Rapp U.R. et Sendtner M.
The neuronal apoptosis inhibitory protein suppresses neuronal differentiation and apoptosis in PC12 cells.
Hum Mol Genet **9**: 2479-89, 2000.

- Greensmith L. et Vrbova G.
Neuromuscular contacts in the developing rat soleus depend on muscle activity.
Brain Res Dev Brain Res **62**: 121-9, 1991.
- Greensmith L. et Vrbova G.
Alterations of nerve-muscle interaction during postnatal development influence motoneurone survival in rats.
Brain Res Dev Brain Res **69**: 125-31, 1992.
- Grieshammer U., Lewandoski M., Prevette D., Oppenheim R.W. et Martin G.R.
Muscle-specific cell ablation conditional upon Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice leads to massive spinal and cranial motoneuron loss.
Dev Biol **197**: 234-47, 1998.
- Gubitz A.K., Mourelatos Z., Abel L., Rappsilber J., Mann M. et Dreyfuss G.
Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins.
J Biol Chem **277**: 5631-6, 2002.
- Guettier-Sigrist S., Coupin G., Braun S., Warter J.M. et Poindron P.
Muscle could be the therapeutic target in SMA treatment.
J Neurosci Res **53**: 663-9, 1998.
- Guettier-Sigrist S., Coupin G., Warter J.M. et Poindron P.
Cell types required to efficiently innervate human muscle cells in vitro.
Exp Cell Res **259**: 204-12, 2000.
- Guettier-Sigrist S., Coupin G., Braun S., Rogovitz D., Courdier I., Warter J.M. et Poindron P.
On the possible role of muscle in the pathogenesis of spinal muscular atrophy.
Fundam Clin Pharmacol **15**: 31-40, 2001.
- Guettier-Sigrist S., Hugel B., Coupin G., Freyssinet J.M., Poindron P. et Warter J.M.
Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in spinal muscular atrophy.
Muscle Nerve **25**: 700-8, 2002.
- Guillem V.M., Tormo M., Revert F., Benet I., Garcia-Conde J., Crespo A. et Alino S.F.
Polyethyleneimine-based immunopolyplex for targeted gene transfer in human lymphoma cell lines.
J Gene Med **4**: 170-82, 2002.
- Haensler J. et Szoka F.C., Jr.
Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture.
Bioconjug Chem **4**: 372-9, 1993.
- Hafez I.M., Maurer N. et Cullis P.R.
On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids.
Gene Ther **8**: 1188-96, 2001.
- Hahnen E., Schonling J., Rudnik-Schoneborn S., Raschke H., Zerres K. et Wirth B.
Missense mutations in exon 6 of the survival motor neuron gene in patients with spinal muscular atrophy (SMA).
Hum Mol Genet **6**: 821-5, 1997.
- Harada Y., Sutomo R., Sadewa A.H., Akutsu T., Takeshima Y., Wada H., Matsuo M. et Nishio H.
Correlation between SMN2 copy number and clinical phenotype of spinal muscular atrophy: three SMN2 copies fail to rescue some patients from the disease severity.
J Neurol **249**: 1211-9, 2002.
- Hardwick J.M. et Levine B.
Sindbis virus vector system for functional analysis of apoptosis regulators.
Methods Enzymol **322**: 492-508, 2000.

- Hartikka J., Sukhu L., Buchner C., Hazard D., Bozoukova V., Margalith M., Nishioka W.K., Wheeler C.J., Manthorp M. et Sawdey M.
Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188.
Mol Ther **4**: 407-15, 2001.
- Hasegawa S., Hirashima N. et Nakanishi M.
Comparative study of transfection efficiency of cationic cholesterol mediated by liposomes-based gene delivery.
Bioorg Med Chem Lett **12**: 1299-302, 2002.
- Hausmanowa-Petrusewicz I. et Karwanska A.
Electromyographic findings in different forms of infantile and juvenile proximal spinal muscular atrophy.
Muscle Nerve **9**: 37-46, 1986.
- Hausmanowa-Petrusewicz I.
A research strategy for the resolution of childhood spinal muscular atrophy. Current concepts in childhood spinal muscular atrophy. Dubowitz V. Vienna, Springer Verlag: 21-32, 1989.
- Hebert M.D., Szymczyk P.W., Shpargel K.B. et Matera A.G.
Coilin forms the bridge between Cajal bodies and SMN, the spinal muscular atrophy protein.
Genes Dev **15**: 2720-9, 2001.
- Helander I.M., Latva-Kala K. et Lounatmaa K.
Permeabilizing action of polyethyleneimine on *Salmonella typhimurium* involves disruption of the outer membrane and interactions with lipopolysaccharide.
Microbiology **144 (Pt 2)**: 385-90, 1998.
- Henderson C.E., Yamamoto Y., Livet J., Arce V., Garces A. et deLapeyriere O.
Role of neurotrophic factors in motoneuron development.
J Physiol Paris **92**: 279-81, 1998.
- Hengartner M.O. et Horvitz H.R.
The ins and outs of programmed cell death during *C. elegans* development.
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **345**: 243-6, 1994.
- Henry M.D. et Campbell K.P.
Dystroglycan inside and out.
Curr Opin Cell Biol **11**: 602-7, 1999.
- Herweijer H.
Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver.
J Gene Med **3**: 280-291, 2001.
- Herweijer H. et Wolff J.A.
Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy.
Gene Ther **10**: 453-8, 2003.
- Hickman M.A., Malone R.W., Lehmann-Bruinsma K., Sih T.R., Knoell D., Szoka F.C., Walzem R., Carlson D.M. et Powell J.S.
Gene expression following direct injection of DNA into liver.
Hum Gene Ther **5**: 1477-83, 1994.
- Hockenbery D., Nunez G., Milliman C., Schreiber R.D. et Korsmeyer S.J.
Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death.
Nature **348**: 334-6, 1990.

- Hodgetts S.I., Beilharz M.W., Scalzo A.A. et Grounds M.D.
Why do cultured transplanted myoblasts die in vivo? DNA quantification shows enhanced survival of donor male myoblasts in host mice depleted of CD4⁺ and CD8⁺ cells or Nk.1⁺ cells.
Cell Transplant **9**: 489-502, 2000.
- Hofmann Y., Lorson C.L., Stamm S., Androphy E.J. et Wirth B.
Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2).
Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 9618-23, 2000.
- Hofmann Y. et Wirth B.
hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1.
Hum Mol Genet **11**: 2037-49, 2002.
- Hsieh-Li H.M., Chang J.G., Jong Y.J., Wu M.H., Wang N.M., Tsai C.H. et Li H.
A mouse model for spinal muscular atrophy.
Nat Genet **24**: 66-70, 2000.
- Huh K.H. et Fuhrer C.
Clustering of nicotinic acetylcholine receptors: from the neuromuscular junction to interneuronal synapses.
Mol Neurobiol **25**: 79-112, 2002.
- Iwahashi H., Eguchi Y., Yasuhara N., Hanafusa T., Matsuzawa Y. et Tsujimoto Y.
Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy.
Nature **390**: 413-7, 1997.
- Jablonka S., Schrank B., Kralewski M., Rossoll W. et Sendtner M.
Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III.
Hum Mol Genet **9**: 341-6, 2000.
- Jablonka S., Holtmann B., Meister G., Bandilla M., Rossoll W., Fischer U. et Sendtner M.
Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death.
Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 10126-31, 2002.
- Jacobson C., Montanaro F., Lindenbaum M., Carbonetto S. et Ferns M.
alpha-Dystroglycan functions in acetylcholine receptor aggregation but is not a coreceptor for agrin-MuSK signaling.
J Neurosci **18**: 6340-8, 1998.
- Jennings C.G., Dyer S.M. et Burden S.J.
Muscle-specific trk-related receptor with a kringle domain defines a distinct class of receptor tyrosine kinases.
Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 2895-9, 1993.
- Jolly D.
Viral vector systems for gene therapy.
Cancer Gene Ther **1**: 51-64, 1994.
- Jones M.A. et Werle M.J.
Nitric oxide is a downstream mediator of agrin-induced acetylcholine receptor aggregation.
Mol Cell Neurosci **16**: 649-60, 2000.
- Kambach C., Walke S., Young R., Avis J.M., de la Fortelle E., Raker V.A., Luhrmann R., Li J. et Nagai K.
Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs.
Cell **96**: 375-87, 1999.

- Kashima T. et Manley J.L.
A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy.
Nat Genet **29**: 29, 2003.
- Kerr D.A., Nery J.P., Traystman R.J., Chau B.N. et Hardwick J.M.
Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis.
Proc Natl Acad Sci U S A **97**: 13312-7, 2000.
- Kim J.S., Kim B.I., Maruyama A., Akaike T. et Kim S.W.
A new non-viral DNA delivery vector: the terplex system.
J Control Release **53**: 175-82, 1998.
- Kinali M., Mercuri E., Main M., De Biasia F., Karatza A., Higgins R., Banks L.M., Manzur A.Y. et Muntoni F.
Pilot trial of albuterol in spinal muscular atrophy.
Neurology **59**: 609-10., 2002.
- Kleyn P.W., Wang C.H., Lien L.L., Vitale E., Pan J., Ross B.M., Grunn A., Palmer D.A., Warburton D., Brzustowicz L.M. et al.
Construction of a yeast artificial chromosome contig spanning the spinal muscular atrophy disease gene region.
Proc Natl Acad Sci U S A **90**: 6801-5, 1993.
- Kobayashi T., Askanas V. et Engel W.K.
Human muscle cultured in monolayer and cocultured with foetal rat spinal cord : importance of dorsal root ganglia for achieving successful functional innervation.
J. Neurosci. **7**: 3131-3141, 1987.
- Koessler W., Wanke T., Winkler G., Nader A., Toifl K., Kurz H. et Zwick H.
2 Years' experience with inspiratory muscle training in patients with neuromuscular disorders.
Chest **120**: 765-9, 2001.
- Krajewska G. et Hausmanowa-Petrusewicz I.
Abnormal nerve conduction velocity as a marker of immaturity in childhood muscle spinal atrophy.
Folia Neuropathol **40**: 67-74, 2002.
- Krecic A.M. et Swanson M.S.
hnRNP complexes: composition, structure, and function.
Curr Opin Cell Biol **11**: 363-71, 1999.
- Lamm G.M., Blencowe B.J., Sproat B.S., Iribarren A.M., Ryder U. et Lamond A.I.
Antisense probes containing 2-aminoadenosine allow efficient depletion of U5 snRNP from HeLa splicing extracts.
Nucleic Acids Res **19**: 3193-8, 1991.
- Landmesser L., Dahm L., Schultz K. et Rutishauser U.
Distinct roles for adhesion molecules during innervation of embryonic chick muscle.
Dev Biol **130**: 645-70, 1988.
- Lasch J., Meye A., Taubert H., Koelsch R., Mansa-ard J. et Weissig V.
Dequalinium vesicles form stable complexes with plasmid DNA which are protected from DNase attack.
Biol Chem **380**: 647-52, 1999.
- Laufer R. et Changeux J.P.
Activity-dependent regulation of gene expression in muscle and neuronal cells.
Mol Neurobiol **3**: 1-53, 1989.
- Le T.T., Coovert D.D., Monani U.R., Morris G.E. et Burghes A.H.
The survival motor neuron (SMN) protein: effect of exon loss and mutation on protein localization.
Neurogenetics **3**: 7-16, 2000.

- Ledley F.D.
Nonviral gene therapy: the promise of genes as pharmaceutical products.
Hum Gene Ther **6**: 1129-44, 1995.
- Lee M.J., Cho S.S., You J.R., Lee Y., Kang B.D., Choi J.S., Park J.W., Suh Y.L., Kim J.A., Kim D.K. et Park J.S.
Intraperitoneal gene delivery mediated by a novel cationic liposome in a peritoneal disseminated ovarian cancer model.
Gene Ther **9**: 859-66, 2002.
- Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., Clermont O., Burlet P., Viollet L., Benichou B., Cruaud C., Millasseau P., Zeviani M. et al.
Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene.
Cell **80**: 155-65, 1995.
- Lefebvre S., Burlet P., Liu Q., Bertrand S., Clermont O., Munnich A., Dreyfuss G. et Melki J.
Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy.
Nat Genet **16**: 265-9, 1997.
- Legrain P., Seraphin B. et Rosbash M.
Early commitment of yeast pre-mRNA to the spliceosome pathway.
Mol Cell Biol **8**: 3755-60, 1988.
- Lesbordes J.C., Cifuentes-Diaz C., Miroglio A., Joshi V., Bordet T., Kahn A. et Melki J.
Therapeutic benefits of cardiotoxin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy.
Hum Mol Genet **12**: 1233-9, 2003.
- Levi-Montalcini R.
The nerve growth factor: thirty-five years later.
Embo J **6**: 1145-54, 1987.
- Lichtman J.W. et Colman H.
Synapse elimination and indelible memory.
Neuron **25**: 269-78, 2000.
- Lim S.R. et Hertel K.J.
Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing.
J Biol Chem **276**: 45476-83, 2001.
- Lim Y.B., Han S.O., Kong H.U., Lee Y., Park J.S., Jeong B. et Kim S.W.
Biodegradable polyester, poly[alpha-(4-aminobutyl)-L-glycolic acid], as a non-toxic gene carrier.
Pharm Res **17**: 811-6, 2000.
- Liston P., Roy N., Tamai K., Lefebvre C., Baird S., Cherton-Horvat G., Farahani R., McLean M., Ikeda J.E., MacKenzie A. et Korneluk R.G.
Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes.
Nature **379**: 349-53, 1996.
- Liu Q. et Dreyfuss G.
A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein.
Embo J **15**: 3555-65., 1996.
- Liu Q., Siomi H., Siomi M.C., Fischer U., Zhang Y., Wan L. et Dreyfuss G.
Molecular characterization of the protein products of the fragile X syndrome gene and the survival of motor neurons gene.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol **61**: 689-97, 1996.

- Liu Q., Fischer U., Wang F. et Dreyfuss G.
The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins.
Cell **90**: 1013-21, 1997.
- Lorson C.L., Strasswimmer J., Yao J.M., Baleja J.D., Hahnen E., Wirth B., Le T., Burghes A.H. et Androphy E.J.
SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity.
Nat Genet **19**: 63-6, 1998.
- Lorson C.L., Hahnen E., Androphy E.J. et Wirth B.
A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy.
Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 6307-11, 1999.
- Lorson C.L. et Androphy E.J.
An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN.
Hum Mol Genet **9**: 259-65, 2000.
- Lucas P., Pouton J.W. et Moss S.
Influence of formulation factors on gene transfer mediated by cationic polypeptides.
Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. **22**: 468-9, 1995.
- Luck G., Hoch W., Hopf C. et Blottner D.
Nitric oxide synthase (NOS-1) coclustered with agrin-induced AChR-specializations on cultured skeletal myotubes.
Mol Cell Neurosci **16**: 269-81, 2000.
- Luhrmann R., Kastner B. et Bach M.
Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing.
Biochim Biophys Acta **1087**: 265-92, 1990.
- Maheshwari A., Mahato R.I., McGregor J., Han S., Samlowski W.E., Park J.S. et Kim S.W.
Soluble biodegradable polymer-based cytokine gene delivery for cancer treatment.
Mol Ther **2**: 121-30, 2000.
- Maheshwari A., Han S., Mahato R.I. et Kim S.W.
Biodegradable polymer-based interleukin-12 gene delivery: role of induced cytokines, tumor infiltrating cells and nitric oxide in anti-tumor activity.
Gene Ther **9**: 1075-84, 2002.
- Maier J.K., Lahoua Z., Gendron N.H., Fetni R., Johnston A., Davoodi J., Rasper D., Roy S., Slack R.S., Nicholson D.W. et MacKenzie A.E.
The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7.
J Neurosci **22**: 2035-43, 2002.
- Marangi P.A., Wieland S.T. et Fuhrer C.
Laminin-1 redistributes postsynaptic proteins and requires rapsyn, tyrosine phosphorylation, and Src and Fyn to stably cluster acetylcholine receptors.
J Cell Biol **157**: 883-95, 2002.
- Marchand S., Bignami F., Stetzkowski-Marden F. et Cartaud J.
The myristoylated protein rapsyn is cotargeted with the nicotinic acetylcholine receptor to the postsynaptic membrane via the exocytic pathway.
J Neurosci **20**: 521-8, 2000.
- Maroney P.A., Romfo C.M. et Nilsen T.W.
Functional recognition of 5' splice site by U4/U6.U5 tri-snRNP defines a novel ATP-dependent step in early spliceosome assembly.
Mol Cell **6**: 317-28, 2000.

- Marques M.J., Conchello J.A. et Lichtman J.W.
From plaque to pretzel: fold formation and acetylcholine receptor loss at the developing neuromuscular junction.
J Neurosci **20**: 3663-75, 2000.
- Martin Y., Valero A., del Castillo E., Pascual S.I. et Hernandez-Chico C.
Genetic study of SMA patients without homozygous SMN1 deletions: identification of compound heterozygotes and characterisation of novel intragenic SMN1 mutations.
Hum Genet **110**: 257-63, 2002.
- Martinou J.C., Martinou I. et Kato A.C.
Cholinergic differentiation factor (CDF/LIF) promotes survival of isolated rat embryonic motoneurons in vitro.
Neuron **8**: 737-44, 1992.
- Martinuzzi P.C., Askanas V., Kobayashi T., Engel W.K. et DiMauro S.
expression of muscle-gene specific isoenzymes of phosphorylase and creatine kinase in innervated cultures human muscles.
J. Cell. Biol. **103**: 1423-1429, 1986.
- Martinuzzi P.C., Askanas V., Kobayashi T. et Engel W.K.
Asynchronous regulation of muscle specific isoenzymes of creatine kinase, glycogen phosphorylase, lactic dehydrogenase and phosphoglycerate mutase in innervated and non-innervated cultured human muscle.
Neurosci. Lett. **89**: 216-222, 1988.
- Massenet S., Pellizzoni L., Paushkin S., Mattaj I.W. et Dreyfuss G.
The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway.
Mol Cell Biol **22**: 6533-41, 2002.
- Mattaj I.W. et De Robertis E.M.
Nuclear segregation of U2 snRNA requires binding of specific snRNP proteins.
Cell **40**: 111-8, 1985.
- Mattaj I.W.
Cap trimethylation of U snRNA is cytoplasmic and dependent on U snRNP protein binding.
Cell **46**: 905-11, 1986.
- Mattaj I.W., Dathan N.A., Parry H.D., Carbon P. et Krol A.
Changing the RNA polymerase specificity of U snRNA gene promoters.
Cell **55**: 435-42, 1988.
- McAndrew P.E., Parsons D.W., Simard L.R., Rochette C., Ray P.N., Mendell J.R., Prior T.W. et Burghes A.H.
Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC gene copy number.
Am J Hum Genet **60**: 1411-22, 1997.
- McMahan U.J.
The agrin hypothesis.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol **55**: 407-18, 1990.
- Meister G., Buhler D., Laggenbauer B., Zobawa M., Lottspeich F. et Fischer U.
Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins.
Hum Mol Genet **9**: 1977-86, 2000.
- Meister G., Buhler D., Pillai R., Lottspeich F. et Fischer U.
A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs.
Nat Cell Biol **3**: 945-9, 2001.
- Meister G., Eggert C., Buhler D., Brahms H., Kambach C. et Fischer U.
Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln.
Curr Biol **11**: 1990-4, 2001.

- Meister G., Eggert C. et Fischer U.
SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story.
Trends Cell Biol **12**: 472-8, 2002.
- Melki J., Sheth P., Abdelhak S., Burlet P., Bachelot M.F., Lathrop M.G., Frezal J. et Munnich A.
Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. The French Spinal Muscular Atrophy Investigators.
Lancet **336**: 271-3, 1990.
- Melki J., Abdelhak S., Burlet P., Raclin V., Kaplan J., Spiegel R., Gilgenkrantz S., Philip N., Chauvet M.L., Dumez Y. et al.
Prenatal prediction of Werdnig-Hoffmann disease using linked polymorphic DNA probes.
J Med Genet **29**: 171-4, 1992.
- Melki J., Lefebvre S., Burglen L., Burlet P., Clermont O., Millasseau P., Reboullet S., Benichou B., Zeviani M., Le Paslier D. et al.
De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies.
Science **264**: 1474-7, 1994.
- Mercer E.A., Korhonen L., Skoglosa Y., Olsson P.A., Kukkonen J.P. et Lindholm D.
NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways.
Embo J **19**: 3597-607, 2000.
- Meyer G. et Wallace B.G.
Recruitment of a nicotinic acetylcholine receptor mutant lacking cytoplasmic tyrosine residues in its beta subunit into agrin-induced aggregates.
Mol Cell Neurosci **11**: 324-33, 1998.
- Michaud S. et Reed R.
An ATP-independent complex commits pre-mRNA to the mammalian spliceosome assembly pathway.
Genes Dev **5**: 2534-46, 1991.
- Miyajima H., Miyaso H., Okumura M., Kurisu J. et Imaizumi K.
Identification of a cis-acting element for the regulation of SMN exon 7 splicing.
J Biol Chem **277**: 23271-7, 2002.
- Monani U.R., Lorson C.L., Parsons D.W., Prior T.W., Androphy E.J., Burghes A.H. et McPherson J.D.
A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2.
Hum Mol Genet **8**: 1177-83, 1999 a.
- Monani U.R., McPherson J.D. et Burghes A.H.
Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT).
Biochim Biophys Acta **1445**: 330-6, 1999 b.
- Monani U.R., Sendtner M., Coover D.D., Parsons D.W., Andreassi C., Le T.T., Jablonka S., Schrank B., Rossol W., Prior T.W., Morris G.E. et Burghes A.H.
The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy.
Hum Mol Genet **9**: 333-9, 2000.
- Montanaro F., Gee S.H., Jacobson C., Lindenbaum M.H., Froehner S.C. et Carbonetto S.
Laminin and alpha-dystroglycan mediate acetylcholine receptor aggregation via a MuSK-independent pathway.
J Neurosci **18**: 1250-60, 1998.
- Moore C., Leu M., Muller U. et Brenner H.R.
Induction of multiple signaling loops by MuSK during neuromuscular synapse formation.
Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 14655-60, 2001.

- Moransard M., Borges L.S., Willmann R., Marangi P.A., Brenner H.R., Ferns M.J. et Fuhrer C.
Agrin regulates rapsyn interaction with surface acetylcholine receptors, and this underlies cytoskeletal anchoring and clustering.
J Biol Chem **278**: 7350-9, 2003.
- Mouaikel J., Narayanan U., Verheggen C., Matera A.G., Bertrand E., Tazi J. et Bordonne R.
Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron.
EMBO Rep **4**: 616-22, 2003.
- Moulard B., Salachas F., Chassande B., Briolotti V., Meininger V., Malafosse A. et Camu W.
Association between centromeric deletions of the SMN gene and sporadic adult-onset lower motor neuron disease.
Ann Neurol **43**: 640-4, 1998.
- Mount C.C., Lee L.K., Yasin A., Scott A., Fearn T. et Ayazi Shamlou P.
The influence of physico-chemical and process conditions on the physical stability of plasmid DNA complexes using response surface methodology.
Biotechnol Appl Biochem **9**: 9, 2003.
- Mourelatos Z., Abel L., Yong J., Kataoka N. et Dreyfuss G.
SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins.
Embo J **20**: 5443-52, 2001.
- Mulligan R.C.
Gene transfer and gene therapy : principles, prospects and perspectives. Etiology of human disease at the DNA level. Lindsten J. et Petterson U. New-York, Raven Press: 143-189, 1991.
- Nagai K., Muto Y., Pomeranz Krummel D.A., Kambach C., Ignjatovic T., Walke S. et Kuglstatter A.
Structure and assembly of the spliceosomal snRNPs. Novartis Medal Lecture.
Biochem Soc Trans **29**: 15-26, 2001.
- Neuman de Vegvar H.E. et Dahlberg J.E.
Nucleocytoplasmic transport and processing of small nuclear RNA precursors.
Mol Cell Biol **10**: 3365-75, 1990.
- Nguyen Q.T. et Lichtman J.W.
Mechanism of synapse disassembly at the developing neuromuscular junction.
Curr Opin Neurobiol **6**: 104-12, 1996.
- Nicole S., Diaz C.C., Frugier T. et Melki J.
Spinal muscular atrophy: recent advances and future prospects.
Muscle Nerve **26**: 4-13, 2002.
- Nicole S., Desforges B., Millet G., Lesbordes J., Cifuentes-Diaz C., Vertes D., Cao M.L., De Backer F., Languille L., Roblot N., Joshi V., Gillis J.M. et Melki J.
Intact satellite cells lead to remarkable protection against Smn gene defect in differentiated skeletal muscle.
J Cell Biol **161**: 571-82, 2003.
- Niculescu-Duvaz D., Heyes J. et Springer C.J.
Structure-activity relationship in cationic lipid mediated gene transfection.
Curr Med Chem **10**: 1233-61, 2003.
- Nikitin A.Y., Juarez-Perez M.I., Li S., Huang L. et Lee W.H.
RB-mediated suppression of spontaneous multiple neuroendocrine neoplasia and lung metastases in Rb+/- mice.
Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 3916-21, 1999.

- Nishikawa M., Yamauchi M., Morimoto K., Ishida E., Takakura Y. et Hashida M.
Hepatocyte-targeted *in vivo* gene expression by intravenous injection of plasmid DNA complexed with synthetic multi-functional gene delivery system.
Gene Ther **7**: 548-55, 2000.
- Noble S.M. et Guthrie C.
Identification of novel genes required for yeast pre-mRNA splicing by means of cold-sensitive mutations.
Genetics **143**: 67-80, 1996 a.
- Noble S.M. et Guthrie C.
Transcriptional pulse-chase analysis reveals a role for a novel snRNP-associated protein in the manufacture of spliceosomal snRNPs.
Embo J **15**: 4368-79, 1996 b.
- Ogino S., Gao S., Leonard D.G., Paessler M. et Wilson R.B.
Inverse correlation between SMN1 and SMN2 copy numbers: evidence for gene conversion from SMN2 to SMN1.
Eur J Hum Genet **11**: 275-7, 2003.
- Ogris M., Steinlein P., Kursa M., Mechtler K., Kircheis R. et Wagner E.
The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells.
Gene Ther **5**: 1425-33, 1998.
- Olivai Z.N., Millman C.L. et Korsmeyer S.J.
Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.
Cell **74**: 609-619, 1993.
- Oudrhiri N., Vigneron J.P., Peuchmaur M., Leclerc T., Lehn J.M. et Lehn P.
Gene transfer by guanidinium-cholesterol cationic lipids into airway epithelial cells *in vitro* and *in vivo*.
Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 1651-6, 1997.
- Pampinella F., Pozzobon M., Zanetti E., Gamba P.G., McLachlan I., Cantini M. et Vitiello L.
Gene transfer in skeletal muscle by systemic injection of DODAC lipopolyplexes.
Neurol Sci **21**: S967-9, 2000.
- Pampinella F., Lechardeur D., Zanetti E., MacLachlan I., Benharouga M., Lukacs G.L. et Vitiello L.
Analysis of differential lipofection efficiency in primary and established myoblasts.
Mol Ther **5**: 161-9, 2002.
- Parboosingh J.S., Meininger V., McKenna-Yasek D., Brown R.H., Jr. et Rouleau G.A.
Deletions causing spinal muscular atrophy do not predispose to amyotrophic lateral sclerosis.
Arch Neurol **56**: 710-2, 1999.
- Parsons D.W., McAndrew P.E., Monani U.R., Mendell J.R., Burghes A.H. et Prior T.W.
An 11 base pair duplication in exon 6 of the SMN gene produces a type I spinal muscular atrophy (SMA) phenotype: further evidence for SMN as the primary SMA-determining gene.
Hum Mol Genet **5**: 1727-32., 1996.
- Parsons D.W., McAndrew P.E., Allinson P.S., Parker W.D., Jr., Burghes A.H. et Prior T.W.
Diagnosis of spinal muscular atrophy in an SMN non-deletion patient using a quantitative PCR screen and mutation analysis.
J Med Genet **35**: 674-6, 1998 a.
- Parsons D.W., McAndrew P.E., Iannaccone S.T., Mendell J.R., Burghes A.H. et Prior T.W.
Intragenic telSMN mutations: frequency, distribution, evidence of a founder effect, and modification of the spinal muscular atrophy phenotype by cenSMN copy number.
Am J Hum Genet **63**: 1712-23, 1998 b.

- Partridge T.
Myoblast transplantation.
Neuromuscul Disord **12**: S3-6, 2002.
- Patel M., Vivien E., Hauchecorne M., Oudrhiri N., Ramasawmy R., Vigneron J.P., Lehn P. et Lehn J.M.
Efficient gene transfection by bisguanylated diacetylene lipid formulations.
Biochem Biophys Res Commun **281**: 536-43, 2001.
- Paushkin S., Gubitz A.K., Massenet S. et Dreyfuss G.
The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins.
Curr Opin Cell Biol **14**: 305-1., 2002.
- Pearn J.
Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy.
J Med Genet **15**: 409-13, 1978.
- Pearn J.
Classification of spinal muscular atrophies.
Lancet **1**: 919-22, 1980.
- Pellizzoni L., Charroux B. et Dreyfuss G.
SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins.
Proc Natl Acad Sci U S A **96**: 11167-72, 1999.
- Pellizzoni L., Baccon J., Charroux B. et Dreyfuss G.
The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snRNP proteins fibrillarin and GAR1.
Curr Biol **11**: 1079-88, 2001.
- Pellizzoni L., Baccon J., Rappsilber J., Mann M. et Dreyfuss G.
Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component.
J Biol Chem **277**: 7540-5, 2002.
- Peng H.B., Yang J.F., Dai Z., Lee C.W., Hung H.W., Feng Z.H. et Ko C.P.
Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis.
J Neurosci **23**: 5050-60, 2003.
- Pham-Nguyen K.B., Yang W., Saxena R., Thung S.N., Woo S.L. et Chen S.H.
Role of NK and T cells in IL-12-induced anti-tumor response against hepatic colon carcinoma.
Int J Cancer **81**: 813-9, 1999.
- Phelan K.A. et Hollyday M.
Embryonic development and survival of brachial motoneurons projecting to muscleless chick wings.
J Comp Neurol **311**: 313-20, 1991.
- Poo M.M.
Neurotrophins as synaptic modulators.
Nat Rev Neurosci **2**: 24-32, 2001.
- Pu W.T., Krapivinsky G.B., Krapivinsky L. et Clapham D.E.
pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins.
Mol Cell Biol **19**: 4113-20, 1999.
- Qin L., Ding Y., Pahud D.R., Chang E., Imperiale M.J. et Bromberg J.S.
Promoter attenuation in gene therapy : interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression.
Hum Gene Ther **8**:2019-29, 1997.

- Qu Z., Balkir L., van Deutekom J.C., Robbins P.D., Pruchnic R. et Huard J.
Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy.
J Cell Biol **142**: 1257-67, 1998.
- Qu Z. et Huard J.
Matching host muscle and donor myoblasts for myosin heavy chain improves myoblast transfer therapy.
Gene Ther **7**: 428-37, 2000.
- Reddy R. et Busch H. RNA sequences, structure, and modifications.
Structure and Function of Major and Minor Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles. Birnstiel M. New York, Springer Verlag: 1-37, 1988.
- Rio M.D., Larcher F., Meana A., Segovia J., Alvarez A. et Jorcano J.
Nonviral transfer of genes to pig primary keratinocytes. Induction of angiogenesis by composite grafts of modified keratinocytes overexpressing VEGF driven by a keratin promoter.
Gene Ther **6**: 1734-41, 1999.
- Rochette C.F., Surh L.C., Ray P.N., McAndrew P.E., Prior T.W., Burghes A.H., Vanasse M. et Simard L.R.
Molecular diagnosis of non-deletion SMA patients using quantitative PCR of SMN exon 7.
Neurogenetics **1**: 141-7, 1997.
- Rochette C.F., Gilbert N. et Simard L.R.
SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to *Homo sapiens*.
Hum Genet **108**: 255-66, 2001.
- Romero N.B., Benveniste O., Payan C., Braun S., Squiban P., Herson S. et Fardeau M.
Current protocol of research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part II: clinical protocol.
Neuromuscul Disord. **12 S1**:S45-8, 2002.
- Roy N., Mahadevan M.S., McLean M., Shutler G., Yaraghi Z., Farahani R., Baird S., Besner-Johnston A., Lefebvre C., Kang X. et al.
The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy.
Cell **80**: 167-78, 1995.
- Salman H., Zbaida D., Rabin Y., Chatenay D. et Elbaum M.
Kinetics and mechanism of DNA uptake into the cell nucleus.
Proc Natl Acad Sci U S A **98**: 7247-52, 2001.
- Sander A., Hesser B.A. et Witzemann V.
MuSK induces in vivo acetylcholine receptor clusters in a ligand-independent manner.
J Cell Biol **155**: 1287-96, 2001.
- Sanes J.R. et Lichtman J.W.
Development of the vertebrate neuromuscular junction.
Annu Rev Neurosci **22**: 389-442, 1999.
- Sanes J.R. et Lichtman J.W.
Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus.
Nat Rev Neurosci **2**: 791-805, 2001.
- Schaeffer L., de Kerchove d'Exaerde A. et Changeux J.P.
Targeting transcription to the neuromuscular synapse.
Neuron **31**: 15-22, 2001.

Scharf J.M., Endrizzi M.G., Wetter A., Huang S., Thompson T.G., Zerres K., Dietrich W.F., Wirth B. et Kunkel L.M.

Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics.
Nat Genet **20**: 83-6, 1998.

Schmalbruch H. et Haase G.

Spinal muscular atrophy: present state.
Brain Pathol **11**: 231-47, 2001.

Schmitz H.D. et Bereiter-Hahn J.

GFP associates with microfilaments in fixed cells.
Histochem Cell Biol **116**: 89-94, 2001.

Schrank B., Gotz R., Gunnensen J.M., Ure J.M., Toyka K.V., Smith A.G. et Sendtner M.

Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos.
Proc Natl Acad Sci U S A **94**: 9920-5, 1997.

Schwartz B., Benoist C., Abdallah B., Rangara R., Hassan A., Scherman D. et Demeneix B.A.

Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain.
Gene Ther **3**: 405-11, 1996.

Seigneurin-Venin S., Bernard V., Moisset P.A., Ouellette M.M., Mouly V., Di Donna S., Wright W.E. et Tremblay J.P.

Transplantation of normal and DMD myoblasts expressing the telomerase gene in SCID mice.
Biochem Biophys Res Commun **272**: 362-9, 2000.

Sendtner M., Pei G., Beck M., Schweizer U. et Wiese S.

Developmental motoneuron cell death and neurotrophic factors.
Cell Tissue Res **301**: 71-84, 2000.

Seraphin B. et Rosbash M.

Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly and splicing.
Cell **59**: 349-58., 1989.

Seville P.C., Kellaway I.W. et Birchall J.C.

Preparation of dry powder dispersions for non-viral gene delivery by freeze-drying and spray-drying.
J Gene Med **4**: 428-37, 2002.

Sgonec R. et Wick G.

Methods for the detection of apoptosis.
Int Arch Allergy Immunol **105**: 327-32, 1994.

Shi L., Tang G.P., Gao S.J., Ma Y.X., Liu B.H., Li Y., Zeng J.M., Ng Y.K., Leong K.W. et Wang S.

Repeated intrathecal administration of plasmid DNA complexed with polyethylene glycol-grafted polyethylenimine led to prolonged transgene expression in the spinal cord.
Gene Ther **10**: 1179-88., 2003.

Shyu A.B. et Wilkinson M.F.

The double lives of shuttling mRNA binding proteins.
Cell **102**: 135-8, 2000.

Si J., Tanowitz M., Won S. et Mei L.

Regulation by ARIA/neuregulin of acetylcholine receptor gene transcription at the neuromuscular junction.
Life Sci **62**: 1497-502, 1998.

Sikes M.L., O'Malley B.W., Jr., Finegold M.J. et Ledley F.D.

In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection.
Hum Gene Ther **5**: 837-44, 1994.

- Simic G., Seso-Simic D., Lucassen P.J., Islam A., Krsnik Z., Cviko A., Jelastic D., Barisic N., Winblad B., Kostovic I. et Kruslin B.
Ultrastructural analysis and TUNEL demonstrate motor neuron apoptosis in Werdnig-Hoffmann disease.
J Neuropathol Exp Neurol **59**: 398-407, 2000.
- Simoes S., Slepishkin V., Pires P., Gaspar R., Pedroso de Lima M.C. et Duzgunes N.
Human serum albumin enhances DNA transfection by lipoplexes and confers resistance to inhibition by serum.
Biochim Biophys Acta **1463**: 459-69, 2000.
- Skordis L.A., Dunckley M.G., Burglen L., Campbell L., Talbot K., Patel S., Melki J., Davies K.E., Dubowitz V. et Muntoni F.
Characterisation of novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patients with SMA.
Hum Genet **108**: 356-7, 2001.
- Skordis L.A., Dunckley M.G., Yue B., Eperon I.C. et Muntoni F.
Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts.
Proc Natl Acad Sci U S A **100**: 4114-9, 2003.
- Sleeman J.E. et Lamond A.I.
Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway.
Curr Biol **9**: 1065-74, 1999.
- Smith C.L., Mittaud P., Prescott E.D., Fuhrer C. et Burden S.J.
Src, Fyn, and Yes are not required for neuromuscular synapse formation but are necessary for stabilization of agrin-induced clusters of acetylcholine receptors.
J Neurosci **21**: 3151-60, 2001.
- Smith C.W., Porro E.B., Patton J.G. et Nadal-Ginard B.
Scanning from an independently specified branch point defines the 3' splice site of mammalian introns.
Nature **342**: 243-7, 1989.
- Smythe G.M., Hodgetts S.I. et Grounds M.D.
Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy.
Mol Ther **1**: 304-13, 2000.
- Smythe G.M. et Grounds M.D.
Absence of MyoD increases donor myoblast migration into host muscle.
Exp Cell Res **267**: 267-74, 2001 a.
- Smythe G.M., Hodgetts S.I. et Grounds M.D.
Problems and solutions in myoblast transfer therapy.
J Cell Mol Med **5**: 33-47, 2001 b.
- Soler-Botija C., Ferrer I., Gich I., Baiget M. et Tizzano E.F.
Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord.
Brain **125**: 1624-34, 2002.
- Sorgi F.L., Bhattacharya S. et Huang L.
Protamine sulfate enhances lipid-mediated gene transfer.
Gene Ther **4**: 961-8, 1997.
- Sossi V., Giuli A., Vitali T., Tiziano F., Mirabella M., Antonelli A., Neri G. et Brahe C.
Premature termination mutations in exon 3 of the SMN1 gene are associated with exon skipping and a relatively mild SMA phenotype.
Eur J Hum Genet **9**: 113-20, 2001.

- Sperl W., Skladal D., Gnaiger E., Wyss M., Mayr U., Hager J. et Gellerich F.N.
High resolution respirometry of permeabilized skeletal muscle fibers in the diagnosis of neuromuscular disorders.
Mol Cell Biochem **174**: 71-8, 1997.
- Staley J.P. et Guthrie C.
Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs, and things.
Cell **92**: 315-26, 1998.
- Talbot K., Ponting C.P., Theodosiou A.M., Rodrigues N.R., Surtees R., Mountford R. et Davies K.E.
Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism?
Hum Mol Genet **6**: 497-500, 1997.
- Taylor J.E., Thomas N.H., Lewis C.M., Abbs S.J., Rodrigues N.R., Davies K.E. et Mathew C.G.
Correlation of SMNt and SMNc gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy.
Eur J Hum Genet **6**: 467-74, 1998.
- Tews D.S. et Goebel H.H.
DNA fragmentation and BCL-2 expression in infantile spinal muscular atrophy.
Neuromuscul Disord **6**: 265-73, 1996.
- Thioudellet C., Blot S., Squiban P., Fardeau M. et Braun S.
Current protocol of research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part I: rationale.
Neuromuscul Disord **12 S1**:S49-51, 2002.
- Trinidad J.C., Fischbach G.D. et Cohen J.B.
The Agrin/MuSK signaling pathway is spatially segregated from the neuregulin/ErbB receptor signaling pathway at the neuromuscular junction.
J Neurosci **20**: 8762-70, 2000.
- Trivedi R.A. et Dickson G.
Liposome-mediated gene transfer into normal and dystrophin-deficient mouse myoblasts.
J Neurochem **64**: 2230-8, 1995.
- Uren A.G., Coulson E.J. et Vaux D.L.
Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts.
Trends Biochem Sci **23**: 159-62, 1998.
- Vacik J., Dean B.S., Zimmer W.E. et Dean D.A.
Cell-specific nuclear import of plasmid DNA.
Gene Ther **6**: 1006-14, 1999.
- Vajsar J., Balslev T., Ray P.N., Siegel-Bartelt J. et Jay V.
Congenital cytoplasmic body myopathy with survival motor neuron gene deletion or Werdnig-Hoffmann disease.
Neurology **51**: 873-5, 1998.
- Valenzuela D.M., Stitt T.N., DiStefano P.S., Rojas E., Mattsson K., Compton D.L., Nunez L., Park J.S., Stark J.L., Gies D.R. et al.
Receptor tyrosine kinase specific for the skeletal muscle lineage: expression in embryonic muscle, at the neuromuscular junction, and after injury.
Neuron **15**: 573-84, 1995.
- Velasco E., Valero C., Valero A., Moreno F. et Hernandez-Chico C.
Molecular analysis of the SMN and NAIP genes in Spanish spinal muscular atrophy (SMA) families and correlation between number of copies of cBCD541 and SMA phenotype.
Hum Mol Genet **5**: 257-63, 1996.

- Veldink J.H., van den Berg L.H., Cobben J.M., Stulp R.P., De Jong J.M., Vogels O.J., Baas F., Wokke J.H. et Scheffer H.
Homozygous deletion of the survival motor neuron 2 gene is a prognostic factor in sporadic ALS.
Neurology **56**: 749-52, 2001.
- Vigneron J.P., Oudrhiri N., Fauquet M., Vergely L., Bradley J.C., Basseville M., Lehn P. et Lehn J.M.
Guanidinium-cholesterol cationic lipids: efficient vectors for the transfection of eukaryotic cells.
Proc Natl Acad Sci U S A **93**: 9682-6, 1996.
- Viollet L., Bertrand S., Bueno Brunialti A.L., Lefebvre S., Burlet P., Clermont O., Cruaud C., Guenet J.L., Munnich A. et Melki J.
cDNA isolation, expression, and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (Smn).
Genomics **40**: 185-8, 1997.
- Vitali T., Sossi V., Tiziano F., Zappata S., Giuli A., Paravatou-Petsotas M., Neri G. et Brahe C.
Detection of the survival motor neuron (SMN) genes by FISH: further evidence for a role for SMN2 in the modulation of disease severity in SMA patients.
Hum Mol Genet **8**: 2525-32, 1999.
- Vitiello L., Bockhold K., Joshi P.B. et Worton R.G.
Transfection of cultured myoblasts in high serum concentration with DODAC:DOPE liposomes.
Gene Ther **5**: 1306-13, 1998.
- Voss M.D., Hille A., Barth S., Spurk A., Hennrich F., Holzer D., Mueller-Lantzsch N., Kremmer E. et Grasser F.A.
Functional cooperation of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 and the survival motor neuron protein in transactivation of the viral LMP1 promoter.
J Virol **75**: 11781-90, 2001.
- Vrbova G., Navarrete R. et Lowrie M.
Matching of muscle properties and motoneurone firing patterns during early stages of development.
J Exp Biol **115**: 113-23, 1985.
- Vrbova G. et Lowrie M.B. The role of nerve-muscle interactions in the pathogenesis of spinal muscular atrophy. Current concepts in childhood spinal muscular atrophy. Dubowitz V. Vienna, Springer Verlag: 33-42, 1989.
- Vyas S., Bechade C., Riveau B., Downward J. et Triller A.
Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death.
Hum Mol Genet **11**: 2751-64, 2002.
- Wagner K.R., Cohen J.B. et Hagan R.L.
The 87K postsynaptic membrane protein from Torpedo is a protein-tyrosine kinase substrate homologous to dystrophin.
Neuron **10**: 511-22, 1993.
- Wallace B.G., Qu Z. et Hagan R.L.
Agrin induces phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor.
Neuron **6**: 869-78, 1991.
- Wallace D.C.
Mitochondrial diseases in man and mouse.
Science **283**: 1482-8, 1999.
- Wang C.H., Papendick B.D., Bruinsma P. et Day J.K.
Identification of a novel missense mutation of the SMN(T) gene in two siblings with spinal muscular atrophy.
Neurogenetics **1**: 273-6, 1998.
- Weissig V., Lizano C. et Torchilin V.P.
Selective DNA release from DQAsome/DNA complexes at mitochondria-like membranes.
Drug Deliv **7**: 1-5, 2000.

- Westerfield M. et Eisen J.S.
Neuromuscular specificity: pathfinding by identified motor growth cones in a vertebrate embryo.
Trends Neurosci **11**: 18-22, 1988.
- Weston C., Yee B., Hod E. et Prives J.
Agrin-induced acetylcholine receptor clustering is mediated by the small guanosine triphosphatases Rac and Cdc42.
J Cell Biol **150**: 205-12, 2000.
- Will C.L. et Luhrmann R.
Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function.
Curr Opin Cell Biol **13**: 290-301, 2001.
- Williams B.Y., Vinnakota S., Sawyer C.A., Waldrep J.C., Hamilton S.L. et Sarkar H.K.
Differential subcellular localization of the survival motor neuron protein in spinal cord and skeletal muscle.
Biochem Biophys Res Commun **254**: 10-4, 1999.
- Willmann R. et Fuhrer C.
Neuromuscular synaptogenesis: clustering of acetylcholine receptors revisited.
Cell Mol Life Sci **59**: 1296-316, 2002.
- Wirth B., Herz M., Wetter A., Moskau S., Hahnen E., Rudnik-Schoneborn S., Wienker T. et Zerres K.
Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling.
Am J Hum Genet **64**: 1340-56, 1999.
- Wirth B.
An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA).
Hum Mutat **15**: 228-37, 2000.
- Witke W., Hofmann A., Koppel B., Schleicher M. et Noegel A.A.
The Ca(2+)-binding domains in non-muscle type alpha-actinin: biochemical and genetic analysis.
J Cell Biol **121**: 599-606, 1993.
- Witke W., Podtelejnikov A.V., Di Nardo A., Sutherland J.D., Gurniak C.B., Dotti C. et Mann M.
In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly.
Embo J **17**: 967-76, 1998.
- Wolff J.A., Williams P., Acsadi G., Jiao S., Jani A. et Chong W.
Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo.
Biotechniques **11**: 474-85, 1991.
- Wolff J.A., Dowty M.E., Jiao S., Repetto G., Berg R.K., Ludtke J.J., Williams P. et Slautterback D.B.
Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle.
J Cell Sci **103**: 1249-59, 1992.
- Xu Y. et Szoka F.C., Jr.
Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection.
Biochemistry **35**: 5616-23, 1996.
- Yang E., Zha J., Jockel J., Boise L.H., Thompson C.B. et Korsmeyer S.J.
Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death.
Cell **80**: 285-91, 1995.
- Yang X., Arber S., William C., Li L., Tanabe Y., Jessell T.M., Birchmeier C. et Burden S.J.
Patterning of muscle acetylcholine receptor gene expression in the absence of motor innervation.
Neuron **30**: 399-410, 2001.

- Yoo J.J., Soker S., Lin L.F., Mehegan K., Guthrie P.D. et Atala A.
Direct in vivo gene transfer to urological organs.
J. Urol. **162**: 1115-8, 1999.
- Young P.J., Le T.T., thi Man N., Burghes A.H. et Morris G.E.
The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells.
Exp Cell Res **256**: 365-74, 2000.
- Young P.J., Day P.M., Zhou J., Androphy E.J., Morris G.E. et Lorson C.L.
A direct interaction between the survival motor neuron protein and p53 and its relationship to spinal muscular atrophy.
J Biol Chem **277**: 2852-9, 2002.
- Yu L., Nielsen M., Han S.O. et Wan Kim S.
TerplexDNA gene carrier system targeting artery wall cells.
J Control Release **72**: 179-89, 2001.
- Zamore P.D., Patton J.G. et Green M.R.
Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF.
Nature **355**: 609-14, 1992.
- Zerres K.
De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: mutational mechanisms, parental origin, mutation rate, and implications for genetic counseling.
Am J Hum Genet **61**: 1102-11, 1997.
- Zhang G., Budker V., Williams P., Subbotin V. et Wolff J.A.
Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates.
Hum Gene Ther **12**: 427-38, 2001.
- Zhang M.L., Lorson C.L., Androphy E.J. et Zhou J.
An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA.
Gene Ther **8**: 1532-8, 2001.
- Zhou H., Glass D.J., Yancopoulos G.D. et Sanes J.R.
Distinct domains of MuSK mediate its abilities to induce and to associate with postsynaptic specializations.
J Cell Biol **146**: 1133-46, 1999.
- Zieve G.W. et Sauterer R.A.
Cell biology of the snRNP particles.
Crit Rev Biochem Mol Biol **25**: 1-46, 1990.

6-ANNEXES.

61-Composants et substrats du complexe SMN. (D'après Meister *et al.*, 2002.)

Complexe SMN	Interactions avec :
Composants du complexe	
SMN	SMN, Gemin2, 3, 5, 7, Sm D1, D3, B/B'
Gemin2 ou SIP1	SMN, Gemin2, Sm B/B', D1, D3, E
Gemin3 ou dp103	SMN, Gemin4, Sm B/B', D2, D3, E
Gemin4 ou GIP1	Gemin3, Sm B, D1, D3, E, snRNAs U ₁ et U ₅
Gemin5 ou p175	SMN, Sm B, D1, D3, E
Gemin6	Gemin7, Sm D2, E, B, D3
Gemin7	SMN, Gemin6, Sm E, B, D2, D3
Substrats du complexe	
Protéines Sm	SMN, autres protéines Sm
SnRNAs U ₁ , U ₄ , U ₅	SMN, Gemin4
Fibrillarine	SMN
GAR1	SMN
Coiline	SMN
HnRNP Q, R	SMN
Complexe PRMT5	Protéines Sm

62-Composition des milieux de culture et des solutions aqueuses utilisées.

Milieu aneural :

Milieu F14 (Gibco)	500 mL
SVF (Hyclone)	56 mL (10 %)
Insuline (Sigma)	5,6 mL (1 %)
Antibiotiques (Gibco)	5,6 mL (1 %)
FGF (Tebu)	500 μ L
EGF (Tebu)	500 μ L
Glutamine (Gibco)	5,6 mL (1 %)

Milieu de congélation :

Minimum Essential Medium	41 mL (82 %)
SVF (Hyclone)	5 mL (10 %)
DMSO (Sigma)	4 mL (8 %)

Milieu de coculture ou d'innervation :

Minimum Essential Medium	340 mL
Milieu 199	125 mL
SVF (Hyclone)	25 mL
Insuline (Sigma)	5 mL
Antibiotiques (Gibco)	5 mL

Milieu de conditionnement :

Milieu 199	49 mL
SVF	30 mL
Antibio	1 mL

PBS :

NaCl	4 g
KCl	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	0,58 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Eau distillée	qsp 500 mL

Trypsine 10 X :

NaCl	8 g
KCl	0,4 g
NaHCO ₃	0,58 g
Glucose	1 g
Trypsine (1/250)	0,5 g
EDTA Versene Sodique	0,2 g
H ₂ O	qsp 100 ml

63-Transfection par le FuGENE 6 : schéma de préparation des complexes..

Rapport μL (FuGENE 6)- μg (DNA)	Milieu F14 (μL)	FuGENE 6 (μL)	DNA (μL)	Complexes (μL)	
				BP35	Plaque 96 puits
2-1	99	1	1	101	3,3
	98	2	2	102	3,4
	96	4	4	104	3,4
	92	8	8	108	3,6
3-1	98,5	1,5	1	101	3,3
	97	3	2	102	3,4
	94	6	4	104	3,4
	88	12	8	108	3,6
4-1	98	2	1	101	3,3
	96	4	2	102	3,4
	92	8	4	104	3,4
	84	16	8	108	3,6
5-1	97,5	2,5	1	101	3,3
	95	5	2	102	3,4
	90	10	4	104	3,4
	80	20	8	108	3,6
6-1	97	3	1	101	3,3
	94	6	2	102	3,4
	88	12	4	104	3,4
	76	24	8	108	3,6

64-Transfection par l'Effectene : schéma de préparation des complexes..

Rapport 1 µg DNA/ µL Effectene	Tampon EC (µL)	DNA (µL)	Enhancer (µL)	Effectene (µL)	Milieu de culture (µL)	Volume des complexes (µL)	
						BP35	Plaque 96 puits
1/10	99	1	4	5	600	709	23,63
	98	2	8	10		718	23,93
	96	4	16	20		736	24,53
	92	8	32	40		772	25,73
1/20	99	1	4	10	600	714	23,8
	98	2	8	20		728	24,26
	96	4	16	40		756	25,2
	92	8	32	80		812	27,06
1/30	99	1	4	15	600	719	23,96
	98	2	8	30		738	24,6
	96	4	16	60		776	25,8
	92	8	32	120		852	28,4
1/40	99	1	4	20	600	724	24,1
	98	2	8	40		748	24,9
	96	4	16	80		796	26,5
	92	8	32	160		892	29,7
1/50	99	1	4	25	600	729	24,3
	98	2	8	50		758	25,2
	96	4	16	100		816	27,2
	92	8	32	200		932	31

65-Transfection par l'ExGen 500 : schéma de préparation des complexes..

Quantité d'ExGen 500 (Eq.)	Glucose 5 % (μ L)	ExGen500 (μ L)	Glucose 5 % (μ L)	DDN à 0,5 μ g/ μ L (μ L)	Complexes (μ L)	
					BP35	Plaque 96 puits
3	49,55	0,45	49	1	100	3,33
	49,1	0,9	48	2		
	48,2	1,8	46	4		
	46,4	3,6	42	8		
5	49,25	0,75	49	1	100	3,33
	48,5	1,5	48	2		
	47	3	46	4		
	44	6	42	8		
10	48,5	1,5	49	1	100	3,33
	47	3	48	2		
	44	6	46	4		
	38	12	42	8		
1/40	48,1	1,9	49	1	100	3,33
	46,2	3,8	48	2		
	42,5	7,5	46	4		
	35	15	42	8		
1/50	47,7	2,3	49	1	100	3,33
	45,4	4,6	48	2		
	41	9	46	4		
	32	18	42	8		

66-Dosage des protéines par la méthode de Bradford.

661-Lyse des cellules.

Rincer 2 fois les cellules au PBS, puis déposer 300 μ L de tampon de lyse par BP 100 et les laisser 10 min à 4°C.

Tampon de lyse :

Tris 20 mM pH 8	121,4 mg
NaCl 137 mM	400,3 mg
NP-40 1 %	500 μ l
Glycérol 10 %	5 ml
NaF 50 mM	105 mg
NaPPI 10 mM	223,05 mg
Eau milliQ	qsp 50 ml

Ajuster le pH à 8.

Extemporément, à 2 ml de tampon de lyse, rajouter les inhibiteurs de protéase :

E64	1,25 μ l
Leupeptine	5 μ l
Aprotinine	5 μ l
Antipaine	5 μ l
Chymostatine	5 μ l

Gratter la couche cellulaire et récupérer le lysat dans un tube qui est laissé 30 min dans la glace en vortexant régulièrement, puis centrifuger 10 min à 4 °C, 12 000 \times g.

Récupérer le surnageant et le conserver à – 80 °C.

662-Dosage des protéines.

Sur une plaque à 96 puits, réaliser d'abord une gamme-étalon d'albumine sérique de Bœuf en utilisant 4 puits par dose :

Solution aqueuse de BSA à 2 mg/ml (μL)	0	1	2,5	5	7,5	10
Acide chlorhydrique 0,1 mol/L (μL)	20	20	20	20	20	20
Eau (μL)	10	9	7,5	5	2,5	0
Réactif de Bradford (μL)	250	250	250	250	250	250
Concentration en BSA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	0	0,0071	0,017	0,035	0,053	0,0714

Puis, pour chaque échantillon (3 puits/échantillon) mélanger :

10 μl d'eau milliQ
 20 mL Acide chlorhydrique
 0,1 mol/L (μL)
 1 μl d'échantillon
 250 μl de réactif de Bradford

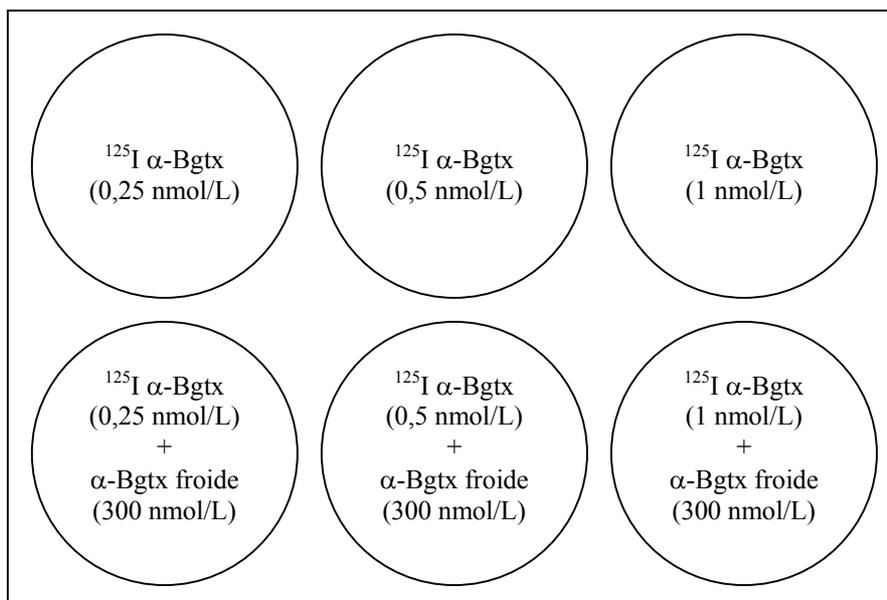
Ajouter le réactif de Bradford au dernier moment.

Lire la DO à 600 nm à l'aide d'un lecteur de plaque, puis déduire la concentration en protéine de chaque échantillon en utilisant logiciel $\Delta\text{SOFT II 4.1 EMS}$.

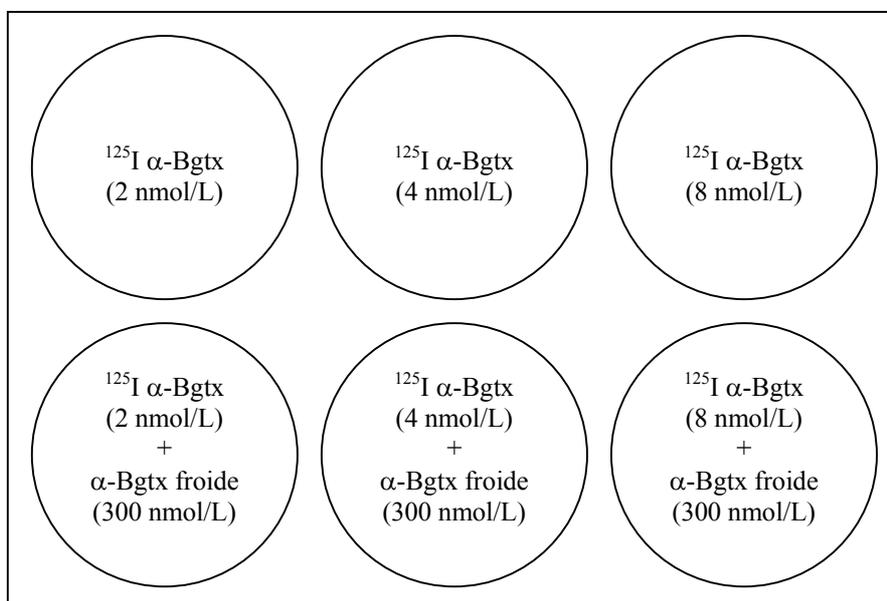
67-Détermination de la liaison spécifique de l' α -bungarotoxine.

Pour chaque donneur, disposer les réactifs en plaques de 6 puits de culture de myotubes selon le schéma ci-dessous :

Plaque 1



Plaque 2



Publication N°1 :

Construction of a plasmid containing human SMN, the SMA determining gene,
coupled to EGFP.

Anne-Sophie Arnold, Mor Gueye, Philippe Rondé, Jean-Marie Warter, Philippe Poindron and
Jean-Pierre Gies.

Plasmid, 2002, **47**, 79-87.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Anne-Sophie Arnold, Mor Gueye, Philippe Rondé, Jean-Marie Warter, Philippe Poindron and Jean-Pierre Gies

Construction of a plasmid containing human SMN, the SMA determining gene, coupled to AGFP.

Plasmid 47, 79-87 (2002)

Pages 79-87 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://dx.doi.org/10.1006/plas.2002.1564>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.

Publication N°2 :

Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts: FuGENE 6, Effectene and ExGen 500.

Anne-Sophie Arnold^P, Vincent Laporte, Aline Appert-Collin, Gilliane Coupin, Rachel Levy, Patrick Erbacher, Philippe Poindron, and Jean-Pierre Gies.

Soumis (Fund & Clin Pharmacol.)

**Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts:
FuGENE 6, Effectene and ExGen 500.**

Anne-Sophie Arnold^{P^{1P}}, Vincent Laporte^{P^{1P}}, Aline Appert-Collin, Gilliane Coupin^{P^{1P}},
Rachel Levy^{P^{1P}}, Patrick Erbacher^{P^{2P}}, Philippe Poindron^{P^{1P}}, and Jean-Pierre Gies^{P^{1P}}.

^{P^{1P}} Laboratoire de Pathologie des Communications entre Cellules Nerveuses et Musculaires
(LPCCNM), EA 3429, Université Louis Pasteur, Faculté de Pharmacie, Illkirch, France ; and

^{P^{2P}} PolyPlus – Transfection SAS, BP 21, Illkirch, France.

Correspondence to: Pr.J.P.Gies, Université Louis Pasteur Strasbourg I, Faculté de
Pharmacie, LPCCNM, 74, route du Rhin, BP 60024, 67401 Illkirch, France. Phone : +33 3 90
24 41 40, email : jean-pierre.gies@pharma.u-strasbg.fr

Comparing reagents for efficient transfection of human primary myoblasts: FuGENE 6, Effectene and ExGen 500.

Abstract.

This study compared three different synthetic reagents (FuGENE 6, Effectene and ExGen 500) for the transfection of human primary myoblasts. We examined the efficiency, cytotoxicity and size of the complexes formed in the presence of different amounts of vector and DNA and with variable amounts of serum. Transfection rates were relatively high for primary cells, especially with FuGENE 6 (20%), which appeared to be the best transfection reagent for these cells, even in the presence of 10% serum. Cultured human myoblasts are an interesting tool for studying neuromuscular diseases and are potentially useful for myoblast transfer therapy studies. Moreover, the efficiency of these transfection reagents in a medium containing 10% serum is promising for possible gene therapy protocols for muscle diseases.

Keyword: Human primary myoblasts; transfection; polycation; cationic lipid; green fluorescent protein (GFP)

INTRODUCTION

Numerous vectors have been developed with the aim of efficiently transporting DNA into target cells and protecting it from nuclease degradation. Among these, viruses (retroviruses or adenoviruses) are most efficient for cell transduction, but they present several disadvantages related to immunogenicity, inflammation, DNA size restriction, and large-scale production constraints. Synthetic vectors have been developed to overcome these limitations [1]. The composition of these vectors is perfectly known; they can form complexes with DNA that are non- or only slightly toxic; they have no size limitations and are easy to prepare in large quantities. Synthetic vectors induce cellular uptake of DNA by complexing nucleic acids and generating particles with positively charged surfaces. These thus bind to the negatively charged membrane through ionic interaction and enter the cell through spontaneous endocytosis, without significant cytotoxicity [2]. Cationic lipids and polymers are prominent synthetic vectors [3]. The combination of polyanionic DNA with cationic lipids produces condensed particles known as lipoplexes [4]. Cationic polymers are rich in amines, which enable them to compact nucleic acids and form complexes called polyplexes.

Few studies have so far tested gene transfer on human primary myoblasts, although these cells are directly involved in many muscle diseases, including Duchenne muscular dystrophy [DMD] and spinal muscular atrophies [SMA], all involving single gene mutations. We compare here 3 synthetic vectors (FuGENE 6, Effectene and ExGen 500) for the transfection of human myoblasts in primary cultures.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

Primary human myoblasts obtained from skeletal muscle biopsies were trypsinized and frozen several times. On day 0 of the experiment, the cells were thawed rapidly by incubating them at 37°C. They were then plated on 0.1% gelatin coated (Sigma, l'Isles d'Abeau Chesnes, France) 35-mm Petri dishes and grown on "aneural" medium [5] consisting of F14 medium (Gibco, Life Technologies Eragny, France) supplemented with 2 mmol/L L-glutamine (Gibco), 10 µg/mL insulin (Sigma), 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF; Tebu, Le Perray en Yvelines, France), 12.5 ng/mL basic fibroblast growth factor (bFGF; Tebu), 10% of fetal calf serum (FCS, HyClone, Perbio, Brebieres, France) and 1% of an antibiotic antimycotic mixture (Gibco). The day before transfection, these myoblasts were plated at a density of 2.10^5 cells/dish in 35-mm dishes (for the transfection efficiency experiments) and 3000 cells/well in 96-well plates (for the cytotoxicity experiments) so that they would reach 50-80% confluence in 24 h.

The cells from the same donor were used for all experiments except for that testing the effect of FCS on transfection reagents, which we studied with cells from a different donor. Both donors were 14-years-old and the cells from the paravertebral muscle were at their 8th passage for all experiments.

Myogenic purity of cell cultures

To verify the myogenic purity of the myoblast cultures, transfected cultures were immunostained with an antibody against desmin (DAKO), a specific marker of muscle cells. Cells were fixed for 30 min at 4°C with paraformaldehyde 4% in PBS. They were permeabilized for 30 min at 4°C with Triton x 100 0.1% in PBS. The cell culture was

saturated for 30 min at room temperature with gelatin 0.5% in PBS and then rinsed with a washing solution (gelatin 0.1%, Tween 20 0.05% in PBS) and incubated for 2 h at room temperature with the primary antibody diluted at 1/200 in the washing solution. The secondary goat anti-mouse antibody, conjugated to cyanine 5 that was diluted at 1/800, was incubated with the cell culture for 1 h at room temperature. Cells were then examined by confocal microscopy. The experiment was done in triplicate and ten fields were randomly counted for each dish.

Transfection procedure

Transfection reagents

Three commercially available transfection reagents were tested. FuGENE 6 (Roche, Meylan, France) is a cationic lipid. No information was available about its composition or its mechanism of action. It was used in amounts of 2, 3, 4, 5 or 6 μl /well with various quantities of DNA. As recommended by the manufacturer, we used only ratios with more FuGENE 6 than DNA, to allow complexing to occur. Complexes were let in contact with the cells for 24 h without changing the medium. The Effectene (QIAGEN, Courtaboeuf, France) is also a cationic lipid. DNA/lipid ratios used ranged from 1/10 to 1/50. The complexes were added directly into the culture medium and let for 16 h before medium replacement. The ExGen 500, or polyethylenimine (PEI) (a gift from Pr. J.P.Behr Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, Illkirch, France), is a cationic polymer. Its mechanism of action allows it to function as a 'proton-sponge' that can prevent DNA degradation [6]. The unit generally used for ExGen 500/DNA complexes is the 'equivalent' corresponding to the number of amino groups in the vector per phosphate group of DNA, that is, the N/P ratio [7]. The transfection complexes diluted in a 5% glucose solution were let in contact with the cells for 4 h.

The DNA was used at the rate of 0.5, 1, 2 or 4 μg per 35-mm dish for each reagent. All complexes were prepared as recommended by the manufacturer.

DNA

Transfections were performed with the pEGFP-C3/SMN plasmid. In this construct, the survival motor neuron (*SMN*) gene responsible for spinal muscular atrophy, a common neuromuscular disease [8], was conjugated to the enhanced green fluorescent protein (EGFP) sequence [5]. This pEGFP-C3/SMN plasmid was amplified in *Escherichia coli* JM109 and purified with the Endo-free Plasmid Maxi kit (QIAGEN).

Transfection efficiency assessment

Fluorescence-activated cell sorting (FACS) was used to assess transfection efficiency. The FACS analyses were performed 24 h after the end of incubation with the transfection mixture. Cells were suspended by trypsination, spun, and resuspended in CELLfix (Becton Dickinson). Non-transfected cells were initially analyzed by size to define a gated region that contained only cells adequately large and granular. This gated region was then analyzed for green fluorescence (488-508 nm) on a FACS Vantage equipped with a 6 W argon laser tuned to 488 nm at 100 mW output power. GFP fluorescence was measured through a 530/30 BP filter. Transfection efficiency was expressed as the percentage of the total cells in the gated region that displayed green fluorescence, that is, expressed the pEGFP-C3/SMN plasmid.

Determining complex size

Complexes underwent quasi-elastic light scattering (QUELS) on a Zetamaster-3 (Malvern Instruments, Orsay, France) to determine their size, measured in nm. After a droplet of each complex was placed on a formvar-covered grid, the complexes were negatively stained with

phosphotungstic acid (1% in water, pH 6.5) and then examined under a Philips EM 410 electron microscope at 40 kV.

Cell viability

Cytotoxicity was assessed by a colorimetric assay with 2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT), reduced to formazan by mitochondrial dehydrogenases in viable cells. Cells seeded in 96-well plates were transfected at the same time and under the same conditions as the cells in 35-mm dishes, but with only one thirtieth of complex volume added to each well. The XTT-PMS mixture was prepared according to the manufacturer's instructions. During exposure, the growth medium was changed and replaced with a FCS-free and phenol red-free medium, because phenol red and FCS interfere with XTT reduction. Absorbance was measured at 450 nm in an ELISA reader (Labsystems iEMS reader MF). Nontransfected cells (representing 30 wells) were used as controls and considered to be 100% viable. The optic density of each well was then related to this value to obtain the percentage of viable cells.

Effect of serum

Primary myoblasts were transfected in the presence of 10%, 5% or serum-free medium. Twenty hours later, cells were fixed and counted with a fluorescence microscope. Transfection efficiency was expressed as the percentage of the total surviving cells that were fluorescent green. Ten fields were randomly counted for each dish, and experiments were performed in triplicate.

RESULTS

The aim of this study was to determine the efficiency of three commonly used transfection reagents as well as their toxicity to primary human myoblasts. All experiments were performed in 10% FCS culture medium (unless otherwise stated) with the plasmid construct pEGFP-C3/SMN. All transfection assays were carried out in triplicate simultaneously for all three transfection reagents and with no reagent for control purposes. Statistical analyses used one-way ANOVA and then Fisher tests.

Myogenic purity of cell cultures

Desmin staining confirmed the muscle origin of most of the cultured cells (Figure 1 a); the fibroblasts seen in the contrast phase microscopy (Figure 1 b) were not desmin-stained. Moreover, EGFP was expressed when the muscle cells were at the myoblast (Figure 1 c) and myotube (Figure 1 d) stages.

Optimization of transfection conditions

To determine which DNA/vector ratios were most efficient for primary myoblasts, we titrated DNA with different amounts of each vector and assessed the results by FACS analyses 24 h afterwards (Figure 2). This study showed that a volume of 5 μ l of FuGENE 6 produced the maximal efficiency in all DNA conditions ($23.1 \pm 11.2\%$ of transfected cells with 2 μ g of DNA, for example). For Effectene, on the other hand, increasing vector volume had no effect on efficiency for a given amount of DNA. Efficiency was best with the complexes formed with 4 μ g of DNA ($14.1 \pm 0.8\%$ of transfected cells at the ratio of 1/20), but this reagent was not as efficient as FuGENE 6. ExGen 500 was significantly more effective when 12.5 eq was mixed with 0.5, 1 and 2 μ g of DNA ($11.2 \pm 2.1\%$ of transfected cells), while 10 eq were

sufficient to achieve efficient transfection when complexes contained 4 μg of DNA ($11.5 \pm 6.7\%$ of transfected cells).

Accordingly, FuGENE 6 seemed to be the best efficient transfection reagent for primary human myoblasts in this experiment.

Complex size

A critical determinant of efficient transfection is the overall ratio of the positive charges on the cationic vector to the negative charges on the DNA plasmid. Different mixing ratios generate complexes with different physicochemical characteristics, which in turn significantly affect cellular uptake and subsequent intracellular trafficking [9] [10]. We addressed that issue by using QUELS to determine the size of the complexes (Figure 3) and by electron microscopy observation (Figure 4). The lack of information about the composition of the buffers and transfection reagents made it difficult to interpret the findings for FuGENE 6 and Effectene. The complexes formed with FuGENE 6 were enormous and they tended to aggregate, as seen clearly in Figure 4 a. This phenomenon may well explain the great variability in transfection efficiency (Figure 2). The complexes formed with FuGENE 6/DNA ratio of 6/1, reached the size of 3704.8 ± 1275.1 nm and the ones formed with 5 μL of FuGENE were still bigger, so the measures were not reliable enough to be shown. For Effectene, the complex size, like transfection efficiency, did not differ significantly according to DNA/reagent ratio (1/10 in Figure 4 c, 1/20 in Figure 4 d): complexes ranged in size from 513.3 ± 32.4 nm to 670.9 ± 44.0 nm. The size of the polyplexes formed with ExGen 500 decreased as the N/P ratio increased: from 70.9 ± 2.7 nm at 3 eq (Figure 4 e) to 35.9 ± 5.8 nm at 12.5 eq (Figure 4 f) with homogeneous sizes. We also examined the complexes formed with 15 eq of ExGen 500, but they were too small (< 35 nm) and the measures were not

reliable enough. The large complexes formed with FuGENE 6 provided better transfection efficiency than the smaller complexes formed with Effectene and ExGen 500.

Cytotoxicity to primary myoblasts

The cytotoxicity of the transfection complexes to primary human myoblasts was tested with the colorimetric XTT test (Figure 5). FuGENE 6 was significantly cytotoxic ($p < 0.001$) in complexes formed with more FuGENE 6 than DNA. More specifically, in these situations, complexes could not be formed and transfection was totally inefficient, or rather non-existent (data not shown). Increasing the amount of Effectene had no effect on cytotoxicity. ExGen 500, however, showed major cytotoxicity at amounts of 10 eq or more in the presence of 2 μ g of DNA. More than 50% of the cells died.

FuGENE 6 thus seemed best able to combine transfection efficiency and lack of cytotoxicity for use with human primary myoblasts.

Effect of serum on transfection efficiency and cell survival

In cell culture systems, non-viral transfections are used in serum-free medium to eliminate the inhibitory effect of some serum molecules. We studied the serum dependence of the transfection reagents in one DNA/vector condition with cells from a different donor. Transfection efficiency was lower with these cells (Table 1). Moreover, for all three reagents, it varied substantially when medium was serum-free. We attributed this to variability in the cultures themselves. FuGENE 6 seemed to be, as stated by the manufacturer, serum independent and, indeed, was even more efficient in the presence of 10% FCS ($9.8 \pm 9.0\%$ of transfected cells in serum-free medium, and $13.7 \pm 1.0\%$ in medium containing 10% FCS). The transfection efficiency of Effectene was inversely proportional to the serum quantity.

Hence, all three reagents FuGENE 6, Effectene and ExGen 500 were efficient in transfection even in the presence of serum.

DISCUSSION

Human primary myoblasts represent a potentially important target for gene transfer because point mutations are involved in many muscular afflictions. *Ex vivo* delivery, referred to as myoblast transfer therapy (MTT) [11], may be an effective alternative for these types of genetic diseases. This method consists of transplanting normal myoblasts into muscles of patients with such muscle diseases as DMD or SMA, to restore the expression of the mutated gene responsible for the disease. Muscle satellite cells (MSC) are particularly interesting to use in this technique [12] because they become an integral part of the muscle into which they are injected and adapt themselves to local signals in their immediate environment [13]. This procedure is impeded, if not completely blocked, by the massive donor myoblast death set off by the host immune response, but its prognosis is improved by careful selection of donor myoblasts and host muscles [14].

The problems presented by this technique have recently been reviewed, and several teams are trying to improve this protocol [15, 16, 17]. One solution might be to use cells from the patients themselves and thereby prevent rejection or immune response development [18]. Use of naked DNA has been tested to modify the cells genetically, and results of direct naked DNA transfer are most promising in muscle tissue [19]. Electroporation increases DNA expression levels in muscles at least 10-fold [20], and the transfer of naked DNA by intravascular delivery led to β -galactosidase expression in 50% of myofibers. The problem is the rapid loss of expression after the DNA plasmid gene delivery [21]. Herweijer and Wolff [22] have reviewed these experiments about naked DNA delivery. The synthetic vector thus

remains the best candidates in terms of efficiency allied with safety (the viral solution being efficient, but not as safe), especially for primary cells, which typically show low transfection efficiency rates [23] [24] [25] [26] [27]. A recent study suggests that the intracellular delivery pathway in human myoblasts may be responsible for the low transfection levels and thus be correlated with more rapid delivery of internalized complexes to the lysosomal compartment [23].

The transfection rates obtained in this study were quite satisfactory for cells of human origin, especially from primary cultures (compared with the examples mentioned above). Our assessment of complex size (Figures 3, 4) confirms that complexes formed with FuGENE 6, generally larger than the smaller ones obtained with the Effectene and the ExGen 500 produced the best efficiency *in vitro*, as previously reported [28]. Muscle cells responded best to lipoplexes with a diameter of 500 nm and 1 μ m. Complexes formed with Effectene reached this size in every DNA/vector condition (Figures 3, 4), but still did not achieve high transfection efficiencies (Figure 2). The small complexes formed with ExGen 500 (Figures 3, 4) were less efficient in transfection (Figure 2) and far more toxic (Figure 5). We showed that all 3 transfection reagents were efficient even in the presence of FCS 10% (Table 1). Transfection experiments can thus be conducted in the presence of serum, an essential feature for *ex vivo* protocols.

These results indicate that FuGENE 6 is the best reagent for transfecting human primary muscle cells, as it was for rat primary muscle cells [29]. Human muscle tissue is far too extensive for any *in vivo* treatment to apply MTT exclusively. Respiratory muscles may be the first candidates that should be targeted since patients with these disorders generally die from respiratory failure. One strategy might be to transfer the gene into skeletal muscles by systemic injection of FuGENE 6–DNA complexes. This procedure was tested with DODAC lipoplexes and produced significant levels of gene transfer in regenerating muscle [30].

In summary, this study showed that FuGENE 6 appears to be a better reagent than ExGen 500 and Effectene for the transfection of human primary myoblasts: it yielded promising results (20% of transfected cells). This concept may be important for the further development of safe and efficient *ex vivo* gene therapy protocols targeting muscle cells and would open up possibilities for treatment of many diseases, including DMD and SMA.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Association Française contre les Myopathies (AFM Grant 2002) and a fellowship from the Région Alsace. We want to thank Dr. S.Dumont who performed the FACS experiments, and David-John Fraser and Nada Choucair for the English corrections. We also thank Dr. M. Dontenwill for the invaluable informations about the XTT protocol.

REFERENCES

- 1 Schofield J.P., Caskey C.T. Non-viral approaches to gene therapy. *Br. Med. Bull.* (1995) **51**, 56-71.
- 2 Barron L.G., Szoka F.C. The perplexing delivery mechanism of lipoplexes. In: Huang L., Hung M.C., Wagner E (eds). *Non viral vectors for gene therapy*. Academic Press San Diego (1999) 230-267.
- 3 Behr J.P. Gene transfer with synthetic cationic amphiphiles: prospects for gene therapy. *Bioconjug. Chem.* (1994) **5**, 382-389.
- 4 Pitard B., Aguerre O., Airiau M., et al. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1997) **94**, 14412-14417.
- 5 Arnold A.S., Gueye M., Ronde P., et al. Construction of a plasmid containing human SMN, the SMA determining gene, coupled to EGFP. *Plasmid* (2002) **47**, 79-87.
- 6 Behr J. The proton sponge - a trick to enter cells the viruses did not exploit. *CHIMIA* (1997) **51**, 34-36.
- 7 Boussif O., Lezoualc'h F., Zanta M.A., et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (1995) **92**, 7297-7301.
- 8 Lefebvre S., Burglen L., Reboullet S., et al. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* (1995) **80**, 155-165.
- 9 Mount C.C., Lee L.K., Yasin A., et al. The influence of physico-chemical and process conditions on the physical stability of plasmid DNA complexes using response surface methodology. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2003) **9**, 9.

- 10 Sakurai F., Inoue R., Nishino Y., et al. Effect of DNA/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid DNA/cationic liposome complexes and subsequent gene expression. *J. Control. Release* (2000) **66**, 255-269.
- 11 Smythe G.M., Hodgetts S.I., Grounds M.D. Immunobiology and the future of myoblast transfer therapy. *Mol. Ther.* (2000) **1**, 304-313.
- 12 Wolff J.A., Dowty M.E., Jiao S., et al. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J. Cell. Sci.* (1992) **103**, 1249-1259.
- 13 Bowie K.M., Chang P.L. Development of engineered cells for implantation in gene therapy. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* (1998) **33**, 31-43.
- 14 Qu Z., Huard J. Matching host muscle and donor myoblasts for myosin heavy chain improves myoblast transfer therapy. *Gene Ther.* (2000) **7**, 428-437.
- 15 Qu Z., Balkir L., Van Deutekom J.C., et al. Development of approaches to improve cell survival in myoblast transfer therapy. *J. Cell Biol.* (1998) **142**, 1257-1267.
- 16 Seigneurin-Venin S., Bernard V., Moisset P.A., et al. Transplantation of normal and DMD myoblasts expressing the telomerase gene in SCID mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000) **272**, 362-369.
- 17 Smythe G.M., Grounds M.D. Absence of MyoD increases donor myoblast migration into host muscle. *Exp. Cell Res.* (2001) **267**, 267-274.
- 18 Smythe G.M., Hodgetts S.I., Grounds M.D. Problems and solutions in myoblast transfer therapy. *J. Cell Mol. Med.* (2001) **5**, 33-47.
- 19 Wolff J.A., Ludtke J.J., Acsadi G., Williams P., Jani A.. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum. Mol. Genet.* (1992) **1**, 363-369.

- 20 Hartikka J., Sukhu L., Buchner C., et al. Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol. Ther.* (2001) **4**, 407-415.
- 21 Herweijer H. Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver. *J. Gene. Med.* (2001) **3**, 280-291.
- 22 Herweijer H., Wolff J.A.. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene. Ther.* (2003) **10**, 453-458.
- 23 Pampinella F., Lechardeur D., Zanetti E., et al. Analysis of differential lipofection efficiency in primary and established myoblasts. *Mol. Ther.* (2002) **5**, 161-169.
- 24 Dodds E., Dunckley M.G., Naujoks K., Michaelis U., Dickson G. Lipofection of cultured mouse muscle cells: a direct comparison of Lipofectamine and DOSPER. *Gene Ther.* (1998) **5**, 542-551.
- 25 Vitiello L., Bockhold K., Joshi P.B., Worton R.G. Transfection of cultured myoblasts in high serum concentration with DODAC:DOPE liposomes. *Gene Ther.* (1998) **5**, 1306-1313.
- 26 Campeau P., Chapdelaine P., Seigneurin-Venin S., Massie B., Tremblay J.P. Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther.* (2001) **8**, 1387-1394.
- 27 Trivedi R.A., Dickson G. Liposome-mediated gene transfer into normal and dystrophin-deficient mouse myoblasts. *J. Neurochem.* (1995) **64**, 2230-2238.
- 28 Ogris M., Steinlein P., Kursa M., et al. The size of DNA/transferrin-PEI complexes is an important factor for gene expression in cultured cells. *Gene Ther.* (1998) **5**, 1425-1433.
- 29 Neuhuber B., Huang D.I., Daniels M.P., Torgan C.E. High efficiency transfection of primary skeletal muscle cells with lipid-based reagents. *Muscle Nerve* (2002) **26**, 136-140.
- 30 Pampinella F., Pozzobon M., Zanetti E., et al. Gene transfer in skeletal muscle by systemic injection of DODAC lipopolyplexes. *Neurol. Sci.* (2000) **21**, S967-969.

Titles and legends to figures.

Figure 1: Micrographs of human primary cells. Desmin immunostaining of the muscle cell culture examined by fluorescence microscopy (a) and phase microscopy (b) show that muscle cells account for 66 ± 7.6 % of the culture. Micrographs of desmin-immunostained transfected cells observed by confocal microscopy show double desmin (red) and GFP (green) staining (c). Transfected muscle cell cultures examined by fluorescence microscopy show that the myotubes are transfected as well (d).

Figure 2: Optimization of transfection conditions for FuGENE 6, Effectene and ExGen 500. Primary myoblasts were plated onto 35-mm dishes and left to grow overnight. The following day, the cultures were transfected with different conditions of DNA and vectors. Transfection efficiency was assessed by FACS analyses and expressed as the ratio of the GFP-positive cells to total cells in the gated region. Data represent mean \pm standard deviation (n=3 independent cultures).

Figure 3: Determination of the size of transfection reagent/DNA complexes, measured by QUELS. Bars on graphs represents the mean \pm standard deviation of three separate size evaluations.

Figure 4: Electron micrograph of complexes prepared with FuGENE 6-DNA ratio of 3/1 (a), 3/2 (b), with DNA/Effectene ratio of 1/10 (c), 1/20 (d), and finally with ExGen 500 at 3 eq (e) and 12.5 eq (f). Arrows represent the size corresponding to what was assessed by QUELS.

Figure 5: Cytotoxicity of the lipid-based reagents on human primary myoblasts. Cells were transfected and then underwent an XTT cytotoxicity assay. Cell viability of non-treated cells (n=30) was considered to be 100%. The OD was related to the percentage of viable cells in each well (n=3). Data represent mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by a Fisher test. Stars represent concentrations at which cytotoxicity was statistically significant in comparison with the control cells *p<0.005 **p<0.001.

Table 1: Effect of FCS on transfection efficiencies. Primary myoblasts were transfected with 2 μ g of DNA combined with FuGENE 6 (5 μ l), Effectene (1/10) and ExGen 500 (12.5 eq) in the presence of different amounts of FCS. The following day, cells were PFA 4% fixed and observed under a fluorescence microscope. Transfection efficiency was expressed as the percentage of total surviving cells that were fluorescent. Values are mean \pm standard deviation (n=3 independent cultures). * p<0.05 between 5 and 10 % of FCS.

Publication N°3 :

Reduced expression of nicotinic AChRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients.

Anne-Sophie Arnold, Mor Gueye, Severine Guettier-Sigrist, Isabelle Courdier-Fruh, Gilliane Coupin, Philippe Poindron and Jean-Pierre Gies.

Lab. Invest. 2004, **84**, 1271-1278.

[signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Anne-Sophie Arnold, Mor Gueye, Séverine Guettier-Sigris, Isabelle Courdier-Fruh, Gilliane Coupin, Philippe Poindron and Jean-Pierre Gies

Reduced expression of nicotinic AchRs in myotubes from spinal muscular atrophy I patients.

Laboratory Investigation 84, 1271-1278 (2004)

Pages 1271-1278 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur

<http://www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/labinvest/journal/v84/n10/full/3700163a.html&filetype=pdf>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr.