



Presqu'île de Giens,

15-17 Juin 2008

Sponsors du Congrès



REMERCIEMENTS

Aux intervenants

Steve J Russell
Marcelle Machluf
Jean-Jacques Lataillade
Gillian Butler-Browne
Eric Tartour
Jacques Mallet
Michele De Palma

Aux membres du bureau et du comité d'organisation

François Lemoine, Président
Nathalie Cartier, Vice-Présidente
Nicolas Ferry, Vice-Président
Martine Guigon, Trésorière
Anne Galy, Trésorière adjointe
Anne Dubart-Kupperschmitt, Secrétaire
Sophie Gomez, site Internet
Olivier Boyer
François-Loïc Cosset
Alberto Epstein
Pierre Lehn
Patrick Midoux
Anna Salvetti
Daniel Scherman
Anne Weber

Claude Baillou et Sarah Falzon

A tous les participants



7^{ème} Congrès de la
**Société Francophone
de Thérapie Cellulaire et Génique**

Presqu'île de Giens, 15-17 Juin 2008

PROGRAMME

DIMANCHE 15 JUIN

18h00

Ouverture du congrès

18h30-19h15

Conférence d'ouverture :

Invité: Steve J Russell

Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, USA

Oncolytic vectors and cancer

Modérateur : François-Loïc Cosset

19h15

Cocktail d'ouverture du colloque suivi du diner

21h00-23h00

Ateliers thématiques

Atelier 1 :

Vecteurs viraux et non viraux: Voyage au cœur de la cellule et transport du gène dans le noyau

Modérateurs : Anne Dubart Kupperschmitt et Patrick Midoux

Invités: Morvane Colin, Inserm U837, Lille

Pierre Charneau, Institut Pasteur, Paris

Luc Wasungu, IPBS, Toulouse

Gilles Breuzard, CNRS UPR4301, Orléans

Atelier 2 :

La stratégie virolytique pour le traitement des cancers

Modérateurs : Anna Salvetti et Alberto Epstein

Invités: Jean Rommelaere, Inserm U701, Heidelberg

Georges Vassaux, Inserm CIC04, Nantes

LUNDI 16 JUIN

8h30-10h

Session vectorologie

Invitée: Marcelle Machluf

Technion-Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

Therapeutic ultrasound-mediated gene transfer

Modérateurs: Anna Salvetti et Patrick Midoux

Communications orales sélectionnées:

- **Gilles Breuzard**, Magdalena Tertil, Cristine Gonçalves, Hervé Cheradame, Philippe Géguan, Chantal Pichon, Patrick Midoux; *Nuclear delivery of NFkB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging.*
CNRS UPR4301, Orléans
- **Emilie Letrou-Bonneval**, Chèvre R, Labas R, André C, Tellier C, Pitard B; *Développement d'une nouvelle classe de vecteurs pour le transfert de gène pulmonaire.*
Inserm U915, Nantes
- **Cécilia Frecha**, Costa Caroline, Nègre Didier, Gauthier Emmanuel, Russell Stephen J, Cosset François-Loïc, and Verhoeyen Els; *Stable transduction of quiescent T-cells without induction of cycle progression by a pseudotyped novel lentiviral vector.*
Inserm U758-ENS de Lyon

10h-10h30

Pause

10h30-12h45

Session thérapie cellulaire

Invité: Jean-Jacques Lataillade

Centre de Transfusion Sanguine des Armées Jean Julliard,

Clamart, France

Thérapie cellulaire des brûlures cutanées radio-induites

Invitée: Gillian Butler-Browne

Inserm U787, Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Paris, France

Autologous myoblast transplantation in the pharyngeal muscles to correct dysphagia in patients with oculo-pharyngeal muscular dystrophy

Modérateurs : Gillian Butler-Browne et Jean-Jacques Lataillade

Communications orales sélectionnées:

- Thomas Touboul, **Sébastien Corbineau**, Goulinet-Mainot Sylvie, Martinez Amélie, Helvig Blandine, Dubart-Kupperschmitt Anne, Vallier Ludovic, Weber Anne; *Différenciation de cellules souches embryonnaires humaines en progéniteurs hépatiques.*
Inserm U804, Le Kremlin-Bicêtre
- **Virginie Pichard**, Dominique Aubert et Nicolas Ferry; *Etude comparative des lignages cellulaires dans deux modèles de régénération hépatique. Laboratoire de Biothérapie Hépatique.*
Inserm CIC04, Nantes

- **Maude Guillot-Delost**, Mustapha Cheraï, Yamina Hamel, Michelle Rosenzweig, Claude Baillou, Ghislaine Simonin, Virginie Leclercq, Maria Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Adrien Six, Véronique Bon-Durand, Sébastien Maury, Benoit L. Salomon, José L. Cohen, David Klatzmann, François M. Lemoine; *Clinical grade preparation of human natural regulatory T-cells encoding the thymidine kinase suicide gene as a safety gene.*
UMR CNRS 7087 & UPMC & AP-HP Pitié Salpêtrière, Paris

12h45- 14h00

Déjeuner

14h00-15h00

Assemblée générale de la SFTCG

REMISE DU PRIX THERMO

15h00-16h30

Session Vaccinologie-Immunothérapie

Invité: Eric Tartour

Université Paris Descartes, Paris, France

Ciblage de cellules dendritiques in vivo: applications vaccinales

Modérateurs : Eric Tartour et François Lemoine

Communications orales sélectionnées:

- Anne Gauthier, Samantha Brandler, Carole Sapède-Peroz, **Nicolas Boisgerault**, Frédéric Tangy et Marc Gregoire; *Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response.*
Inserm U892, NANTES
- Virginie Westeel, Alain Rivière, Anne Madroszyk, Jean-Luc Breton, Denis Braun, Didier Debievre, Hervé Léna, Eric Dansin, **Jean-Marc Limacher**, Elisabeth Quoix; *Randomized phase IIb trial evaluating the therapeutic vaccine TG4010 (MVA-MUC1-IL2) as an adjunct to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).*
Transgene SA, Strasbourg
- **Muriel Sudres**, David-Alexandre Gross, Christine Lebec, Anne Douar, Anne Galy; *Les réponses immunitaires contre le vecteur recombinant AAV2/1 chez la souris.*
Genethon, Evry

Grande Pause

18h30-20h00

Session de posters autour d'un apéritif

20h00

Dîner

MARDI 17 JUIN

8h30- 10h15

Session Maladies génétiques et Maladies dégénératives

Invité: Jacques Mallet

Université Pierre et Marie Curie Paris 6, Cnrs UMR 7091, Paris, France.

Lentiviral gene transfer: towards the clinic

Modérateurs : Nathalie Cartier-Lacave et Jacques Mallet

Communications orales sélectionnées:

- **Eloise Hudry**, Debby Van Dam, Wim Kulik, Peter Paul De Deyn, Femke S. Stet, Ornella Ahouansou, Abdellatif Benraiss, André Delacourte, Pierre Bougnères, Patrick Aubourg, Nathalie Cartier-Lacave; *Surexpression de la cholesterol-24-hydroxylase dans la maladie d'Alzheimer: Une nouvelle perspective thérapeutique.* Inserm U745, Paris
- **Audrey Rayssac**, Neveu, C, Lourenço-Dias, L, Pucelle, M, Chaufour X and Prats, AC; *A new approach of gene therapy in a murine ischemic hindlimb model.* Inserm U858, Toulouse
- **Roland Vogel**, Mammeri Hamid, Mallet Jacques; *Lentiviral vectors mediate "rapalogue"-induced production of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the brain: regulation at the level of transcription and secretion.* CNRS-UMR 7091, Paris
- **J Cossonnière***, M Cambot*, C Lavenu-Bombled*, B Izac#, E Souil#, JM Massé#, A Schmitt#, JP Rosa§, A Dubart-Kupperschmitt* ; *Thérapie génique de l'hémophilie B : nouvelle approche dans un modèle de souris invalidées pour le gène du Facteur IX*
* Inserm U 804 Université Paris XI, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre ; # Inserm U 567 Université Paris V, Institut Cochin, Paris ; § Inserm U770, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre

10h15-10h45

Pause

10h45-12h15

Session Cancer, maladies infectieuses

Invité: Michele De Palma

San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italy

Gene and cell therapy of metastatic tumors by tumor-targeted myeloid cells expressing interferon-alpha

Modérateurs : Olivier Boyer et Nicolas Ferry

Communications orales sélectionnées:

- **Céline Bouquet**, Trochon-Joseph V, Ransy C, Thomaidis A, Soria C, Lu He, Mir LM, Perricaudet M, Lebel-Binay S; *Traitement du mélanome métastatique par électrotransfert du plasmide p-AMEP™, codant pour le peptide anti-angiogénique et anti-métastatique AMEP™.*
BioAlliance Pharma, Paris
- **Sebastian Dempe**, J. Rommelaere, and C. Dinsart; *SMAD4, a cellular determinant for the permissiveness of pancreatic carcinomas to parvovirus-induced oncolysis.*
Inserm U701, Heidelberg
- François Lamoureux, Picarda G, **Julie Rousseau**, Gourden C, Battaglia S, Charrier C, Trichet V, Pitard B, Gouin F, Heymann D, Rédini F; *Therapeutic efficacy of soluble Receptor Activator of NF-kappaB delivered by non viral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma.*
Inserm ERI7, Nantes

12h15- 12h30

Remise des prix de la meilleure communication orale et du meilleur poster

12h30

Déjeuner
Clôture du Congrès

Ateliers thématiques

Dimanche 15 Juin 21h00-23h00

Atelier 1 : Vecteurs viraux et non viraux: Voyage au cœur de la cellule et transport du gène dans le noyau

Modérateurs : Anne Dubart Kupperschmitt et Patrick Midoux

Invités: Morvane Colin, Inserm U837, Lille
Pierre Charneau, Institut Pasteur, Paris
Luc Wasungu, IPBS, Toulouse
Gilles Breuzard, CNRS UPR4301, Orléans

Atelier 2 : La stratégie virolytique pour le traitement des cancers

Modérateurs : Anna Salvetti et Alberto Epstein

Invités: Jean Rommelaere, Inserm U701, Heidelberg
Georges Vassaux, Inserm CIC04, Nantes

RESUMÉS

des présentations orales

par session et dans l'ordre du programme

Conférence d'ouverture :

Dimanche 15 Juin 18h30-19h15

Oncolytic Vectors and Cancer:

Stephen J. Russell, M.D., Ph.D

Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, USA

Oncolytic viruses propagate in tumor tissue, but not in normal non-cancerous tissues. Specificity for neoplastic tissue is the key to their safety and this goal can be achieved through a variety of ingenious virus engineering strategies. Recent developments in this area, including the generation of viruses susceptible to tissue specific micro-RNAs, will be discussed. Antiviral immunity still remains the most significant barrier to clinical efficacy of oncolytic viruses and is being addressed through the use of novel virus formulations and immunosuppressive drugs. Non-invasive monitoring of virus propagation in treated human subjects will provide clinical data on their pharmacokinetics and will be key to accelerating their development and improvement as effective anticancer drugs. Approaches to the generation and translation of viruses amenable to non-invasive pharmacokinetic monitoring and strategies that have the potential to maintain efficacy in the face of antiviral immunity will be presented.

SESSION VECTOROLOGIE

Lundi 16 Juin 8h30-10h15

Présentation invitée

Therapeutic ultrasound mediated gene delivery: efficacy and insight to the mechanism

Prof Marcelle Machluf

Faculty of Biotechnology and Food Engineering, Technion, Haifa, Israel

Therapeutic ultrasound waves (TUS) are known as a safe non-viral vector for the delivery of therapeutics. TUS efficacy in delivering gene to different cells and tissue, particularly malignant tissue, place it as a promising technology for different clinical gene therapy applications. Our work focuses on developing this technology for *in vitro* gene delivery as well as on the translation of this technology from the *in vitro* to the *in vivo* setting demonstrating its efficacy on tumor inhibition. The use of TUS offers a way to localize the transfection and control the duration of gene expression by using repeated treatments, without any side effects. We have optimized this technology to repeatedly deliver gene encoding for antiangiogenic protein leading to 80% inhibition of prostate tumor volume. Our recent unpublished studies attempt to reveal also the mechanism that underline TUS mediated gene transfection particularly the possible effect of TUS on the nucleus itself. The possibility that TUS operates directly on the nuclear envelope (NE) or affects DNA transport through the nuclear pore complex (NPC) is intriguing. Intracellular trafficking of the DNA was found, to be mediated mostly by the force applied by the TUS rather than by endocytosis pathways or interaction with the cytoskeleton network. Initial indication suggested that TUS affects also the nuclear membrane, delivering the DNA though it directly to the nucleus.

Présentations sélectionnées

Nuclear delivery of NF κ B-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging.

Gilles Breuzard¹, Magdalena Tertil¹, Cristine Gonçalves¹, Hervé Cheradame², Philippe Géguan², Chantal Pichon¹, Patrick Midoux¹.

¹ Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301 affiliated to the University of Orléans and INSERM, rue Charles Sadron, F-45071 Orléans Cedex 2 (France).

² Laboratoire Matériaux Polymères aux Interfaces CNRS UMR 7581, Université d'Evry, F-91025 Evry (France).

Quantification of a plasmid DNA (pDNA) and investigation of its polymer-associated state in the nucleus are crucial to evaluate the effectiveness of a gene delivery system. This study was conducted with p3NF-luc-3NF, a pDNA bearing optimized κ B motif to favour NF κ B-driven nuclear import. Here, a quantification of pDNA copies in the nucleus was performed by real-time confocal laser scanning microscopy in HeLa and C2C12 cells transfected with linear polyethylenimine or histidylated polylysine. Förster Resonance Energy Transfer (FRET) from the *fluorescein*-p3NF-luc-3NF donor to the co-localized *rhodamine*-polymer acceptor was carried out to investigate whether the pDNA was still condensed with the polymer in the nucleus. Upon 5h transfection, the nuclear amount of p3NF-luc3NF was ~1500 copies in both cell lines whereas that of pTAL-luc, a 3NF-free counterpart pDNA, was less than 250. This quantity of p3NF-luc-3NF dropped dramatically to that of pTAL-luc in the presence of the BAY 11-7085, an inhibitor of NF κ B activation. These data strongly support a nuclear import of p3NF-luc3NF mediated by NF κ B. Moreover, FRET experiments clearly revealed that most of nuclear pDNA were still condensed with the polymer raising the question of their passage through the nuclear pore complex and their impact on the gene expression efficiency. [Epub ahead of print in *Nucleic Acids Res.*]

Développement d'une nouvelle classe de vecteurs pour le transfert de gène pulmonaire.

Letrou-Bonneval E.^{1,2,3}, Chèvre R.^{1,2}, Labas R.^{1,2}, André C.³, Tellier C.³, Pitard B.^{1,2}

¹ Inserm, U915, Nantes, F-44035 France, ² Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France, ³UMR-CNRS 6204 Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, UFR Sciences, 2 rue de la Houssinière - BP 44322 Nantes Cedex 3

- Objectif : Le transfert de gène non viral dans les poumons représente aujourd'hui un enjeu majeur pour traiter de nombreuses pathologies pulmonaires acquises ou héréditaires comme la mucoviscidose. Différentes familles de vecteurs cationiques synthétiques ont été étudiées pour le transfert de gène dans cet organe mais leur faible efficacité et leur forte cytotoxicité limitent leur développement. Notre équipe a donc récemment identifié une nouvelle classe de vecteurs adaptés au transfert de gène pulmonaire, les copolymères à blocs amphiphiles ioniques et non ioniques. Il a été montré qu'il existe des récepteurs au galactose capables de médier l'endocytose à la surface des cellules épithéliales des voies aériennes humaines. Nous nous proposons donc d'optimiser le potentiel de transfert de gène des copolymères à blocs en greffant à leurs extrémités des motifs galactose afin d'augmenter le ciblage spécifique de ces cellules.

- Méthodes : Les copolymères à blocs ont été fonctionnalisés par voie chimique en 4 étapes avec un taux de greffage des motifs galactose proche de 80%. Divers gènes rapporteurs ont été complexés aux copolymères à blocs galactosylés puis injectés en intratrachéale dans les poumons de souris.

- Résultats : La présence de galactose améliore non seulement l'efficacité de transfection des copolymères à blocs mais permet également de maintenir l'expression du transgène dix jours après l'injection. De plus, les copolymères à blocs galactosylés permettent de transférer une zone plus étendue de tissu parenchymal. Ces résultats semblent indiquer que les copolymères à blocs galactosylés seraient internalisés par un plus grand nombre de cellules que les copolymères à blocs non galactosylés.

- Conclusion : Cette nouvelle génération de vecteurs synthétiques devrait permettre d'augmenter considérablement l'efficacité du transfert pulmonaire du transgène.

Ce travail fait l'objet d'un soutien par l'Association Vaincre la Mucoviscidose

Stable transduction of quiescent T-cells without induction of cycle progression by a pseudotyped novel lentiviral vector.

Cecilia Frecha¹, Caroline Costa¹, Didier Nègre¹, Emmanuel Gauthier¹, Stephen J Russell², François-Loïc Cosset^{1,*} and Els Verhoeven^{1,*}

¹ Université de Lyon, F69000; Inserm, U758, Human Virology Department, F-69007; Ecole Normale Supérieure de Lyon, F-69007; Université Lyon 1, F-69007, Lyon, France.

² Department of Molecular Medicine, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

A major limitation of current lentiviral vectors (LVs) is their inability to govern efficient gene transfer into quiescent cells such as primary T-cells, which hampers their application for gene therapy. Here we generated high titer LVs incorporating Edmonston measles virus (MV) glycoproteins H and F on their surface. They allowed efficient transduction through the MV receptors, SLAM and CD46, both present on blood T-cells. Indeed, these H/F-displaying vectors outperformed by far VSV-G-LVs for the transduction of IL-7-prestimulated T-cells. More importantly, a single exposure to these H/F-LVs allowed efficient gene transfer in quiescent T-cells, which are not permissive for VSV-G-LVs that need cell cycle entry into the G1b phase for efficient transduction. High-level transduction of resting memory (40%) and naive T-cells (11%) with H/FLVs, which seemed to occur mainly through SLAM, was not at cost of cell cycle entry or of target T-cells activation. Finally, the naive or memory phenotype and the functional characteristics of transduced resting T-cells were maintained and no skewing of T-cell subsets was detected. Thus, H/F-LV transduction of resting T-cells overcomes the limitation of current lentiviral vectors and may improve the efficacy of T-cell based gene therapy.

SESSION THERAPIE CELLULAIRE

Lundi 16 Juin 10h30-12h45

Présentations invitées

A new therapeutic approach of severe radiation burns by mesenchymal stem cell local administration.

J.J. Lataillade¹, E. Bey², M. Prat¹, J.M. Bertho³, J.F. Bottolier-Depois³, T. De Revel², and P. Gourmelon³.

1- Centre de Transfusion Sanguine des Armées, BP 410, 92141 Clamart cedex, France.

2- Hôpital d'Instruction des Armées Percy., BP410, 92141 Clamart Cedex, France

3- Institut de Radioprotection et de sûreté Nucléaire (IRSN), BP n°17, 92262 Fontenay aux roses cedex, France

e-mail: jjlataillade@ctsa-armees.fr

The therapeutic management of severe radiation burns remains a challenging issue. Conventional surgical treatment (excision and skin autograft or rotation flap) often fails to prevent unpredictable and uncontrolled extension of the radiation-induced necrotic process. This is mainly due to two major causes on the first hand the difficulties to delineate extend and severity of radiation damages because of the unpredictable dynamic evolution of the lesions and on the other hand the very frequent delay in the recognition of the radiological nature of the lesions. Here we present two cases of radiation burns that occurred recently.

The first accident occurred on December 15th, 2005, in Chili, where a 27-year-old picked-up a gammagraphy source (192Ir, 3.3 TBq) with his left hand and put it in the back left pocket of his trousers, where he kept it for approximately ten minutes before the alert was given. The patient rapidly exhibited multifocal lesions to the left hand and the buttock, and at the request of Chilean authorities, the patient was hospitalized at the burn treatment center of Percy military hospital on December 27th, 2005. During this time, a physical reconstitution of the accident indicated more than 2000 Gy at the center of the buttock lesion. On the basis of the 20 Gy isodose determined by the physical dosimetry, an excision of the buttock radiation burn was made on day 21 post irradiation (PI), followed by a wound closure by a skin allograft, and in a second step by a skin autograft. However, due to a rapid lysis of the skin allograft together with an infected ulceration, a new therapeutic strategy was applied, using local mesenchymal stem cell (MSC) administration. For that purpose, bone marrow was harvested on day 75 PI, and MSC were in vitro expanded in a medium containing human platelet-derived growth factors. A second excision was then performed on day 90 PI, followed by a second skin autograft together with local injection of 168×10^6 MSC. A second local transplantation of 226×10^6 MSC was made on day 99 PI and the lesion was further dressed with artificial derma. Following MSC injections, pain disappeared and the active clinical evolution was stopped. A complete healing was observed by 75 days post treatment (5.5 months PI) without any functional impairment.

The second case of radiation burns occurred in Dakar (Senegal) during June and July 2006. Following a technical failure, an iridium source was retained in the source ejection system. The material containing the source was stored near a work place during a 2 month period. The reconstitution of the accident allowed the identification of 63 potentially irradiated victims, of which 4 patients exhibited skin lesions of various severities. One of the most severely irradiated victims was hospitalized in Percy military hospital, 27 days after the discovery of the accident. At that time, a diagnosis of an acute irradiation syndrome together with a severe radiation burn to the left arm was evidenced. Biological dosimetry gave a mean global radiation of 2.6 Gy, but with strong evidence of heterogeneous exposure. The physical reconstruction of the radiation dose was not possible, due to the difficulty of defining a clear-cut scenario. The hematopoietic syndrome was evidenced by blood Flt3-ligand concentration of 2700 pg/ml, and was treated by G-CSF and EPO injections as soon as day 31. The hematopoietic syndrome resolved by day 35. By contrast, the evolution of the skin radiation burn was

worse. After a period of dry desquamation followed by moist desquamation, ulceration appeared. A first excision was made on day 100, followed by a succession of two rotation flaps, 5 MSC administration and 2 skin allografts. The detailed evolution of the lesion will be presented. During one of the excision, a fragment of the humerus was harvested for ESR dosimetry. Results indicated that the humerus received a mean radiation dose of 40 Gy. However, more than 300 days post hospitalization the clinical evolution of the lesion was stopped and healing was observed, with some functional impairment due to the severity of the lesion. Overall, these two cases of accidental irradiation showed opposite characteristics. In the Chilean case, the radiation was localized, and the radiological nature of the accident was recognized immediately. In the Senegal case, there was a combination of a global irradiation together with a localized burn, and the radiological nature of the lesions was recognized with a one month delay. However, in these two cases, the general therapeutic strategy was the same. Necrotic lesions were excised, the wound was covered with skin allograft, and autologous MSC were locally injected around the lesion. Results were similar in the two cases, with a first immediate effect on the pain and a progressive healing of the lesions without recurrences of the necrosis process. Altogether these results strongly suggest that local administration of autologous MSC significantly improve the treatment of these severe radiation burns as compared to the historical cases. The role of MSC in this treatment is not yet clearly determined, we think they counteract the inflammatory process of the radiation injury through their local production of paracrine growth factors.

Oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) : a good candidate for myoblast transplantation

Gillian.S.Butler-Browne, S. Périé, K. Mamchaoui, E. Negroni, B. Bouazza, Y. Torrente*, V. Mouly, J.Lacau St-Guily

Inserm U787, Faculté de Médecine Pitié Salpêtrière, Paris, France

Muscles of the upper esophageal sphincter, especially the cricopharyngeal muscle (CPM), are affected by several degenerative disorders in humans, but become a specific target in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD) [1, 2]. This myopathy is a late onset autosomal dominant muscle disease, particularly frequent in the French-Canadian population due to a founder effect [3]. It is characterized by ptosis due to levator palabrae superioris dysfunction and dysphagia due to the progressive dysfunction of the pharyngeal and the CPM muscles. Swallowing disorders are determinant in the prognosis of the disease. At later stages of the disease, voluntary muscles, especially those of the proximal limbs, may be affected. The only available treatment, cricopharyngeal myotomy, may be performed to improve swallowing. This procedure consists of surgically sectioning the obstruction formed by the upper esophageal sphincter, and is successful when CPM function is the most severely disturbed parameter [4, 5, 6], but has a long term effect in only a fraction of the patients.

In order to elucidate the potential physiopathological mechanisms involved in the development of this disease and to identify a possible therapeutic strategy, we isolated satellite cells from both the affected CPM as well as from unaffected muscles of OPMD patients and age matched control subjects, and compared the effect of the expanded repeat on their behaviour. We observed defects in the proliferation of myoblasts isolated from affected CPM, which were more pronounced in the older patients. Since the defects observed in myoblasts isolated from CPM muscles were not present in cultures isolated from unaffected muscles of OPMD patients, this strongly suggests that grafts of autologous myoblasts isolated from unaffected muscles could represent a new therapeutic approach which could be used to restore contractility to the affected pharyngeal muscles. The possibilities to use autologous myoblast transplantation as a therapeutic strategy for limited targets have been well described for heart infarction [32]. A preclinical study was carried out in the dog in order to evaluate in the pharyngeal muscles the tolerance and feasibility of such autografts and a phase 1 clinical trial is ongoing with 11 patients already having received autologous myoblast transplantation. Experiments are also being currently carried out to test the possibility of using a more efficient source of stem cells and promising results have already been obtained using CD133 positive stem cells isolated from the muscle.

Présentations sélectionnées

Différenciation de cellules souches embryonnaires humaines en progéniteurs hépatiques.

Touboul Thomas¹, **Corbineau Sébastien**¹, Goulinet-Mainot Sylvie¹, Martinez Amélie¹, Helvig Blandine¹, Dubart-Kupperschmitt Anne¹, Vallier Ludovic², Weber Anne¹.

- 1)- INSERM U804 Hôpital Kremlin-Bicêtre
80, rue du Général Leclerc 94276 Le Kremlin-Bicêtre Cedex, France.
- 2)- Department of Surgery, University of Cambridge, Addenbrooke's Hospital,
Hills Road, Cambridge, CB2 2QQ, United Kingdom

Les cellules souches embryonnaires humaines (cellules hSE) sont pluripotentes et dérivent de l'embryon au stade blastocyste (5 jours post-fécondation). Leur origine embryonnaire leur confère la capacité à proliférer indéfiniment *in vitro* et à se différencier *in vivo* en tous types cellulaires. Pour ces raisons, les cellules hSE ont donc un potentiel unique pour la médecine régénérative qui nécessite la production d'une importante quantité d'hépatocytes matures afin de traiter des maladies hépatiques. Cependant la génération de cellules fonctionnelles d'une part et la définition de conditions de différenciation compatibles avec un usage clinique d'autre part constituent de véritables défis. L'approche la plus appropriée serait de reproduire *in vitro* les premières étapes du développement. Nous avons mis au point des conditions chimiquement définies permettant de spécifier des cellules hSE en cellules de l'endoderme définitif puis de les différencier en progéniteurs hépatiques (hépatoblastes).

Dans un premier temps, nous avons établi les conditions de spécification des cellules hSE en cellules endodermiques en combinant différents facteurs comprenant l'activine, le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) et la Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) et ceci dans un milieu chimiquement défini et dépourvu de sérum. La spécification des cellules a été validée par RT-PCR et immunocytochimie. Les cellules générées expriment les marqueurs mésendodermiques Sox17, Goosecoid et Mix11 et qui n'expriment pas le marqueur d'endoderme viscéral Sox7.

Les cellules endodermiques sont ensuite induites vers la voie hépatique pendant 5 jours et expriment alors les facteurs de transcription HNF1 β et HNF4 α . Une étape ultérieure de 3 à 10 jours permet d'obtenir une population de cellules qui expriment des marqueurs de progéniteurs hépatiques plus matures comme l'albumine.

Une caractérisation *in vitro* plus extensive des cellules est en cours. La population de cellules différenciées a été transplantée chez des souris NOD/SCID. Par ailleurs, nous avons mis au point des conditions qui permettent de transduire 70% de cellules hSE non différenciées par un vecteur lentiviral à MOI 10. Afin de purifier les cellules progénitrices hépatiques, nous avons transduit les hCSE avec un vecteur lentiviral exprimant la GFP sous contrôle d'un promoteur hépatique (Apolipoprotéine AII) qui s'exprime au stade des progéniteurs hépatiques. Après différenciation des cellules hSE, nous purifierons les cellules exprimant la GFP par cytométrie de flux.

Etude comparative des lignages cellulaires dans deux modèles de régénération hépatique.

Virginie Pichard, Dominique Aubert et Nicolas Ferry.

Biothérapies Hépatiques, INSERM CIC 04, EA 4274, CHU Hôtel-Dieu, 44093 Nantes Cedex

Le foie est capable de réguler sa masse et sa taille à partir de ses propres hépatocytes qui jouent le rôle de cellules souches. Cependant l'utilisation de drogues inhibant la prolifération hépatocytaire suivie d'une stimulation de régénération a permis de révéler l'existence de nouvelles populations cellulaires. Chez le rat l'administration du 2-acétylamino-fluorène (2-AAF) suivie d'une hépatectomie conduit à la prolifération hépatique de cellules « ovales ». Un autre type cellulaire les SHPCs (Small Hepatocyte-Like Progenitor Cells) est observé lors d'un traitement par la rétrovirine.

Le but de cette étude est de mieux comprendre l'origine et le devenir de ces cellules souches en réalisant une étude de lignage cellulaire par marquage génétique au cours des traitements rétrovirine ou AAF.

Le marquage génétique a été réalisé à l'aide de rétrovirus MoMuLV recombinants porteurs du gène de la β -galactosidase d'E.coli, ce qui a permis une intégration stable du transgène et son expression dans toute la descendance des cellules marquées. Les rétrovirus recombinants ont été administrés chez des rats nouveaux nés âgés de 2 jours (n=11) ou chez des rats adultes (n=19). Dans chacun des groupes une partie des animaux a reçu deux injections de rétrovirine à 15 jours d'intervalle suivies d'une hépatectomie partielle 5 semaines après la seconde injection. L'autre partie des animaux a été mise sous régime AAF (0.02% dans l'alimentation) durant 15 jours. Une semaine après la mise en route du régime, les rats ont subi une hépatectomie partielle des 2/3. Le devenir et le phénotype des cellules marquées ont été étudiés par technique immunohistochimique sur des coupes de foie réalisées sur la pièce de l'hépatectomie et au moment du sacrifice soit 9, 15 ou 30 jours après l'hépatectomie.

Chez les rats adultes nous avons pu obtenir un marquage spécifique de 5% des hépatocytes matures. Après traitement par la rétrovirine, on observe des clones régénératifs composés de SHPCs dont un certain nombre exprime la β -galactosidase. Le pourcentage de cellules β -galactosidase positives dans le foie ne varie pas durant toute la durée de l'étude, suggérant que les clones proviennent d'hépatocytes matures. Après traitement par l'AAF, nous observons quelques clones d'hépatocytes marqués et une forte prolifération de cellules ovales négatives pour la β -galactosidase. De plus, il existe une diminution statistiquement significative du pourcentage global d'hépatocytes β -galactosidase positifs suggérant que les cellules ovales ne proviennent pas des hépatocytes matures.

Chez les rats nouveaux nés le marquage est variable selon les animaux (de 0,5 à 5.2 % de cellules β -galactosidase positives). Après traitement à la rétrovirine, nous observons comme chez les rats marqués à l'âge adulte l'apparition de clones de SHPCs dont certains sont positifs pour la β -galactosidase. Là encore la proportion globale de cellules marquées dans le foie ne varie pas au cours du temps. Après traitement à l'AAF, contrairement aux animaux marqués à l'âge adulte, nous observons des cellules ovales exprimant la β -galactosidase ainsi que la présence de cellules des canaux biliaires marquées. De plus le pourcentage d'hépatocytes marqués n'est pas statistiquement différent avant et après le traitement chez ces animaux.

Cette étude de lignage in vivo confirme que dans le modèle rétrovirine, les hépatocytes sont à l'origine de la régénération hépatique. Les SHPCs ne peuvent donc pas être considérées comme un nouveau type de cellule souche hépatique. A l'inverse, dans le modèle AAF, les cellules ovales qui prolifèrent sont bien majoritairement à l'origine des hépatocytes. Enfin, lorsque les cellules ovales sont marquées nous observons des cellules des canaux biliaires exprimant la β -galactosidase, confirmant pour la première fois in vivo la capacité des cellules ovales à se différencier en hépatocytes et en cellules biliaires.

Clinical grade preparation of human natural regulatory T-cells encoding the thymidine kinase suicide gene as a safety gene

Maude Guillot-Delost, Mustapha Cheraï, Yamina Hamel, Michelle Rosenzweig, Claude Baillou, Ghislaine Simonin, Virginie Leclercq, Maria Encarnita Mariotti-Ferrandiz, Adrien Six, Véronique Bon-Durand, Sébastien Maury, Benoit L. Salomon, José L. Cohen, David Klatzmann, François M. Lemoine.

UMR CNRS 7087 & UPMC & AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié Salpêtrière, Service de Biothérapies, Paris, France.

Human CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ natural regulatory T-cells (nTreg) have a great therapeutic potential for the induction of tolerance in allo-transplanted patients or for the control of severe auto-immune diseases. However, clinical grade production of nTreg remains difficult to achieve because of the absence of a truly specific surface marker and of their low frequency that implies a need for their *ex vivo* expansion. Furthermore, safety issue should be taken into consideration due to the risk of either uncontrolled nTreg-induced immunosuppression or uncontrolled proliferation of autoreactive contaminating T-cells particularly in an auto-immune context.

We compared different clinical grade conditions for immuno-magnetic selection and *ex vivo* expansion of nTreg. For safety, expanded cells were genetically modified with retroviral vectors co-expressing human CD90 and HSV1 thymidine kinase. The CD90 surface marker and thymidine kinase allowing for selection and elimination of transduced cells by ganciclovir, respectively.

We showed that: i) nTreg could be enriched in a one-step using CD25 microbeads, were functionally suppressive and mainly FOXP3⁺; ii) using anti-CD28 and anti-CD3 coated beads, interleukin-2 and rapamycin, nTreg were expanded 150-200 folds after 3 weeks. Under these clinical grade conditions, they remained suppressive, and no major alteration of the TCR repertoire was observed; iii) After efficient retroviral transduction and CD90 selection, nTreg maintained their suppressive activity; iv) transduced nTreg could be eliminated by ganciclovir upon activation.

The efficient procedure reported here for the preparation of nTreg, whose the safety has been ensured, is now applicable for further clinical trials.

SESSION VACCINOLOGIE-IMMUNOTHERAPIE

Lundi 16 Juin 15h30-16h30

Présentation invitée

Ciblage de cellules dendritiques *in vivo*: applications vaccinales

E Tartour.

Université Paris Descartes. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort.

Based on the recognition of the central role of dendritic cells (DC) in initiating immune responses, various strategies have been devised to use DC as natural adjuvant to stimulate immunity. Most of these approaches are based on activation and maturation of DC *ex vivo* and reinfusion into patients. Some promising clinical results have been reported after therapeutic administration of DC loaded with tumor antigen. However, generation and *ex vivo* manipulation of DC are laborious and factors influencing the *in vivo* efficiency of DC are still poorly understood (choice of DC lineage, nature of maturation stimulus, schedule and route of administration...). As an alternative strategy to bypass the *ex vivo* step, various groups developed vectors (anti-DEC205, CyaA...) which directly target antigen to dendritic cells *in vivo*. We have developed the B subunit of Shiga toxin as carrier for antigen. Shiga toxin produced by *Shigella Dysenteriae* is composed of two subunits: the A subunit which mediates the toxicity of the toxin by inhibiting ribosomal RNA and the B subunit which binds to the Gb₃ glycolipid receptor. The B subunit allows the retrograde transport of the toxin to endoplasmic reticulum and then by a retrotranslocation mechanism the A subunit goes to the cytosol. We have selected the non toxic B subunit of Shiga toxin (STxB) as a vaccine vector because it is responsible for the intracellular routage of the toxin which bypasses the complete degradation of the toxin in the endosomal pathway in part by the use of the retrograde transport pathway. Previous works showed that when coupled to various antigenic peptides or proteins, STxB allows presentation of these peptides associated with MHC class I (cross-presentation) and MHC class II molecules. Administration of STxB coupled to various antigens in mice induced specific TH1 CD4⁺ and CD8⁺ T cells directed against these antigens and antibodies production to these same antigens without the addition of adjuvants. Mice vaccinated with STxB-coupled to various antigens were protected against the growth of tumors expressing these model antigens grafted in mice. In addition, immunization of mice with STxB-based vaccine combined with α GalCer was able to protect against infection with recombinant vaccinia virus expressing antigen present in the vaccine. STxB therefore appears to be a powerful, versatile and promising carrier protein for immunization. As STxB recognizes the same glycolipi Gb₃ in human and mouse DC and the distribution of this receptor is preserved between the two species, these preclinical results may be readily extrapolated to human.

Présentations sélectionnées

Measles Virus Induces Oncolysis of Mesothelioma Cells and Allows Dendritic Cells to Cross-Prime Tumor-Specific CD8 Response

GAUVRIT Anne¹, BRANDLER Samantha², SAPEDE-PEROZ Carole¹, **BOISGERAULT Nicolas**¹, TANGY Frédéric² et GREGOIRE Marc¹

¹INSERM U892, Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers, Nantes, France

²Institut Pasteur, CNRS-URA 3015, Laboratoire de Génomique Virale et Vaccination, Paris, France

Abstract :

Despite conventional medical and surgical treatments, malignant pleural mesothelioma (MPM) remains incurable. Oncovirotherapy (i.e., the use of replication-competent virus for cancer treatment) is currently explored in clinical trials. In this study, we investigated the antineoplastic potential of a new oncolytic viral agent, a live-attenuated measles virus (MV) strain derived from the Edmonston vaccine lineage (Schwarz strain). We evaluated both oncolytic activity and immunoadjuvant properties of the MV vaccine strain on mesothelioma tumor cells. Infectivity, syncytium formation, and cytolytic activity of MV were studied on a panel of mesothelioma cells derived from pleural effusions of MPM patients. We observed that MV infected preferentially MPM cell lines in comparison with nontransformed mesothelial cells, leading to an efficient killing of a significant fraction of tumor cells. A cytoréductive activity was also evidenced through formation of multinuclear cellular aggregates (syncytia). The susceptibility of MPM cell lines to measles infection was assessed by the analysis of cell surface expression of the MV vaccine receptor (CD46). We also evaluated whether MV infection of mesothelioma cells could elicit an autologous antitumor immune response. We showed that MV Schwarz strain induced apoptotic cell death of infected mesothelioma cells, which were efficiently phagocytosed by dendritic cells (DC). Loading of DCs with MV-infected MPM cells induced DC spontaneous maturation, as evidenced by the increased expression of MHC and costimulatory molecules along with the production of proinflammatory cytokines. Priming of autologous T cells by DCs loaded with MV-infected MPM cells led to a significant proliferation of tumor-specific CD8 T cells. Altogether, these data strongly support the potential of oncolytic MV as an efficient therapeutic agent for mesothelioma cancer.

Résumé :

Malgré les traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie, chirurgie), le mésothéliome pleural malin (MPM) reste un cancer incurable. L'oncovirothérapie, c'est-à-dire l'utilisation de virus réplicatifs destinés au traitement des cancers, est actuellement développée dans le cadre d'essais cliniques. Notre travail a consisté à étudier le potentiel anti-néoplastique d'un nouvel agent oncolytique, une souche atténuée du virus de la rougeole (MV) dérivée de la lignée vaccinale d'Edmonston (souche Schwarz). Nous avons évalué l'activité oncolytique et les propriétés immuno-adjuvantes de cette souche vaccinale MV sur des cellules tumorales de mésothéliome. L'efficacité d'infection, la formation de syncytia et l'activité cytolitique du virus MV ont été étudiés sur un panel de cellules de mésothéliome obtenues à partir d'effusions pleurales de patients atteints de MPM. Nous avons observé que le virus MV infectait préférentiellement les lignées cellulaires de MPM en comparaison de cellules mésothéliales non transformées, conduisant à la mort d'une fraction significative de ces cellules tumorales. Une activité cytoréductive a aussi été mise en évidence, par la formation d'agrégats cellulaires multinucléés (syncytia). La susceptibilité des lignées cellulaires de MPM à l'infection par le virus de la rougeole a pu être estimée en analysant l'expression du récepteur à la souche vaccinale de MV (CD46) à la surface des cellules. Nous avons ensuite déterminé si l'infection de cellules de mésothéliome par le virus MV pouvait induire une réponse immunitaire anti-tumorale autologue. Nous montrons que la souche virale MV Schwarz provoque la mort par apoptose des cellules de mésothéliome infectées qui sont ensuite efficacement phagocytées par des cellules dendritiques (DC). Le chargement des DC avec des cellules de MPM infectées induit une maturation spontanée de ces DC, comme le montre l'augmentation de l'expression des molécules de CMH et de co-stimulation, ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, la stimulation de lymphocytes T autologues par les DC chargées aboutit à une prolifération significative de lymphocytes T CD8 tumeur-spécifiques. L'ensemble de ces résultats confirme le fort potentiel du virus oncolytique MV comme agent thérapeutique efficace dans le cadre du traitement du mésothéliome.

Randomized phase IIb trial evaluating the therapeutic vaccine TG4010 (MVA-MUC1-IL2) as an adjunct to chemotherapy in patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC).

Virginie Westeel¹, Alain Rivière², Anne Madroszyk³, Jean-Luc Breton⁴, Denis Braun⁵, Didier Debieuvre⁶, Hervé Léna⁷, Eric Dansin⁸, **Jean-Marc Limacher**⁹, Elisabeth Quoix¹⁰.

CHU, Besançon¹, Centre François Baclesse, Caen², Institut Paoli Calmettes, Marseille³, CH intercommunal, Belfort⁴, CH François Maillot Briey⁵, CH Paul Morel, Vesoul⁶, CHU de Rennes⁷, Centre Oscar Lambret, Lille⁸, Transgene SA, Strasbourg⁹, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg¹⁰.

Background: TG4010 is a recombinant Modified Virus Ankara (MVA) expressing both IL2 and the tumor-associated antigen MUC1.

Methods: This was a randomized, controlled, open label and multicenter study. Eligibility criteria were: histologically documented and untreated stage IIIB “wet”/IV NSCLC, MUC1 positive tumor, ECOG PS 0-1. Patients were randomized to receive: Cisplatin 75mg/m² on d1 and Gemcitabine 1250mg/m² on d1 and d8 every 3 weeks for up to 6 cycles, with TG4010 which was continued until progression (Arm 1), or without TG4010 (Arm 2). Tumors were evaluated every 6 weeks (WHO criteria). Primary endpoint was progression-free survival (PFS) at 6 months; secondary endpoints were overall survival, response rate, safety, quality of life and immune response.

Results: 148 patients were randomized. Demographics and characteristics of the disease did not differ between study arms. Efficacy results are provided as an intent to treat analysis after central reading. PFS at 6 months is 44.6% (33/74; 95% CI 0.33-0.57) in Arm 1 and 35% (26/74; 95% CI 0.24-0.47) in Arm 2. Objective response rate is 43% (32/74; 95% CI 0.32-0.55) in Arm 1 and 27% (20/74; 95% CI 0.17-0.39) in Arm 2 (p=0.03). Most adverse events (AEs) were considered related to chemotherapy or to underlying disease. Hematologic toxicity was equivalent in both arms. Most frequent AEs related to TG4010 were injection site reactions and asthenia. Preliminary analyses indicate that both MUC1-specific and non-specific immune parameters are associated with clinical activity of TG4010. Overall survival data will be presented at the time of the meeting.

Conclusions: This controlled phase IIb trial evaluating TG4010 in association with first-line chemotherapy in advanced NSCLC patients reached its primary endpoint and showed a significant advantage in terms of response rate for the combination of chemotherapy and TG4010. These promising results warrant further evaluation in phase III.

Les réponses immunitaires contre le vecteur recombinant AAV2/1 chez la souris.

Muriel SUDRES, David-Alexandre GROSS, Christine LEBEC, Anne DOUAR, Anne GALY
INSERM U790, Immunologie et Thérapie Génique et R&D ; GENETHON, Evry

L'immunogénicité des vecteurs AAV recombinants (AAVr) a clairement été démontrée lors de récentes études cliniques de transfert de gènes. Une large proportion de patients traités avec ces vecteurs développent des anticorps neutralisants contre le vecteur et certains montrent la présence de lymphocytes T cytolytiques (CTL) anti-capside. Une meilleure compréhension de l'immunogénicité de l'AAVr est donc essentielle pour le développement clinique de ce type de produit biothérapeutique.

L'AAVr de sérotype 1 représente un outil prometteur de thérapie génique pour le traitement de dystrophies musculaires en raison de son tropisme pour le muscle squelettique. Nous cherchons donc à caractériser et à évaluer les réponses immunitaires innées et/ou adaptatives induites après son administration systémique chez la souris.

Nous montrons qu'une injection unique d'AAVr2/1 ne déclenche pas de réponses cytokiniques pro-inflammatoires immédiates dans le foie en comparaison à des préparations virales contenant du LPS ou à des vecteurs adénoviraux qui induisent eux l'expression rapide de TNF α , IL-6, CCL5, CXCL10.

Malgré cela l'administration intraveineuse de 10^{10} , 10^{11} ou 10^{12} génomes viraux (vg) d'AAVr2/1 LPS-free entraîne une forte réponse humorale caractérisée par un pic IgM suivi par la génération d'IgG, respectivement à une semaine et trois semaines après injection. Le profil isotypique montre une réponse prédominante IgG2a, IgG2b et IgG3, suggérant une production d'IFN γ ou de TGF β lors de cette réponse immune. Les anticorps générés sont neutralisant, empêchant la réadministration d'un vecteur de même sérotype. Nous confirmons par western blot que les sera des souris immunisées reconnaissent les protéines VP de la capsid de l'AAVr. Nous poursuivons nos études sur les mécanismes conduisant à la commutation de classe des Ig en utilisant des souris mutantes pour certaines voies de signalisation notamment cytokiniques ou TLR.

Pour étudier l'implication des CTL spécifiques de la capsid dans la réponse immune, nous avons conçu une capsid chimérique ; par génie génétique nous avons inséré des épitopes du CMH de classe I et de classe II d'un antigène connu dans la séquence de la capsid. Cette capsid chimérique nous permettra de suivre les réponses cellulaires T CD4 et CD8 spécifiques de l'épitope cognitif. Ces études en cours devraient contribuer à une meilleure compréhension des réponses immunitaires humorales et cellulaires induites par l'AAVr.

SESSION MALADIES GENETIQUES ET MALADIES DEGENERATIVES

Mardi 17 Juin 8h30-10h45

Présentations invitées

Lentiviral gene transfer :towards the clinic

J. Mallet

Laboratoire de génétique moléculaire de la neurotransmission et des processus-neurodégénératifs, UMR 7091 CNRS - Université Pierre et Marie Curie Paris 6, 83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France,

**J Mallet, phone: 33 1 42 17 75 30, fax: 33 1 42 17 75 33,
e-mail: mallet@infobiogen**

Lentiviral vectors are among the most efficient gene transfer tools for dividing and nondividing cells. However, insertional mutagenesis has been observed in clinical trials with oncoretroviral vectors, which has prompted detailed studies on the genotoxicity of integrating vectors. For many applications, the most straightforward approach to overcoming this problem is to abrogate the integration of the vector, a strategy which, in the case of lentiviral vectors, has been facilitated by the extensive studies of the integrating mechanisms of lentiviruses. Recent work pertaining to this approach will be discussed, together with various applications of the emerging non-integrative lentiviral vectors.

Another crucial concern in human gene therapy is the tight regulation of transgenes by the administration of small inducer molecules. The prototypic Tet system has proven quite efficacious in numerous instances but his use in the clinical setting is prevented by the very nature of his protein constituents which is of eukaryotic and viral origin, and will most likely trigger a deleterious immune response. A particularly efficient tool is provided by the rapamycin system that takes advantage of protein components of human origin, in order to minimize immune reactions in man. Control may be achieved by simultaneously interfering with the biosynthesis of the therapeutic factor at the level of its expression as well as, when appropriate, at the level of secretion. Both systems are induced by non-immunosuppressive derivatives of rapamycin (“rapalogues”). The regulation systems were integrated into two lentiviral vectors, and the resulting set of vectors was used to produce the neurothrophic factor GDNF. The basis of this system will be discussed together with its potential applications in gene therapy of neurogenerative disorders.

Présentations sélectionnées

Surexpression de la cholestérol-24-hydroxylase dans la maladie d'Alzheimer:

Une nouvelle perspective thérapeutique

Eloïse Hudry, Debby Van Dam, Wim Kulik, Peter Paul De Deyn, Femke S. Stet, Ornella Ahouansou, Abdellatif Benraiss, André Delacourte, Pierre Bougnères, Patrick Aubourg, Nathalie Cartier-Lacave

Maladie d'Alzheimer et métabolisme du cholestérol : des liens étroits

La **maladie d'Alzheimer** se caractérise histologiquement par le dépôt extracellulaire de plaques amyloïdes constituées d'agrégats de peptides Amyloïdes- β ($A\beta$) issus du clivage de la protéine transmembranaire APP (Amyloid Precursor Protein) par les β - et γ -secrétases.

Les rares cas génétiques mis à part, plusieurs facteurs de risque ont été associés au développement de la forme sporadique de la pathologie. Parmi ceux-ci, de nombreuses études ont mis en évidence des **connexions étroites entre la maladie d'Alzheimer et le métabolisme lipidique**, la surcharge en cholestérol favorisant la production des peptides amyloïdes pathogènes.

Dans le cerveau, la quasi totalité du cholestérol cérébral est synthétisé *in situ*, la barrière hémato-cérébrale ne permettant qu'un apport minime de cholestérol périphérique. L'excès de cholestérol non recyclé est exporté dans la circulation sanguine sous forme de 24S-hydroxycholestérol (24-OHC), métabolite produit dans les neurones par la cholestérol 24S- hydroxylase (CYP46).

Afin de préciser les connexions entre le métabolisme lipidique intracérébral et la maladie d'Alzheimer, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* les conséquences de la modulation de l'activité de la cholestérol-24-hydroxylase (CYP46) sur la surcharge amyloïde et les manifestations caractéristiques de la pathologie.

La surexpression de CYP46 est associée à une diminution de la production des peptides $A\beta$ et à une amélioration des performances cognitives des souris APP23

Grâce à l'injection stéréotaxique intracérébrale de vecteurs AAV5 codant pour le gène CYP46A1, nous avons pu montrer que la surexpression de la cholestérol-24-hydroxylase est associée à un effet bénéfique majeur chez les souris modèles de la pathologie (APP23). Neuf mois après injection, une diminution de la quantité des peptides amyloïdes et des dépôts amyloïdes est observée, ceci étant corrélé à une diminution importante de la réaction inflammatoire. De plus, l'injection de vecteur AAV5-CYP46 est associée à une amélioration des performances cognitives, suggérant un bénéfice clinique liée à la surexpression de la cholestérol-24-hydroxylase.

Nos résultats suggèrent le potentiel thérapeutique d'une nouvelle cible dans la maladie d'Alzheimer : la cholestérol-24-hydroxylase.

A New Approach Of Gene Therapy In A Murine Ischemic Hindlimb Model

Rayssac, A¹, Neveu, C^{1,2}, Pucelle, M¹, Lourenço-Dias, L, Van den Berghe, L¹, Chaufour X^{1,2} and Prats, AC¹

¹. INSERM U858, Institut de médecine moléculaire de Rangueil, Toulouse, France

². Service de Chirurgie Vasculaire, centre hospitalier universitaire Purpan, Toulouse, France

Introduction: despite advances in the treatment of peripheral artery disease, many patients cannot be managed adequately with conventional therapies. Therefore, there is a compelling need to develop a novel therapy that enhance collateral vessel development and prevent limb loss in these patients. Gene therapy is a promising strategy, it can direct the expression of angiogenic factors to the site of intended angiogenesis and ensure the sustained expression of these agents.

In our laboratory, we are developing multicistronic IRES (Internal Ribosome Entry Site) containing vectors to perform co-expression of several angiogenic factors as FGF-2 (Fibroblast Growth Factor) and Cyr 61. Therefore, these factors could synergistically enhance the collateral vessel growth and tissue perfusion in a murine model of hindlimb ischemia.

Methods: unilateral femoral artery ligation/excision was performed in hypercholesterolemic (ApoE knock-out) mice followed by plasmid electroporation in the tibialis muscle. We tested monocistronic vectors expressing FGF-2 or Cyr 61 and the bicistronic vectors expressing both FGF-2 and Cyr 61. Blood flow recovery has been monitored by Laser Döppler. We evaluated capillary density and mature vessel formation by immunohistochemistry and the collateral vascularization formation by arteriography.

The expression of FGF-2 and Cyr 61 in the tibialis muscle was estimated by Western-blot and immunohistochemistry.

Results: we report an increase of regional blood flow recovery in FGF-2 overexpressing mice ($p < 0.01$) on day 14. As well, we obtained the same recovery with the bicistronic vector, although a lower expression of each factor compared to the expression of FGF-2 in the monocistronic vector. We are now currently validating the arteriography and immunohistochemistry.

Conclusions: the co-expression of angiogenic factors, at a lower dose, avoids flooding the animal of therapeutic agents, which usually leads to side effects, or even worse, pathologies (tumors, retinopathies...). Moreover, moderate and complementary administration of different factors is likely to be more efficient than a massive expression of only one agent regarding to the vessel maturation.

Lentiviral Vectors Mediate “Rapalogue“-Induced Production of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) in the Brain: Regulation at the Level of Transcription and Secretion.

Roland Vogel, Hamid Mammeri, and Jacques Mallet

Laboratoire de Génétique Moléculaire de la Neurotransmission et des Processus Neurodégénératifs (LGN), CNRS-UMR 7091, Paris, France

Gene transfer may become a powerful clinical tool for the therapeutic delivery of neurotrophic factors, provided that the *in situ* production of these peptides can be tightly regulated by the administration of a small inducer molecule. A particularly efficient control may be achieved by simultaneously using two regulation systems that interfere with the biosynthesis of the therapeutic factor at two different levels. Therefore, we have used, in the context of lentiviral vectors, two regulation systems which allow control of expression and secretion of therapeutic polypeptides, respectively. Both systems are induced by non-immunosuppressive derivatives of rapamycin (“rapalogues“) and take advantage of protein components of human origin, in order to minimize immune reactions in man. The regulation systems were integrated into two lentiviral vectors, and the resulting set of vectors was used to produce GFP and GDNF. GFP served as a “model factor“, and was employed to demonstrate expression and entry into the exocytotic pathway in transduced cells. The constructs allowed robust *in vitro* expression and secretion of the polypeptides in the presence of the “rapalogue“ AP 21967. Withdrawal of the inducer resulted in efficient down regulation. *In vivo*, tightly regulated production of GFP and GDNF was observed after injection of the vectors into the striata of mice. The vectors may thus be useful for many applications in gene therapy, including the treatment of Parkinson’s disease by a neuroprotective approach.

Thérapie génique de l'hémophilie B : nouvelle approche dans un modèle de souris invalidées pour le gène du Facteur IX

J Cossonnière*, M Cambot*, C Lavenu-Bombled*, B Izac[#], E Souil[#], JM Massé[#], A Schmitt[#], JP Rosa[§], A Dubart-Kupperschmitt*

* Inserm U 804 Université Paris XI, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre ; [#] Inserm U 567 Université Paris V, Institut Cochin, Paris ; [§] Inserm U770, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre

Les essais cliniques de thérapie génique de l'hémophilie B, tous basés sur la sécrétion permanente du facteur IX thérapeutique (FIX), sont pour l'instant peu satisfaisants en raison des taux faibles et transitoires de FIX circulant obtenus. Notre approche est basée sur la sécrétion régulée dans le temps et dans l'espace, en réponse à un stress hémorragique, du FIX stocké dans les granules α des plaquettes. La stratégie consiste à greffer des cellules souches hématopoïétiques (CSH) transduites avec un lentivecteur intégratif (LV) exprimant, sous le contrôle d'un promoteur spécifique de la lignée mégacaryocytaire (MK), la séquence codant le FIX fusionné à un peptide d'adressage aux granules α . La validation de l'efficacité thérapeutique de cette stratégie sera réalisée dans le modèle de souris hémophiles obtenu par invalidation du gène du FIX.

Dans un premier temps nous avons vérifié la faisabilité de notre stratégie chez des souris normales, et validé, dans le modèle murin, les différents éléments de notre LV thérapeutique.

Nous avons greffé, à des souris congéniques, des CSH transduites par le LV codant la GFP sous le contrôle d'un fragment du promoteur du gène humain de la glycoprotéine $Ib\alpha$ (*hGpIb α*). Nous montrons grâce à des analyses en cytométrie de flux et en immunohistochimie, que le promoteur humain *hGpIb α* restreint strictement l'expression de la GFP aux MK matures et aux plaquettes circulantes.

Nous avons étudié l'adressage du FIX aux granules α de MK murins différenciés *in vitro* à partir de CSH de foies fœtaux transduites avec un LV codant le FIX fusionné à différents signaux d'adressage. En immuno-microscopie électronique avec un anticorps anti-FIX couplé à des billes d'or, nous montrons que la fusion en COOH du seul térapeptide LKNG dérivé du PF4 permet l'adressage du FIX aux granules α .

Nous montrons ainsi dans les cellules murines, comme nous l'avions déjà montré dans les cellules humaines, que les éléments de notre vecteur thérapeutique (promoteur *hGpIb α* et fusion FIX LKNG) permettent de restreindre l'expression du transgène aux MK matures et aux plaquettes, et d'adresser le FIX aux granules α . Nous pouvons maintenant vérifier l'efficacité thérapeutique de notre approche par des tests *in vivo* sur les souris hémophiles greffées avec des CSH transduites avec le LV thérapeutique. Après reconstitution hématologique, nous vérifierons par des tests de temps de saignement, la correction du défaut de coagulation.

SESSION CANCER, MALADIES INFECTIEUSES

Mardi 17 Juin 11h15-12h45

Présentations invitées

Gene and cell therapy of metastatic tumors by tumor-targeted myeloid cells expressing interferon-alpha

Michele De Palma

(Milan, Italie)

Myeloid-lineage cells that infiltrate tumors are more likely to promote tumor growth than to mount effective anti-tumor responses. We studied the contribution of bone marrow-derived cells to transplanted and endogenous tumor models, and evaluated the recruitment and functional importance of hematopoietic cells and endothelial progenitors in the process of tumor angiogenesis. By using transcriptionally targeted lentiviral vectors and conditional cell elimination strategies, we demonstrated that bone marrow-derived myeloid cells, but not endothelial progenitors, play important roles during tumor vascularization. In particular, we showed that tumor angiogenesis and growth are dependent on a small subset of circulating and tumor-homing monocytes, which express the angiopoietin receptor Tie2 (Tie2-expressing monocytes, TEMs). Given their tumor-specificity, we speculated that TEMs could be used as gene delivery vehicles for the selective transport of gene therapy to tumors. By transplanting hematopoietic stem cells transduced by lentiviral vectors with TEM-restricted expression, we targeted interferon-alpha delivery to tumors and achieved substantial anti-tumor activity in mouse tumor models, including orthotopic, spontaneous and metastatic tumor models. In a spontaneous breast carcinoma model (MMTV-PyMT), we achieved significant inhibition of the mammary tumor burden in early (incipient tumors) and late (established tumors) intervention trials. The treated tumors were massively infiltrated by activated T cells and macrophages, suggesting the occurrence of an immune cell-mediated anti-tumor response. Remarkably, early intervention trials achieved near-complete suppression of metastatic outgrowth in the lungs. Importantly, TEM-mediated IFN- α delivery did not impair hematopoiesis or wound healing detectably in the mice. Conversely, expression of IFN- α broadly in hematopoietic cells or in the plasma were highly toxic and, paradoxically, poorly effective. These results illustrate the therapeutic potential of gene- and cell-based IFN- α delivery, and should allow developing IFN-based treatments that more effectively treat cancer. In the future, engrafting hematopoietic progenitors engineered to express IFN- α specifically in the TEM progeny might be coupled to autologous bone marrow transplantation in cancer patients receiving high-dose chemotherapy.

Présentations sélectionnées

Traitement du mélanome métastatique par électrotransfert du plasmide p-AMEP™, codant pour le peptide anti-angiogénique et anti-métastatique AMEP™.

Bouquet C^{1,2}, Trochon-Joseph V^{1,3}, Ransy C², Thomaidis A³, Soria C³, Lu H³, Mir LM², Perricaudet M², Lebel-Binay S¹

¹ BioAlliance Pharma, 49 Bld du Général Martial Valin 75015 Paris

² UMR 8121 CNRS, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins 94805 Villejuif Cedex

³ INSERM U553, Hôpital Saint Louis, 1 av. Vellefaux 75010 Paris

Les intégrines $\alpha v\beta 3$ and $\alpha 5\beta 1$ sont des cibles de choix dans le traitement des cancers invasifs car elles sont surexprimées par les cellules endothéliales activées et les cellules de mélanome métastatique. Nous avons cloné le domaine disintégrine de l'ADAM-15, appelé AMEP™ (Antiangiogenic Metargidin Peptide). Nous avons montré que ce domaine produit sous forme de protéine recombinante AMEP™ inhibe *in vitro* la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules endothéliales¹. Des résultats encourageants ont été précédemment obtenus *in vivo* avec le plasmide inducible pBi-AMEP¹. Dans cette étude, nous avons évalué l'activité biologique de l'AMEP *in vitro* sur les cellules de mélanome, et l'effet anti-tumoral *in vivo* d'un plasmide spécialement conçu pour un développement clinique dans le mélanome métastatique.

Matériels et méthodes

L'AMEP recombinante a été produite à partir du vecteur pET32a+ chez *E. coli*. Le plasmide p-AMEP™ (2.5kb) code pour l'AMEP humaine sous le contrôle du signal de sécrétion de l'urokinase humaine, et du promoteur eucaryote CMV-intronA. Ce plasmide est dépourvu de gène de résistance aux antibiotiques.

In vitro, la prolifération cellulaire a été évaluée par mesure de la [³H]thymidine ou de la transformation du MTT ; l'invasion cellulaire a été étudiée en chambres de Boyden. Pour les études *in vivo*, le mélanome murin B16F10 a été implanté en sous-cutané sur des souris C57Bl/6 syngéniques. Quand les tumeurs atteignent un volume de 30-50mm³ (jour J0), elles ont été injectées avec 50µL de plasmide, suivi par un électrotransfert.

Résultats

Nous avons dans un premier temps montré que l'AMEP™ recombinante à la dose de 15µg/mL inhibe la prolifération de cellules de mélanome murin B16F10, humains C9 et 451Lu à 69%, 83% et 96% respectivement. De plus, l'AMEP™ inhibe à 71% l'invasion en Matrigel pour les B16F10 et à 66% pour les C9. D'autre part, la transfection de ces cellules de mélanomes par le plasmide p-AMEP™ (0.5 à 2.0 µg) induit une inhibition dose-dépendante de leur prolifération, allant jusqu'à un maximum d'inhibition de 97%.

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'AMEP™ *in vivo* sur la croissance de tumeurs sous-cutanées B16F10. Tout d'abord, nous avons identifié la dose thérapeutique optimale, en administrant des doses croissantes (25 à 400µg) de p-AMEP™. La croissance des tumeurs B16F10 a ainsi été fortement inhibée de façon dose-dépendante, avec un maximum de 80% d'inhibition à J7 à la dose de 200µg. Le suivi des tumeurs par échographie-Doppler a permis de mettre en évidence un blocage significatif de l'angiogénèse avec plus de 70% de réduction du nombre de vaisseaux intratumoraux à J7, le nombre de vaisseaux présents à J0 n'ayant pas évolué. Une administration répétée de 200µg de plasmide à J0 et J7 a été évaluée. Une forte inhibition de 97% de la croissance tumorale a ainsi été obtenue à J14, et a induit 40% de régressions tumorales complètes observées au moins jusqu'à J80.

Conclusion

Nous avons ainsi démontré que l'électrotransfert intratumoral du plasmide p-AMEP™ inhibe la croissance et la vascularisation des tumeurs de mélanome, et induit des régressions tumorales complètes et durables. Ces résultats très prometteurs nous permettent de développer ce plasmide pour le traitement des mélanomes métastatiques et d'envisager prochainement un essai clinique.

1. Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir LM, et al. Cancer Res 64:2062-69 (2004).

SMAD4, a cellular determinant for the permissiveness of pancreatic carcinomas to parvovirus-induced oncolysis

S. DEMPE, J. ROMMELAERE, and C. DINSART

Division of Tumor Virology, DKFZ F010 and INSERM U701, Heidelberg, Germany

Pancreatic ductal adenocarcinomas (PDAC) represent the eighth frequent solid tumor and fourth leading cause of cancer death. Since current treatments against PDAC are still unsatisfactory, new anti-cancer strategies are required, including oncolytic viruses. Our approach is based on the oncolytic, oncotropic, and oncosuppressive properties of the autonomous parvoviruses (PV) H1PV and MVM. Several human PDAC cell lines were tested *in vitro* for their ability to sustain the H1PV life cycle. Some cell lines were shown to be highly susceptible to H1PV infection, whereas others were more resistant. A correlation between the integrity of the transcription factor SMAD4, often mutated in PDAC, and H1PV permissiveness was particularly striking. Indeed, mutation of SMAD4 was linked to reduced promoter P4 activity and, consequently, to considerably lower accumulation of the pivotal viral NS proteins. Sequence analysis of H1PV and MVMp P4 promoters revealed the presence of Smad binding elements, bound *in vitro* by SMAD2, -3 and -4, as identified by transcription factor finder isolation. Inhibition of SMAD2/3 phosphorylation by the specific inhibitor SB-431542, and inhibition of endogenous SMAD4 function by a dominant-negative mutant in permissive Panc-1 and MiaPaCa-2 cells demonstrated the involvement of Smad proteins in the parvoviral P4 promoter activity. Accordingly, over-expressed SMAD4 increased P4 promoter activity 2- to 3-fold in resistant, Smad4-deficient cell lines AsPC-1 and Capan-1. Altogether, SMAD4 may represent a key molecular determinant of the permissiveness of PDAC to H1PV and, consequently, guide the identification of PDAC that could be efficiently treated with this virus.

Therapeutic efficacy of soluble Receptor Activator of NF-kappaB delivered by non viral gene transfer in a mouse model of osteolytic osteosarcoma.

¹Lamoureux F, ¹Picarda G, ¹Rousseau J, ²Gourden C, ¹Battaglia S, ¹Charrier C, ¹Trichet V., ³Pitard B, ¹Gouin F, ¹Heymann D, ¹Rédini F

¹INSERM ERI 7-EA 3822, Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035 France, ²In-Cell-Art, 1 place Alexis Ricordeau, Nantes, F-44093 France ; ³INSERM, U533, Nantes, F-44035 France

Osteosarcoma is the most frequent primary bone tumor that develops mainly in the young, the median age of diagnosis being 18 years. Despite improvement in osteosarcoma treatment, survival rate is only 30% at 5 years for patients with pulmonary metastases at diagnosis. This warrants exploration of new therapeutic options and among them the anti-bone resorption molecule Receptor Activator of NF-kB (RANK), a naturally occurring protein is very promising in blocking the vicious cycle between bone resorption and tumor proliferation that takes place during tumor development in bone site.

The cDNA encoding murine RANK-Fc was administered by gene transfer using an amphiphilic polymer in the osteolytic POS-1 mouse model of osteosarcoma. Mice were treated with 100 microgr of the DNA/synthetic vector complex once a week, beginning 7 days before tumor implantation, and during 4 weeks of tumor development.

RANK-Fc gene transfer was effective in preventing the formation of osteolytic lesions associated with osteosarcoma development, in reducing the tumor incidence and the local tumor growth, in decreasing lung metastases dissemination leading to a 3.9-fold augmentation of mice survival 28 days post-implantation. On the contrary, RANK-Fc did not prevent the development of pulmonary metastasis alone, suggesting that bone environment is necessary for RANK-Fc therapeutic efficacy. As RANK-Fc has no direct activity on osteosarcoma cells *in vitro* as assessed for cell proliferation, apoptosis or cell cycle distribution, we demonstrate that RANK-Fc exerts indirect inhibitory effect on tumor progression through inhibition of bone resorption.

RESUMES DES POSTERS*

* numérotation des posters par ordre alphabétique du premier auteur

Poster N°1

Evaluation de polymères tri-blocs pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique

Deborah Alimi, Christian Leborgne, Daniel Scherman, Antoine Kichler*
Généthon-CNRS FRE3087, 1 rue de l'Internationale, BP60, F-91002 Evry, France
* e-mail : akich@genethon.fr

Résumé :

La thérapie génique consiste à délivrer des acides nucléiques dans des cellules afin d'obtenir un effet thérapeutique. Les techniques de vectorisation d'ADN qui ont été développées au cours de ces 2 dernières décennies peuvent être divisées en deux grandes catégories, à savoir les vecteurs viraux et les approches non virales. Parmi les stratégies non virales, on peut distinguer celles basées sur des techniques physiques (électroporation, biolistique, injection sous pression...), celles utilisant des molécules non chargées, et celles qui sont les plus utilisées, à savoir les approches utilisant des composés cationiques. La nature de ces derniers peut être lipidique, polymérique ou encore peptidique. Récemment, il a été montré que des copolymères amphiphiles non chargés, constitués de motifs oxyde de polyéthylène (POE) et oxyde de polypropylène (PPO), sont capables d'améliorer l'efficacité de transfection dans le muscle. Il existe une large variété de copolymères tri-blocs POE-PPO-POE (encore appelés Poloxamères, Pluronic ou Synperonic) qui sont commercialement disponibles. Afin de mieux comprendre quelles propriétés sont requises pour avoir un transfert de gènes efficace, nous avons décidé de faire une étude structure-activité. Pour cela, nous avons testé l'activité *in vivo* de 6 copolymères qui diffèrent par leur poids moléculaire et/ou par leur équilibre hydrophile/hydrophobe. En employant la luciférase comme gène rapporteur, nous avons montré que tous les poloxamères testés augmentent l'expression au niveau musculaire de manière significative comparé à l'injection d'ADN nu. Ceci montre qu'il n'existe pas un composé unique POE-PPO-POE pour améliorer le transfert de gène dans le muscle mais qu'il existe, en fait, une grande flexibilité en termes de poids moléculaire et de rapport hydrophile/hydrophobe. En parallèle, des études ont été menées *in vitro* afin d'une part, d'évaluer la cytotoxicité de ces produits, et d'autre part de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules. Nos résultats indiquent que ces polymères sont peu toxiques et qu'ils n'améliorent pas le transfert de gènes en perméabilisant la membrane des cellules musculaires.

Poster N°2

Génération d'hybrides entre cellules dendritiques et tumorales via une lignée fusogène

Blangenois Isabelle, Cheong siew Chiat, Franssen Jean Denis, Velu Thierry, Yourassowsky Catherine, Dubois Frank et Brandenburger Annick

Il a été proposé de générer des hybrides entre cellules dendritiques et cellules tumorales pour la vaccination anti-tumorale afin de combiner l'expression du répertoire complet d'antigènes tumoraux avec une présentation antigénique efficace. Une approche utilise le potentiel fusogène de certaines glycoprotéines de membrane virales (FMG). Dans cette approche, un des partenaires de la fusion est transduit avec la FMG. Il avait été démontré que cette glycoprotéine permet la fusion de cellules voisines générant des syncytia de cellules tumorales (Bateman et al, Cancer Res. (2000) 60 :1492-7) ou des hybrides entre cellules dendritiques et tumorales (Phan et al, Nature Medicine (2003) 9 : 1215-19). Cependant l'étape de transduction peut être limitante pour certaines lignées cellulaires. C'est pourquoi nous avons établi une lignée cellulaire exprimant de façon stable la FMG de GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus). Cette lignée, dérivée des cellules CHO, n'est pas susceptible elle-même à la fusion mais permet la formation de syncytia entre cellules dendritiques et tumorales générant ainsi des « hybrides tri-parentaux » (Cheong et al, Journal of Gene Med (2006) 8 : 919-28). Cette lignée fusogène permet d'obtenir des taux de fusion comparables à l'électrofusion, mais n'est pas associée à la létalité des cellules mises en présence comme c'est le cas avec cette dernière méthode. Nous générons actuellement de tels hybrides entre cellules humaines afin de tester leur potentiel immunogène *in vitro*, et entre cellules de rat afin de tester leur potentiel immunogène *in vivo* sur des tumeurs pré-établies.

Poster N°3

Optimisation de la production de vecteurs lentiviraux défectifs pour l'intégration et de l'expression de son transgène

BONI Sébastien, NGUYEN Tuan Huy, FERRY Nicolas.

Biothérapies Hépatiques, Inserm CIC 004, EE 4274, CHU Hôtel Dieu, Nantes.

Les vecteurs lentiviraux sont des outils de transfert de gènes très efficaces, car ils sont en mesure de transduire une grande variété de type cellulaire dans un état mitotiquement quiescent ou non. Le génome du vecteur s'intègre préférentiellement dans les régions transcriptionnellement actives de la cellule transduite. Cette intégration est un pré requis pour une expression stable et efficace du transgène dans des cellules se divisant. Cependant, elle peut néanmoins se révéler problématique lorsqu'elle perturbe l'expression d'un gène cellulaire et pose potentiellement un risque de mutagenèse insertionnelle. L'emploi de vecteurs lentiviraux défectueux dans le mécanisme d'intégration permettrait de pallier à ce problème et d'augmenter la biosécurité des vecteurs lentiviraux.

Le principe des vecteurs lentiviraux défectueux pour l'intégration (LV-DI) est d'exploiter la formation naturelle, durant le cycle infectieux des rétrovirus, d'ADN viral circulaire épisomique en plus de la forme d'ADN viral intégrée. Après l'étape de transcription inverse se déroulant dans le cytoplasme, l'ADN viral linéaire entre dans le noyau où il est soit intégré dans le génome cellulaire, soit circularisé sous forme épisomique à 1 ou 2 LTR. En l'absence d'une intégrase fonctionnelle, le génome des lentivirus est incapable de s'intégrer et reste sous ces formes épisomiques dans le noyau. Celles-ci sont transcriptionnellement actives, mais leur quantité décroît au cours du temps dans les cellules en division. Dans les cellules ne se divisant pas, on observe une expression stable comme il a été récemment montré *in vivo* dans la rétine et le muscle (Yanez-Munoz et al., 2006 ; Apolonia et al., 2007). Cependant, comparé à leurs homologues intégratifs, les vecteurs LV-DI sont produits (1) moins efficacement et (2) moins bien exprimés. Dans ce contexte, notre objectif est de pallier ces deux problématiques en modifiant (1) leur mode de production, (2) le type de vecteur et le promoteur.

La production des vecteurs non intégratifs repose sur la transfection transitoire d'un plasmide vecteur, d'un plasmide d'encapsidation exprimant une protéine intégrase déficiente pour l'intégration (p8.74 Δ intD64V codant l'intégrase avec la mutation D64V et les protéines gag-pol, Tat et Rev), et d'un plasmide d'enveloppe codant la VSV-G (pMD2G codant la protéine G du VSV sous le contrôle du promoteur CMV humain). Une analyse en cytométrie de flux permet ensuite de déterminer les titres viraux et le niveau d'expression du transgène. Les cellules cibles ont été les cellules HeLa et de carcinome hépatocellulaire HuH7.

En utilisant la méthode standard de production, nous avons observé une production faible pour différents vecteurs LV-DI avec une diminution du titre d'un facteur 10 à 200 comparé à leur homologue intégratif. En revanche, si on double la quantité du vecteur plasmide lors de la transfection, le titre peut être augmenté d'un facteur 10. Ainsi dans le cas des vecteurs LV-DI mTTR-GFP et LV-DI CAG-GFP codant la GFP respectivement sous le contrôle du promoteur hépato-spécifique mTTR (promoteur de la transthyréline de souris couplé à des enhancer synthétiques foies spécifiques), et le promoteur CAG (promoteur hybride composé de la séquence activatrice du promoteur précoce du cytomégalovirus (CMV) humain associé à la séquence du promoteur de la chaîne actine β du poulet avec l'intron), les titres sont sensiblement similaires à ceux obtenus avec leur homologue intégratif. Enfin, la modification de la position de la séquence cPPT n'a pas augmenté le titre.

Nous sommes actuellement en train d'évaluer l'activité de différents promoteurs afin d'obtenir une expression forte du transgène GFP : le promoteur humain de la phosphoglycérate kinase (PGK), le promoteur A2UCOE un promoteur sans enhancer décrit comme un promoteur dont l'expression est plus forte que le promoteur CMV, le promoteur CAG, le promoteur CMV et le promoteur mTTR, en mesurant l'intensité moyenne de fluorescence de la GFP. Les premiers résultats montrent une forte diminution de l'expression du transgène dans un contexte de vecteur LV-DI comparé à son homologue intégratif, dans le cas de tous les promoteurs.

En conclusion, nos résultats montrent qu'il est possible d'augmenter significativement le titre des vecteurs LV-DI, en modifiant les conditions de transfection. Une optimisation de la cassette d'expression du transgène reste néanmoins indispensable pour l'utilisation des vecteurs LV-DI en thérapie génique.

Poster N°4

Etude du mécanisme d'action des polymères pour le transfert de gène.

Chèvre R.^{1,2,3}, Letrou Bonneval E.^{1,2,3}, Labas R.^{1,2,3}, Pitard B.^{1,2,3}

¹ Inserm, U915, Nantes, F-44035 France, ² Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, F-44000 France, ³ CHU, l'Institut du thorax, Nantes, F-44000 France.

Introduction : Les avancées dans le domaine de la thérapie génique reposent en grande partie sur la mise au point de méthodes efficaces pour transférer des séquences d'acides nucléiques appropriées dans des cellules-cibles. Dans le cadre du transfert de gènes *in vivo*, une nouvelle famille de vecteurs, les copolymères à blocs, à récemment été développée. Si ces molécules se sont révélées très efficaces pour le transfert de gène *in situ* dans différents organes comme le muscle ou le poumon, leur mécanisme d'action demeure totalement inconnu. Il serait donc intéressant d'identifier les différentes voies impliquées dans la transfection médiée par ces nouveaux vecteurs afin d'optimiser leur efficacité.

Résultats : Les copolymères à blocs ne permettant pas le transfert de gène *in vitro*, qui est classiquement médié par des vecteurs cationiques, l'utilisation de complexes hybrides vecteurs cationiques / copolymères à blocs a été envisagée afin de combiner les propriétés de ces deux types de molécules. Néanmoins ce type de système n'a pas permis d'améliorer efficacement la transfection. En revanche, nous avons observé que la transfection de cellules en culture à l'aide d'un vecteur cationique était stimulée par l'ajout de copolymères à blocs dans le milieu de culture. Nous avons alors développé un modèle d'étude *in vitro* afin de caractériser l'effet de ces polymères sur la transfection.

La stimulation de la transfection s'est avérée être indépendante du type de vecteur cationique utilisé ou du type cellulaire transfecté, mais en revanche dépendante de la période d'incubation des cellules avec les copolymères à blocs qui doit avoir lieu avant la transfection. Les copolymères à blocs semblent donc stimuler certaines voies cellulaires permettant un meilleur transfert du transgène. De plus, cet effet a également été observé lors de la transfection de siRNA. Ces derniers n'étant pas concernés par les étapes d'import nucléaire, les copolymères à blocs semblent donc bien stimuler l'internalisation des acides nucléiques.

Conclusion : L'identification des différentes voies impliquées dans la transfection médiée par les copolymères à blocs permettra de mieux comprendre leurs mécanismes d'action, leurs limites, et permettra donc à terme leur optimisation.

Poster N°5

Sonoporation : a new efficient method for gene transfer in healing tendon

Anthony Delalande^{1,2}, Arnaud Suwalski¹, Kadija Kaddur², François Tranquart², Patrick Midoux¹, Ayache Bouakaz², Chantal Pichon¹

¹ Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301 CNRS, rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 2-France.

² Inserm U930, CHRU Bretonneau 2 boulevard Tonnelé, 37044 Tours Cedex-France.

Rationale: Degenerative or traumatic tendons injuries heal poorly and the normal function of the injured tissues is never restored. Hypocellularity and poor vascularization of those tissues are the main causes of this poor regeneration. Traditional therapy aimed at controlling inflammation but its effectiveness in the long term has not been demonstrated despite pain relief in the short term. Several growth factors like PDGF have been shown to increase tendon healing (Wang, Liu *et al.* 2004, *J Hand Surg Am* 29: 884-90). These last years, ultrasound and gas microbubbles-mediated gene transfer (sonoporation) have been described as an alternative efficient physical method for gene transfer (Newman and Bettinger 2007, *Gene Ther* 14: 465-75). This study is to demonstrate that this method could be used for gene therapy to accelerate tendons healing. It will offer the possibility of transferring genes that positively affect tendon healing and the beneficial stimulation effect of ultrasound reported as a physical therapy for tendinopathy (Ng and Fung 2007, *Ultrasound Med Biol* 33: 1750-4).

Methods: The set-up consisted of a 1 MHz piezoelectric ultrasound transducer connected to a power amplifier and an arbitrary waveform generator. Experimental microbubbles, BR14 were generously provided by Bracco Research. Achilles tendons of Wistar rats or C57Bl6 mice were transfected with plasmid DNA encoding luciferase as reporter gene. Indicated amounts of plasmid and microbubbles were mixed and were injected directly into tendons before an insonation of 2 minutes. Different ultrasound parameters (acoustic pressure, duty cycle) were performed to determine optimal acoustic setting for tendons sonoporation. When indicated, tendons were harvested, crushed and lysed. Transfection efficiency was evaluated by measuring the luciferase activity as read out.

Results and conclusion: The transfection rate was dependent on acoustic pressure and the duty cycle used. Ultrasound alone was able to increase almost five times the efficiency of gene transfer mediated by the plasmid injection. This efficiency is further improved (more than 20-fold) in the presence of microbubbles. The optimal ultrasound setting in rat Achilles tendons was obtained at 200 kPa, 40 % duty cycle and 15 μ l microbubbles ($4.16 \cdot 10^7$ RLU/mg proteins vs 8.2105 RLU/mg proteins with 20 μ g of plasmid alone).

Our data indicate that sonoporation is a potential method for efficient gene transfer in tendons. Its efficacy to transfer therapeutic genes is now evaluated on injured tendons. Optimal acoustic parameters are used to transfect plasmid encoding PDGF gene to stimulate tendon healing. After one week or one month, tendon regeneration will be determined by histology, biomechanical tests, and measurement of collagens I and III productions by quantitative RT-PCR.

Poster N°6

THERAPIE GENIQUE DE LA MALADIE DE CRIGLER-NAJJAR PAR DES AAV RECOMBINANTS CHEZ LE JEUNE RAT

FLAGEUL M.*, AUBERT D.*, PICHARD V.*, NGUYEN T.H.*, FERRY N.*

* Biothérapies Hépatiques - EA 4274 - INSERM CIC04 - CHU Nantes, France

La maladie de Crigler-Najjar de type 1 (CN-1) est une maladie autosomique récessive rare due à des mutations dans le gène *UGT1-A1* codant la Bilirubine UDP-Glucuronosyl Transferase (B-UGT1). Cette enzyme est responsable de la glucuronocouplage de la bilirubine au niveau des hépatocytes, et de son élimination. L'absence totale de cette enzyme chez les patients CN-1 entraîne une accumulation toxique de bilirubine libre non conjuguée dans le sérum. Les traitements actuels de cette pathologie sont la photothérapie ou la greffe de foie. Le modèle animal de cette pathologie est le rat Gunn. Le but de notre étude est d'évaluer la correction de l'hyperbilirubinémie chez de jeunes rats Gunn par une approche *in vivo* en utilisant des virus recombinants adéno-associés (AAV) de sérotype 8. Ces vecteurs sont déjà utilisés dans de nombreuses études pour leur grande efficacité de transduction des hépatocytes.

Des vecteurs AAV 2/8 CMV B-UGT1 ont été injectés à des rats Gunn homozygotes (-/-) âgés de 2 jours (par la veine temporale) ou de 2 semaines (via la veine porte), à une dose de 1×10^{13} gp/kg. Des rats Gunn hétérozygotes (-/+) ou Wistar nouveaux-nés ont reçu de l'AAV 2/8 CMV nls LacZ en veine temporale, à $1.4-2 \times 10^{13}$ gp/kg. L'évaluation de la correction s'effectue par dosage du taux de bilirubine sérique dans le groupe des rats Gunn -/- injectés par l'AAV codant la B-UGT1. Dans la cohorte d'animaux ayant reçu le gène rapporteur LacZ, le niveau de transduction est mesuré par immuno-histochimie et PCR quantitative.

A 2 semaines post injection, la correction de l'hyperbilirubinémie est partielle (34 μ M) chez les animaux injectés à la naissance par l'AAV 2/8 CMV B-UGT1. Elle est totale dans le groupe des rats injectés à J14 (bilirubine sérique <10 μ M). Cependant, dans les 2 cohortes cette correction n'est que transitoire, et disparaît au bout de quelques semaines.

Afin de comprendre cette baisse d'activité thérapeutique, des vecteurs recombinants portant le gène rapporteur LacZ ont été administrés à des rats nouveaux-nés. A 7 jours post injection, l'expression du transgène est très forte dans le foie : 25% de cellules en moyenne expriment la beta-galactosidase. Entre 1 et 3 mois post-injection, 0.1 % de cellules continuent de synthétiser la beta-galactosidase. De façon intéressante, les cellules exprimant le transgène à 3 mois dans le foie forment de petites colonies. Cette même observation a été rapportée par l'équipe de I.E. Alexander après injection de vecteurs AAV codant la green fluorescent protein (GFP) chez la souris nouveau-né¹. Par PCR quantitative sur foie total nous mesurons une diminution du nombre de copies du transgène, passant de 5.5 ± 4.3 à 0.2 ± 0.1 copies par cellule entre J7 et 3 mois post injection. Nous avons disséqué des colonies exprimant la β -galactosidase ainsi que des zones négatives sur les échantillons de foie à 3 mois post-injection. L'analyse par PCR quantitative indique une différence d'environ 68 fois entre les zones positives et négatives (en moyenne 30.5 copies du gène LacZ par cellule dans les colonies de cellules positives, contre 0.45 copies dans les zones négatives).

Cette diminution rapide de l'expression du transgène entre J7 et 1 mois est compatible avec une disparition des génomes AAV au cours des divisions de l'hépatocyte pour constituer le foie adulte. Ces résultats pourront être confirmés par Southern blot. L'expression du vecteur est maintenue à long terme dans certaines cellules sous forme de colonies. Ceci pourrait être dû à la présence d'une structure intégrée de l'AAV au niveau de ces cellules. Afin de vérifier cette hypothèse et de déterminer les sites d'intégration, la technique de la Lam-PCR sera utilisée en collaboration avec l'équipe de M. Schmidt (NCT, Heidelberg, Allemagne)².

La correction transitoire de l'hyperbilirubinémie chez les rats Gunn -/- injectés par l'AAV 2/8 CMV B-UGT1 pourrait être également due à ce phénomène de division. Ainsi, le faible pourcentage d'hépatocytes exprimant le transgène à long terme ne permettrait pas une synthèse suffisante d'enzyme B-UGT1 pour une correction définitive. Les vecteurs AAV doivent donc être améliorés pour permettre leur maintien à long terme dans un foie en division. La ré-injection de vecteurs à l'âge adulte est également une perspective envisageable.

Une étude de carcinogénèse est prévue afin d'établir le potentiel tumorigène ou non des vecteurs AAV chez le rat Wistar. En effet, de récents articles ont montré la possibilité de formation de tumeurs dans le foie de souris injectées à la naissance par des vecteurs AAV^{3,4}. Nous utiliserons le 2-acétylaminofluorène comme agent promoteur, et suivrons l'apparition ou non de foyers pré-néoplasiques par une étude histologique du foie.

1. Cunningham S.C. et al. 2008. Gene delivery to the juvenile mouse liver using AAV2/8 vectors. *Mol. Ther.* Apr 15 [Epub ahead of print]

2. Schmidt M. et al. 2007. High-resolution insertion-site analysis by linear amplification-mediated PCR (Lam-PCR). *Nat. Meth.* 4(12) : 1051-1057

3. Donsante A. et al. 2001. Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther.* 8:1343-6

4. Bell P. et al. 2006. Analysis of tumours arising in male B6C3F1 mice with and without AAV vector delivery to liver. *Mol. Ther.* 14 (1): 34-44.

Poster N°7

EVALUATION DE L'EFFET D'UNE CO-TRANSPLANTATION SYSTEMIQUE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES ET DE CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES DANS L'ATTEINTE NEUROLOGIQUE DE MODELES MURINS DEVELOPPANT L'ADRENOLEUCODYSTROPHIE :

APPROCHE DE THERAPIE GENIQUE DE L'ADRENOMYELONEUROPATHIE

Francois S¹, L'Homme B¹, Moreira A¹, Fouquet F¹, Lataillade J², Aubourg P¹, Cartier N¹

⁽¹⁾INSERM U745 and Dept. of Neuropediatrics, Paris5 University School of Medicine and Hôpital Saint-Vincent de Paul, Paris, France ; ⁽²⁾Centre de transfusion Sanguine des Armées, Hôpital Percy, Clarmart, France ;

L'adrénoleucodystrophie liée à l'X (ALD) est caractérisée par une démyélinisation progressive et une accumulation des acides gras à très longues chaînes (AGTLC) dans le système nerveux central. Deux formes cliniques majeurs de la maladie sont observées ; la forme cérébrale infantile (40% des cas) et la forme adulte ou l'adrénomyélonéuropathie (AMN, 60% des cas). L'AMN se caractérise par une atteinte de la moelle épinière avec une dégénérescence axonale entraînant progressivement une paraplégie spastique grave à l'âge adulte. La seule thérapie à ce jour efficace dans le traitement de l'ALD est la transplantation allogénique de cellules hématopoïétiques (HCT) permettant de stabiliser ou de faire régresser le processus de démyélinisation cérébrale lorsqu'elle est réalisée à un stade précoce de la maladie. La greffe de cellules hématopoïétiques n'est cependant jamais proposée aux patients adultes atteints d'AMN, du fait des risques accrus de cette procédure à cet âge. Nous avons démontré préalablement la faisabilité d'une approche de thérapie génique pour des patients atteints d'ALD cérébrale, et un essai clinique autorisé par l'AFSSAPS est actuellement en cours. Les conséquences de l'HCT sur le phénotype AMN sont cependant inconnues à ce jour. Une première étude nous a permis de montrer que la transplantation de moelle osseuse chez des souris simple KO ALD prévient le phénotype moteur de l'AMN. Mais le phénotype tardif de ce modèle ne permet cependant pas une évaluation complète de l'efficacité de la greffe au niveau neuropathologique et électrophysiologique. Dans le but de compléter ces premiers résultats précliniques et améliorer la prise de greffe, nous avons développé un modèle de greffe de précurseur hématopoïétiques chez la souris double KO pour le gène ALD et ALDR qui présente un phénotype de type AMN plus précoce et plus sévère que les simples KO avec une neuropathie périphérique débutant dès l'âge de 12 mois. Dans le but d'augmenter la migration de ces précurseurs hématopoïétiques dans le système nerveux central et périphérique, nous avons co greffées des cellules souches mésenchymateuses (CSM) avant l'HCT. Ces cellules souches adultes non hématopoïétiques ont été décrites comme source de nombreux facteurs de croissance, de cytokines, chemokines, possédant un pouvoir important de migration au site de lésion. De nombreuses études décrivent que les CSM améliorent ou accélèrent la restauration et la reconstitution du système hématopoïétique en diminuant le risque de rejet de greffe.

Vingt souris double KO ALD/ALDR, ont reçu une greffe de précurseurs hématopoïétiques (Sca 1+-ALD+), 10 de ces animaux ont également reçu des 1.10^6 CSM humaines. Les cellules Sca1+ ont été purifiées à partir de moelle osseuse de souris C57bl6 et injectées à une concentration de 700 000 par souris. Les CSMh ont été cultivées du 2^{ème} au 5^{ème} passage, et injectées en sinus retro orbital à 1.10^6 par animaux. Nous avons analysé les animaux greffés à 8 et 60 jours post-injection. En présence de CSM, l'expression moyenne de la protéine ALD dans le sang périphérique est significativement augmentée dès la première semaine post-greffe en comparaison aux souris uniquement greffées avec des cellules Sca1+. A huit jours, le taux de cellules ALD+ circulantes chez les souris co-greffées (Sca1+-CSM) est de $69.3 \pm 3.1\%$ et à 60 jours post greffe, celui-ci est de $79 \pm 2\%$. Nous avons réalisé une première étude de l'implantation des précurseurs hématopoïétiques dans le cerveau de souris 2 KO ALD/ALDR. Soixante jours post-injection, on retrouve $2,0 \pm 0,3\%$ de cellules ALD+ dans les cerveaux des souris ayant reçu une co-greffe et $0,7\%$ chez les souris n'ayant qu'une greffe de précurseurs hématopoïétiques. Très peu de cellules humaines ont été détectées 60 jours post-greffe ($0,2\%$). Malgré le faible pourcentage de cellules humaines détectées dans le cerveau, leur présence dans l'organisme semble avoir augmenté le nombre de CSH-ALD+ en circulation dans le sang périphérique et leur implantation dans le cerveau. L'analyse du rôle des CSM dans le passage des cellules hématopoïétiques greffées à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE) et leur effet sur le turnover de la microglie à des temps plus tardifs est en cours. Ces premiers résultats suggèrent une action des CSMh sur le passage de la BHE par les précurseurs hématopoïétiques injectés chez un modèle murin développant à long terme un phénotype de type AMN, sans rejet de greffe ni infection.

Poster N°8

TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) inhibits primary bone tumor growth and augments survival in a human model Ewing sarcoma.

¹Geffroy L, ¹Chauvière D, ¹Lamoureux F, ¹Picarda G, ¹Rousseau J., ²Delattre O., ³Burchill S, ⁴Delépine P, ¹Gouin F, ¹Trichet V., ¹Heymann D, ¹Rédini F

¹INSERM ERI 7-EA 3822, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035 France ;²Leeds Institute of Molecular Medicine, St James's University Hospital, Leeds, UK ; ³INSERMU830, Institut Curie, Paris, France; ⁴INSERM U613, Université de Bretagne occidentale, Brest, France.

Ewing's sarcoma is a small round-cell tumor typically arising in the bones of children and adolescents. The development of multi-disciplinary therapy has increased long-term survival rates to greater than 50%. However, patients with clinically detectable metastases at diagnosis, or patients not responding to therapy have a significantly poorer prognosis (20%). Among new therapeutic approaches, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a death ligand that possesses selective anti-tumor activity against a number of cancer cell lines without systemic toxicity.

The sensitivity of several human Ewing sarcoma cell lines (A673, SIM, TC-71, TC-32, SK-ES1, RDES, all expressing the *EWS-FLI1* fusion gene) to TRAIL was investigated in terms of proliferation, apoptosis and receptor expression. Its potential preclinical application was studied in the corresponding models developed in nude mice.

In vitro proliferation assays showed differential sensitivity to TRAIL: highly sensitive cell lines (TC-71, A673, RDES: EC50 between 0.5 and 1nM), weakly sensitive (TC-32, SK-ES1; EC50 = 10 nM) and resistant ones (SIM). The inhibition of cell proliferation in sensitive cells is caused by cell death induced by caspase 3 activation. RT-PCR analysis revealed that the cell lines differentially express TRAIL activator (DR4, DR5) and decoy (DcR1, DcR2, OPG) receptors, this differential expression being independent of the p53 status of the cells.

Using a model of Ewing sarcoma induced by intra-muscular injection of human A673 cells in nude mice, TRAIL administered by non viral gene therapy inhibits the primary bone tumor growth (- 86%, n=8) leading to a significant 2-fold increase of animal survival 40 days after tumor induction. TRAIL also exerts a beneficial effect on mice survival in a model of lung metastases developed from intravenous injection of osteosarcoma cells, another primary bone tumor. The overall results suggest that TRAIL may represent a good candidate for the development of new therapeutic strategies in Ewing sarcoma.

Poster N°9

FGF10 Overexpression by *in utero* Gene Transfer Induces Cystic Adenomatoid Malformations in Fetal Rat Lung

Sílvia Gonzaga^{1,2}, Tiago Henriques-Coelho^{2,3}, Marcus Davey², Philip W. Zoltick², Adelino F. Leite-Moreira³, Jorge Correia-Pinto¹, Alan W. Flake²

¹ Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal. ² The Children's Center for Fetal Research, Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA. ³ Department of Physiology, Oporto Medical School, University of Porto, Porto, Portugal.

Abstract

Fibroblast growth factor-10 (FGF10) is a mesenchymal growth factor, involved in epithelial and mesenchymal interactions during lung branching morphogenesis. Congenital cystic adenomatoid malformation (CCAM) is a lung lesion characterized by dilated airspaces and failure of alveolar development. Increased cell proliferation and decreased apoptosis have been reported in CCAM. To investigate the role of FGF10 in fetal lung development, we examined the effect of transient FGF10 overexpression in the rat fetal lung by transuterine ultrasound-guided intraparenchymal microinjections of adenoviral vector, Ad-GFP-rFGF10. In the present work, we also evaluate the effect of *in utero* gene transfer in a temporally and spatially restricted manner, during the pseudoglandular or canalicular stages of rat lung development.

Injected lungs were analyzed by ultrasound, magnetic resonance imaging, gross appearance and fluorescence stereomicroscopy at different pre and postnatal time points. Gene transfer efficiency was confirmed by GFP fluorescence stereomicroscopy and immunohistochemistry. FGF10 overexpression was assessed by *in situ* hybridization and quantitative PCR and gene transfer.

The morphologic and histologic classification of the resulting malformations were dependent upon developmental stage and location. Overexpression of FGF10 restricted to the proximal tracheobronchial tree during the pseudoglandular phase resulted in large cysts lined by tall columnar epithelium comprised primarily of Clara cells with a paucity of Type II pneumocytes, resembling bronchiolar type epithelium. In contrast FGF10 overexpression in the distal lung parenchyma during the canalicular phase resulted in small cysts lined by cuboidal epithelial cells comprised of primarily Type II pneumocytes resembling acinar epithelial differentiation.

The cystic malformations induced by FGF10 overexpression appear to closely recapitulate the morphology and histology of the spectrum of human congenital cystic adenomatoid malformation (CCAM). These findings support a role for FGF10 in the induction of human CCAM and provide further mechanistic insight into the role of FGF10 in normal and abnormal lung development.

Poster N°10

Etude du rôle de la protéine WASp dans la lymphopoïèse humaine grâce à l'ARN interférence dans un modèle du syndrome de Wiskott-Aldrich chez la souris humanisée.

Laurence Jeanson-Leh^{1*}, Els Verhoeyen^{2*}, Caroline Costa², Roseline Yao¹, Véronique Parietti¹, Armelle Viorneri¹, Laetitia Van Wittenberghe¹, François-Loïc Cosset², Anne Galy¹

(1) INSERM U790 et Genethon, Evry, France (2) INSERM U 758, ENS Lyon, France

* Contributed equally to this work

Le syndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) est une immunodéficiência associée à de l'eczéma et une micro-thrombocytopénie. Cette maladie rare est due à l'absence de la protéine WAS (WASp) dans les cellules hématopoïétiques. De nombreuses anomalies biologiques cellulaires ont été décrites dans le système immunitaire des patients WAS, notamment des défauts d'activation des lymphocytes T effecteurs et régulateurs, des anomalies membranaires, des difficultés d'endocytose et une migration cellulaire anormale. On observe également une lymphopénie T et B mais son origine, centrale ou périphérique, est mal comprise.

La faible disponibilité de prélèvements de patients et la pertinence partielle des modèles murins à la maladie nous ont conduits à développer une nouvelle approche pour étudier des cellules humaines déficientes en WASp *in vivo*. Nous avons développé des vecteurs lentiviraux (LV) codant pour des shRNA afin de réaliser un knock-down efficace et stable de WASp dans des cellules humaines CD34⁺ grâce à l'ARN interférence. Nous avons également utilisé le modèle de reconstitution de souris immunodéficientes Rag2^{-/-} γ c^{-/-} par des cellules CD34⁺ humaines. Ce système permet un développement *de novo* de lymphocytes B, T et de cellules dendritiques, la formation d'organes lymphoïdes primaires et secondaires structurés et l'établissement d'une réponse immunitaire fonctionnelle. Afin d'étudier le rôle de WASp dans le développement lymphoïde humain *in vivo*, nous avons reconstitué des souris Rag2^{-/-} γ c^{-/-} avec des CD34⁺ transduites avec le vecteur LV-shRNA ciblant WASp, puis analysé les tissus et le sang des animaux, 10 à 14 semaines post greffe.

L'analyse cytométrique des organes hématopoïétiques et lymphoïdes des souris traitées montre que la déficience en WASp ne conduit pas à un blocage de l'hématopoïèse centrale ou de la lymphopoïèse. L'ensemble des lignages hématopoïétiques, dont les lymphocytes B, les thymocytes, les cellules myéloïdes sont produits à partir de cellules exprimant le shRNA dirigé contre WASp. Cependant, l'absence de WASp conduit à une thymopoïèse anormale avec une surreprésentation des lymphocytes T CD3⁺ matures et une baisse des thymocytes double positifs (CD4⁺CD8⁺). Dans la moelle et dans la rate, une réduction du nombre de lymphocytes B CD19⁺ est observée lorsqu'un fort knock-down de WASp est induit. Ces résultats semblent reproduire la lymphopénie B observée chez les patients WAS. Les résultats sont également concordants avec l'observation d'une forte réduction de la production de cellules CD19⁺ *in vitro* à partir de cellules CD34⁺ cultivées sur stroma OP9 et lorsque WASp est fortement inhibé. La déficience en WASp semble donc bien capable de perturber la production lymphocytaire à un niveau central. Des études plus approfondies sont en cours pour déterminer le niveau de blocage dans la différenciation et/ou la migration de ces populations lymphocytaires affectées et pour tester fonctionnellement ce nouveau modèle animal du syndrome de Wiskott-Aldrich.

Poster N°11

Obtention et caractérisation de lignées tumorales de patients atteints de mélanome métastatique au stade ganglionnaire (Stade IIIB-C AJCC)

MC Pandolfino*, S Saïagh*, A Khammari** et B Dréno**

*Unité de Thérapie Cellulaire et Génique (UTCG), CHRU, Institut de Biologie, 9 quai Moncoussu 44093 Nantes Cedex 01

**Unité de cancérologie cutanée, CHRU, Nantes

Rationnel : Pour mesurer l'activité fonctionnelle des populations de TIL préparées à l'UTCG, nous établissons la lignée tumorale autologue à partir d'un fragment du ganglion envahi ayant servi à obtenir les lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL). Un 1^{er} essai clinique randomisé « TIL+interleukine 2 (IL-2) versus IL2 », en adjuvant, chez des patients atteints de mélanome au stade métastatique IIIB-C (AJCC), a montré une augmentation significative de la survie sans rechute et de la survie globale des patients du bras « TIL+IL-2 » ayant un seul ganglion métastatique, aucune différence n'a été retrouvée chez les patients ayant plusieurs ganglions envahis (a, b). Pour essayer de comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans cette différence d'efficacité des TIL : 'un versus plusieurs ganglion(s) envahi(s)', nous avons cherché d'une part, à déterminer s'il existait des différences d'expression de certains marqueurs intervenant dans l'interaction Cellule tumorale – TIL et d'autre part, nous avons examiné la production des cytokines immunosuppressives par les lignées tumorales obtenues à partir de 1 ou plusieurs ganglion(s) envahi(s).

Méthode : Les lignées sont obtenues par mise en culture de petits fragments du ganglion envahi en présence d'un milieu de culture contenant du sérum de veau fœtal (SVF). Une fois la lignée tumorale établie, les antigènes suivants ont été déterminés par immunomarquage et analysés au cytomètre en flux : *molécules du CMH : HLA Classe I, HLA A2, HLA Classe II ;* molécules d'adhésion : CD54 et CD58, * antigènes de tumeur : Melan-A/MART-1, gp100, tyrosinase, MAGEs et NY-ESO1. Parallèlement, une PCR semi-quantitative était réalisée pour l'étude transcriptionnelle des gènes Melan-A/MART-1, Tyrosinase, NY-ESO1, MAGE1, MAGE3 et Na17-A). La production de 2 cytokines immunosuppressives : IL-10 et TGF- β a été recherchée dans le surnageant de culture des lignées tumorales par test ELISA.

Résultats : Le pourcentage d'obtention des lignées (Groupe « 1 ganglion » : 47% ; Groupe « Plus d'1 ganglion » : 48%) et le délai d'obtention (Groupe « 1 ganglion » : 4.5 +/- 3 mois ; Groupe « Plus d'1 ganglion » : 4.6 +/- 3 mois) ne sont pas significativement différents entre les 2 groupes (p= 0.122)

Nous avons étudié 16 lignées du groupe « 1 ganglion » et 17 du groupe « Plus d'1 ganglion ». Concernant l'étude phénotypique, on ne trouve pas de différences significatives au niveau de l'expression des molécules du CMH, des molécules d'adhésion et des antigènes de tumeur. De la même manière, il n'existe pas de différence dans l'expression transcriptionnelle des gènes de tumeur étudiés. Enfin, la production des cytokines immunosuppressives, par les lignées de mélanome, TGF- β et/ou IL-10 n'est pas plus importante dans le groupe « Plus d'1 ganglion ».

Conclusions : Ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre de lignées mais semblent indiquer qu'il n'existe pas de différence des profils phénotypique, transcriptionnel et cytokinique entre les lignées de mélanome obtenues à partir de un ou plusieurs ganglion(s) envahi(s). Cette étude montre aussi la maîtrise de notre laboratoire dans l'obtention des lignées de mélanome.

a : Dréno B, N'Guyen JM, Khammari A, Pandolfino MC, Tessier MH, Bercegeay S, Cassidanius S, Lemarre P, Billaudel S, Labarrière N, Jotereau F: "Randomized trial of adoptive transfert of melanoma Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) as adjuvant therapy in melanoma stage III."

Cancer Immunol Immunother 2002; 10: 539-46.

b : Labarrière N, Pandolfino MC, Gervois N, Khammari A, Tessier MH, Dréno B, Jotereau F: "Therapeutic efficacy of melanoma reactive TIL infused to melanoma stage III patients"

Cancer Immunol Immunotherapy 2002 ; 10 :532-8.

Poster N°12

Cellules stromales d'adénocarcinome ovarien comme nouveaux vecteurs thérapeutiques ?

Marlene Pasquet, Muriel Golzio, Arash Rafii, Eliane Mery, Philippe Bourin, Isabelle Hennebelle, M. Mirshahi, Justin Teissie, Roland Bugat, Bettina Couderc

EA 3035 Institut Claudius Regaud 20-24 rue du pont St Pierre 31052 Toulouse

Les cellules souches mésenchymateuses ont un tropisme particulier pour les cellules tumorales faisant d'elles de bons candidats pour véhiculer des drogues toxiques vers les cellules tumorales. L'équipe de Mirshahi (Inserm UMR 736) a isolé à partir d'ascites de patientes atteintes de cancer des ovaires des cellules associées aux cellules tumorales présentant un phénotype proche des cellules mésenchymateuses. Nous avons évalué l'utilisation de ces cellules en tant que vecteurs thérapeutiques vers les cellules d'adénocarcinome ovarien. Dans un premier temps nous avons caractérisé ces cellules, appelées cellules hôtes (hospicells) par immunocytométrie et immunodosages. Elles expriment certains marqueurs retrouvés chez les cellules souches mesenchymateuses (CD29, CD146, CD166, HLA-1) et synthétisent entre autres du VEGF-A. *In vitro* ces cellules ont un effet modeste sur la vitesse de prolifération des cellules d'adénocarcinome ovarien humaines (trois modèles cellulaires utilisés : OVCAR-3, SKOV-1 et IGROV-1). Elles ont un fort pouvoir auto-attractants, sont capables de migrer vers les cellules tumorales et attirent également à elles les cellules d'adénocarcinome ovarien (tests d'invasion et de migration). Nous avons évalué *in vivo* si les cellules hôtes injectées i.p. ou i.v. 7 jours post implantation de cellules tumorales étaient capables de « homing » vers les cellules tumorales par stéréo microscopie à fluorescence (caméra CCD). Nous avons montré une association des cellules hôtes aux cellules tumorales. Toutefois *in vivo* chez la souris Nude la coinjection s.c. de ces cellules avec les cellules d'adénocarcinome ovarien des trois modèles induit une croissance tumorale accélérée par rapport aux cellules tumorales seules. Injectées i.p. nous avons montré par IRM et par analyse macroscopique après dissection que ces cellules (de la même façon que des cellules souches mésenchymateuses) favorisent l'implantation intrapéritoneale des cellules d'adénocarcinome en s'associant avec elles. La cinétique d'implantation des deux sous populations cellulaires a été évaluée. Ces dernières observations hypothèquent l'utilisation future des cellules hôtes en tant que vecteurs thérapeutiques pour le traitement des cancers ovariens. Comme nous avons également observé que les tumeurs obtenues par co-injection des deux types cellulaires présentaient une microvascularisation importante, nous avons étudié le rôle des cellules hôtes dans l'angiogenèse. Ces derniers résultats ouvrent des perspectives sur la compréhension des nouvelles stratégies thérapeutiques anti angiogéniques de l'adénocarcinome ovarien actuellement en cours de développement.

Poster N°13

Vaccination antitumorale par transfert de l'ARN messenger: Effet vaccinal d'injection systémique de lipopolyplexes contenant l'ARNm de l'antigène MART-1 contre la progression tumorale et métastatique du mélanome B16F10.

Federico Perche¹, Valérie Quesniaux², Chantal Pichon¹ et Patrick Midoux¹

¹Centre de Biophysique Moléculaire CNRS UPR 4301, Orléans cedex 2, France; ²Laboratoire d'Immunologie et d'Embryologie Moléculaire, CNRS UMR 6218, Orléans cedex 2, France.

Pour vacciner contre le cancer, il est essentiel de générer une immunothérapie active qui mobilise des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiquement programmés pour tuer les cellules cancéreuses ou les métastases. Les cellules dendritiques (DC) ont la capacité à apprêter l'antigène et à exposer les épitopes à leur surface en association avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) qui va pouvoir induire la stimulation de CTL spécifiques. Les essais cliniques réalisés à ce jour sur individus sains ont prouvé qu'une injection de DC activés ex vivo par l'antigène est capable d'induire rapidement une réponse de CTLs spécifiques. Ces manipulations sont laborieuses, coûteuses et variables selon le type de DC. Le dosage et le protocole d'administration de ces cellules ont encore besoin d'être optimisés.

L'injection *in vivo* de l'antigène sous une formulation permettant sa capture par les DCs présente donc plusieurs avantages. Lorsque l'antigène est connu, celui-ci peut être utilisé sous ses formes acides nucléiques (ADNc ou ARN messenger). Par rapport à l'ADNc, le transfert de l'ARNm permet de s'affranchir du transport de l'ADN dans le noyau des DC. Ainsi, la stimulation d'une réponse cellulaire spécifique avec l'ARNm d'un antigène tumoral est une stratégie en émergence pour le cancer.

Pour vectoriser un ARNm codant un antigène tumoral, nous avons développé un polymère cationique riche en histidine et des liposomes histidylés. La présence des résidus histidine permet une déstabilisation pH-dépendante des vésicules d'endocytose et ainsi une augmentation du passage de l'acide nucléique dans le cytosol.

En utilisant le modèle du mélanome murin B16F10, nous avons démontré que l'injection systémique de lipopolyplexes histidylés (complexe ARNm MART-1/polymère histidylé encapsulé dans des liposomes histidylés) permet une inhibition spécifique de la croissance tumorale et des métastases pulmonaires B16F10. Pour être efficace, l'ARNm doit être correctement coiffé en 5' et être terminé en 3' par une chaîne PolyA d'au moins 100 Adénosines. Une comparaison de l'effet protecteur selon différents modes d'administration des lipopolyplexes (iv, sc, ip et im) révèle que seules les voies iv et ip sont efficaces. Les lipopolyplexes MART-1 ARNm élicitent une réponse cellulaire caractérisée par la production de γ -IFN et de CTL. De façon très intéressante, l'administration conjointe de lipopolyplexes contenant l'ARNm MART-1 et de l'ARNm chimère MART-1/LAMP1 conduit à une protection très supérieure à l'administration de lipopolyplexes contenant l'ARNm MART-1 ou l'ARNm chimère MART-1/LAMP1 seuls. La sélectivité des lipopolyplexes vis-à-vis des DC et l'association d'adjuvant de la réponse immune innée devraient permettre d'augmenter l'effet vaccinal.

Gilboa et al., Immunological Reviews(2004) **199**, 251-263

Mockey et al., BBA (2006) **340**, 1062-1068

Mockey et al., Cancer Gene Therapy (2007), 802-814

Poster N°14

Interactions entre cellules souches mésenchymateuses et ostéosarcome : vers de nouvelles approches thérapeutiques ?

Perrot P, Bouffaut AL, Rousseau J, Rédini F, Heymann D, Duteille F, Trichet V.
Laboratoire de Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives (EA 3822, INSERM ERI7)
Faculté de Médecine de Nantes – 1, rue Gaston Veil 44035 Nantes Cedex 1

Introduction :

L'ostéosarcome est une tumeur maligne caractérisée par la formation directe de tissu osseux par les cellules tumorales, et dont le développement entraîne le plus souvent une ostéolyse para-tumorale. Les cellules souches mésenchymateuse (CSM) pourraient avoir un double intérêt dans le traitement de l'ostéosarcome : participer à la reconstruction du tissu osseux souvent dégradé près du site tumoral et servir de vecteur pour produire une protéine thérapeutique à activité anti-tumorale ou anti-résorption osseuse. Nous avons réalisé des co-injections de deux types cellulaires : cellules ostéosarcomateuses (OSRGa, POS-1) et cellules souches mésenchymateuses à différents stades, génétiquement modifiées pour exprimer le gène firefly luciférase (MSC LucF, pré-OB LucF, CCL226 LucF). Les modèles utilisés pour les cellules d'ostéosarcome de souris POS-1 étaient des souris C3H/HeN, et pour les cellules d'ostéosarcome de rat OSRGa des souris nude immunodéficientes Swiss nu/nu.

Résultats :

L'effet des précurseurs d'ostéoblastes sur les cellules ostéosarcomateuses a été analysé en comparant le volume tumoral du groupe recevant la co-injection (cellules ostéosarcomateuses et précurseurs d'ostéoblastes), au groupe recevant les cellules ostéosarcomateuses seules. Les précurseurs d'ostéoblastes entraîneraient un développement tumoral plus précoce et une augmentation du volume tumoral plus importante.

L'effet des cellules ostéosarcomateuses sur les précurseurs d'ostéoblastes a été analysé en comparant l'évolution de la bioluminescence des précurseurs d'ostéoblastes du groupe recevant la co-injection (cellules ostéosarcomateuses et précurseurs d'ostéoblastes), au groupe recevant les précurseurs d'ostéoblastes seuls. Les cellules ostéosarcomateuses favoriseraient le maintien et une légère prolifération des précurseurs d'ostéoblastes.

Les interactions entre cellules souches mésenchymateuses et ostéosarcome seraient donc en faveur d'une action pro-tumorale.

Discussion et perspectives :

L'étude de l'effet pro ou anti-tumoral des CSM dans les indications carcinologiques doit être poursuivie, notamment au regard du cas clinique d'une patiente de notre service. Dans ce cas, une injection de graisse purifiée selon la technique de Coleman pour regalber une épaule à 13 ans de rémission d'un ostéosarcome a été suivie d'une récurrence de la tumeur. Coïncidence ou conséquence ? Effet des adipocytes et/ou des CSM dérivées du tissu adipeux humain sur des cellules quiescentes d'ostéosarcome ? La mise en place de protocoles pré-cliniques pour répondre à ces questions apparaît importante pour accompagner sans risque l'évolution de pratique chirurgicale de reconstruction tissulaire post-tumorale et le développement de thérapie cellulaire anti-cancéreuse.

Poster N°15

Gene Therapy of Metachromatic Leukodystrophy: AAV-Mediated delivery of Arylsulfatase A in the brain of non-human primate

Françoise Piguet¹, Caroline Sevin¹, Marie-Anne Colle², Lise Bertrand², Sylvie Raoul³, Jérôme Amiaud², Laetitia Janneau⁵, Didi Sloothak¹, Ornella Ahouansou¹, Ivan Bieche¹, Yan Chere², Philippe Moullier⁴, Patrick Aubourg¹ & Nathalie Cartier¹.

¹: Inserm U745, Hôpital Saint Vincent de Paul, Paris; ²: UMR INRA 703, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes; ³: Centre de Neurochirurgie Hospitalière, Nantes; ⁴: Inserm U649, Centre Hospitalier Universitaire, Nantes; ⁵: Centre de Boisbonne, Ecole Nationale Vétérinaire, Nantes.

Metachromatic leukodystrophy (MLD) is a demyelinating lysosomal storage disorder due to the lack of Arylsulfatase A (ARSA), a lysosomal enzyme involved in the degradation of sulfatides. Resulting sulfatide accumulation in the central and peripheral nervous systems leads to a progressive demyelination and neuronal degeneration. The late infantile form is the most frequent (60% of cases) and severe form of the disease, occurring in the second year of life and leading to death before 5 years of age.

No treatment is currently available for the late infantile form of MLD and different therapies are currently under evaluation, like enzyme replacement therapy or genetically modified hematopoietic stem cells engraftment. The rapidity of neurological deterioration led us to develop a therapeutic approach to deliver directly and rapidly high amounts of ARSA in the brain, using stereotactic injections of adeno-associated virus (AAV) vector encoding ARSA.

The proof of principle was demonstrated in the MLD mouse model. Up to now, no large animal model of MLD has been identified. Thus, we used *Macaca fascicularis* monkeys to scale-up our strategy to a larger size brain (sufficient diffusion, lack of toxicity), an essential step before considering a clinical application. Four monkeys were injected in the right hemisphere with an AAV5/ARSA-HA vector, in 3 selected areas of the white matter (n=3 monkeys) or the subcortical grey matter (n = 1 monkey). A total amount of $1.9 \cdot 10^{12}$ PP was administered and animals were maintained under immunosuppressive therapy (CellCept) during the whole study.

Intracerebral injections were perfectly tolerated, as assessed with general and neurobehavioral evaluation that remained unchanged after rAAV vector delivery. Recombinant ARSA diffused up to 16mm from the injection site, global diffusion reaching to 40 mm in the injected hemisphere. ARSA-HA was expressed mostly in neurons of the cerebral cortex, caudate nucleus, putamen, pallidum, pulvinar and thalamus with minimal differences between animals or localization of the injection sites (white or grey matter). Some positive cells were also detected in the uninjected hemisphere, which suggests axonal transport of the vector and/or recombinant enzyme. ARSA activity was significantly increased in the injected hemisphere (2,2 fold max). The total volume of injected hemisphere showing increase in ARSA activity over +10% ranged from 45% to 80%, depending on the primate. Recombinant ARSA-HA diffused more widely than rAAV, suggesting diffusion of recombinant enzyme by secretion/endocytosis or axonal transport.

Circulating antibodies against AAV vector and transgene were detected in the serum and CSF of monkeys. A moderate inflammatory response was observed, close to the injection site. No histological lesions (neuronal death, demyelination) or transgene extinction have been associated with this immune response.

In order to characterize this inflammatory process, 2 monkeys were injected with a lower dose (1/4) of AAV5/ARSA-HA vector, and will be compared to previous injected primates in terms of diffusion of recombinant ARSA and immune response (circulating antibodies, peripheral and brain immune cells population, cytokine profile...).

These encouraging results clearly indicate that intracerebral gene therapy could benefit to MLD patients. Our ultimate goal is to submit an IND application to the AFSSAPS, with the objective to treat patients affected with the late infantile form of the disease at an early stage of the disease

Poster N°16

Nouvelles approches thérapeutiques des ostéosarcomes par transfert de gène ou ARN interférence et suivi par bioluminescence *in vivo*

Rousseau J¹, Lamoureux F¹, Escriou V², Bouffault A.L¹, Heymann D¹, Rédini F¹, Trichet V¹

(1) EA 3822-INSERM ERI 7 Physiopathologie de la Résorption Osseuse et Thérapie des Tumeurs Osseuses Primitives, Faculté de Médecine, Nantes ; (2) INSERM U640 Unité de Pharmacologie Chimique et Génétique, Université René Descartes, Paris V.

Dans le cadre du développement tumoral en site osseux (tumeurs primaires et métastases osseuses), un cercle vicieux s'établit entre la prolifération tumorale et la résorption osseuse. Cette ostéolyse est due à l'activation et la différenciation des ostéoclastes via la reconnaissance de la cytokine RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) par son récepteur RANK. Ainsi, dans un modèle d'ostéosarcome (la plus fréquente des tumeurs osseuses primitives), nous avons montré que la surexpression par thérapie génique d'un récepteur leurre de RANKL : l'ostéoprotégérine (OPG), était associée à une diminution de l'ostéolyse ainsi qu'à un ralentissement de la prolifération tumorale. Une nouvelle stratégie thérapeutique consisterait donc à bloquer directement l'expression de RANKL par ARN interférence.

Afin de mettre au point un protocole d'injection *in vivo* optimal de siRNA à but thérapeutique, nous avons choisi de cibler la production de la luciférase par ARN interférence dans des modèles d'ostéosarcome. Les lignées de souris POS-1 et de rat OSRGa ont été modifiées par technologie lentivirale pour exprimer stablement la luciférase. Ces lignées modifiées LucF-POS-1 et LucF-OSRGa ont conservé leurs propriétés physiologiques (expression de marqueurs caractéristiques) et cliniques (pouvoir tumorigène et propriétés de remodelage osseux). Elles sont désormais détectables plus précocement par imagerie optique en bioluminescence *in vivo* (BLI). Leur injection en site sous cutané au niveau du coussinet plantaire induit le développement d'une tumeur primitive dont la transplantation en site para-osseux permet de reproduire le tableau clinique observé chez les patients. L'étude du développement des tumeurs LucF-OSRGa montre une phase d'augmentation suivie par une diminution de la BLI malgré une progression tumorale exponentielle. Cette observation pourrait s'expliquer par la présence de tissus nécrotiques à l'intérieur de la masse tumorale où la luciférase ne serait plus exprimée. Cette absence de corrélation entre BLI et volume tumoral rend les tumeurs LucF-OSRGa inutilisables pour la mise au point du protocole d'injection des siRNA visant à diminuer l'activité de la luciférase. Inversement, l'évolution de la BLI des LucF-POS-1 est exponentielle et superposable à l'augmentation du volume tumoral. De plus, le traitement de ces tumeurs par un agent de chimiothérapie conventionnelle l'ifosfamide s'accompagne d'un ralentissement de la prolifération tumorale corrélée à une forte stagnation de la BLI.

Ces études préliminaires ont montré l'intérêt de la BLI comme technique efficace et reproductible pour des détections plus précoces et sensibles des tumeurs de type ostéosarcome. Cet outil nous a notamment permis de développer un modèle d'ostéosarcome pour évaluer l'efficacité de siRNA *in vivo*. L'injection de siRNA, spécifiques de la luciférase, complexés sous forme de lipoplexes avec le liposome RPR209120/DOPE est actuellement testée dans ce modèle. Le protocole d'injection ainsi développé pourra par la suite être utilisé en visant une molécule d'intérêt thérapeutique : RANKL.

Poster N°17

Identification of molecular modifications and signaling pathways associated with HSV-1 infection of hepatoma cells using subcellular proteomic analysis.

Enrique Santamaría¹, María I. Mora¹, Joaquín Fernández-Irigoyen¹, Corinne Potel², Rubén Hernández-Alcoceba¹, Alberto Epstein², Jesús Prieto¹, Fernando J. Corrales¹.

(1) Department of Hepatology and Gene Therapy, Proteomic Unit. Center of Applied Medical Research (CIMA). University of Navarre. Pamplona, Spain. (2) University Claude Bernard-Lyon. Center of Molecular and Cellular Genetics (CGMC). CNRS UMR5534, University Claude Bernard Lyon I. Lyon, France.

One of the most promising strategies for eradicating primary liver tumors is viral oncolysis. This approach is based on the utilization of the inherent lytic properties of the virus to selectively kill tumor cells. To efficiently and rationally achieve this therapeutic intervention it is critical to know the cellular targets and the molecular mechanisms that are modulated during virus infection. In the present work we analyzed the differential expression of proteins present in the cytosolic and microsomal fractions of human hepatoma cells (Huh7) at 4 and 8 hours after infection with HSV-1 Cgal+, a replication-competent virus derived from strain Glasgow 17 Syn+, which expresses LacZ reporter gene from the IGR54 intergenic region. Our experimental approach combined differential gel electrophoresis (DIGE) and mass spectrometry (nanoLC-ESI-MS/MS). We have unequivocally identified 16 cellular proteins, which are differentially expressed in infected and non-infected cells, and are involved in processes such as apoptosis, mRNA processing, cellular structure and integrity, signaling, and endoplasmic reticulum-associated degradation. The identification of proteins such as RuvB-like 2 and Bif-1 suggests novel mechanisms associated to HSV-1-induced apoptosis. Using the information obtained thanks to our proteomic approach and that of functional tests, we observed activation of serine/threonine phosphatase 2A (PP2A) in the infected Huh7 cells. In addition, we detected dephosphorylation and inactivation of several proteins belonging to the MAP kinases signaling pathway that are critical in the regulation of cell survival, as well as the activation of the proapoptotic protein Bad through dephosphorylation of the serine at position 112.

Poster N°18

Potentiel thérapeutique du transfert du gène codant PDGF par des vecteurs histidylés sur la régénération tendineuse.

Arnaud Suwalski¹, Anthony Delalande¹, Sabine Bensamoun², Francis Canon², Patrick Midoux¹, Chantal Pichon¹.

¹ Centre de Biophysique Moléculaire UPR4301, rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 2-France.

² BioMécanique et BioIngénierie UMR6600, Centre de Recherche de Royallieu – G311 Université Technologique de Compiègne BP 20529 60205 Compiègne Cedex-France.

Le tendon est un tissu conjonctif orienté de maintien qui transmet les forces mécaniques aux muscles. L'hypocellularité et hypovascularité du tissu tendineux lui confère la particularité d'avoir une régénération lente et incomplète suite à une lésion ou à une rupture. A ce jour, les traitements restent peu nombreux pour une efficacité toute relative. La production et la réorientation du collagène sont cruciales pour réparer la solidité des tendons. Des facteurs de croissance (FC) particuliers ont été identifiés comme actifs dans la régénération tendineuse. Ces FC ont été exploités sous forme de protéines recombinantes. Mais, leur faible temps de demi-vie et leur coût élevé de production nécessite l'élaboration d'une technique alternative telle que le transfert de gène qui permet de produire la protéine *in situ*. L'objectif de ce travail est d'augmenter la régénération des tendons en transférant des gènes de molécules actives connues pour induire la production de collagène I.

Nous avons évalué le transfert d'un plasmide codant l'isoforme B du gène PDGF (Platelet Derived Growth Factor) par des vecteurs synthétiques sur le tendon d'Achille de rat. Ce gène est connu pour son action mitogène ainsi que pour l'augmentation de la production de collagène I lors de l'inflammation du tendon. L'utilisation de vecteurs synthétiques est simple à mettre en oeuvre, peu coûteuse, peu immunogène et présente de très faible risque d'intégration du transgène.

Nous avons utilisé des liposomes cationiques histidylés développés au laboratoire. L'efficacité de ces vecteurs a été testée *in vitro* sur des ténocytes issus du tendon d'Achille de rat et *in vivo* sur des tendons lésés. Ces liposomes cationiques histidylés transfectent efficacement *in vitro* et *in vivo*.

Une seule injection de plasmide codant pour le gène B-PDGF vectorisé avec les liposomes histidylés dans le tendon d'Achille de rat lésé a permis une amélioration de la réparation tendineuse. Celle-ci a été évaluée en histologie et par des tests biomécaniques seulement une semaine post-traitement. Les analyses des paramètres biomécaniques ont révélées que les tendons sains et les tendons lésés traités avec le gène PDGF vectorisé présentent un module de Young similaire (paramètre d'élasticité du tendon, $98,73 \pm 4,56 \text{ N/mm}^3$ vs $75,43 \pm 29,8 \text{ N/mm}^3$). Il est à noter que la valeur de ce paramètre n'est pas significativement différent de celle obtenue suite à l'injection du plasmide nu ($84,23 \pm 3,86 \text{ N/mm}^3$). Les analyses histologiques montrent également une amélioration de la lésion. Cette régénération est encore plus nette lorsque deux injections de plasmide PDGF vectorisé espacées d'une semaine ont été effectuées. Les observations histologiques montrent une architecture plus structurée s'approchant d'une coupe histologique d'un tendon sain. A l'inverse, les tendons lésés non traités ou injectés avec le plasmide nu présentent une certaine désorganisation. Les tests biomécaniques et le dosage par PCR en temps réel des composants de l'architecture tendineuse sont en cours afin de valider ces résultats.

En conclusion, nos données démontrent que le transfert de gènes d'intérêt par des vecteurs synthétiques pour accélérer la régénération tendineuse est prometteur. Ce protocole sera complété à plus long terme en combinant le transfert d'autres acteurs de la régénération tendineuse tels que les molécules impliquées dans l'assemblage de la matrice collagénique.

- Molloy T., Wang Y. and Murrell G. 2003. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. Sports Med 33(5):381-94

- Aspenberg P. and Virchenko O. 2004. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. Acta Orthop Scand 75:93-99.

- Mével M., Clément J.C., Yaouanc J.J., Pichon C., and Midoux P. (2007). Nouvelles compositions lipophiles et leurs utilisations. 28 Septembre 2007 sous le N° FR 07 57955.

- Mével M., Breuzard G., Yaouanc J.-J., Clément J.-C., Lehn P., Pichon C., Jaffrès P.-A. and Midoux P. 2008. Synthesis and transfection activity of new cationic phosphoramidate lipids: High efficiency of an imidazolium derivative.

Poster N°19

New lenti-vectors co-displaying RD114 and SCF target gene transfer to HSCs in *in vivo*-like conditions

Verhoeyen E.¹, Frecha C.¹, Costa C.¹, Granier C.¹, Nègre D.¹, Cosset FL.¹

¹Inserm U758, Viral envelopes and Retrovirus engineering, ENS de Lyon, IFR-128, Lyon, France

Previously, we developed new VSV-G/TPO- and VSV-G/SCF- co-displaying vectors that outperform conventional VSV-G pseudotyped lentiviral vectors (LVs) for ex vivo gene delivery to the most immature hematopoietic stem cells (HSCs)¹. In vivo targeted gene delivery to HSCs would mean a big step forward in the field of gene therapy. However, since the fusion glycoprotein, VSV-G, is complement-sensitive and since its receptor is present on all tissues, it is unsuited for in vivo targeting. Therefore, we exchanged it for another fusion partner, a mutant cat endogenous glycoprotein, RDTR². The resulting RDTR/SCF and RDTR/SCF/TPO lenti-vectors were far more efficient in transducing hCD34+ cells (up to 40%) than RDTR vectors in presence of rTPO and rSCF and absence of retronectin (< 0.5%). Importantly, a 100-fold decrease in RDTR/SCF vector dosis (MOI 0.2) resulted only in a 1.4-fold reduction of CD34+ cell transduction. LVs for *in vivo* gene therapy use need to be able to distinguish between the target cells of interest and non-target cells. We evaluated the selectivity of the new vectors by transducing cord blood peripheral blood mononuclear cells (PBMC), containing only 1% CD34+ cells. The RDTR/SCF-displaying vectors were able to transduce preferentially the CD34+ target cells (up to 20%), while the RDTR LVs in the presence of rSCF did not. In addition, other cell lineages present in the PBMC population were not transduced. In contrast, G/SCF-co-displaying vectors allowed a transduction level of CD34+ cells of 5% at the most and transduced other cell lineages in the sample. Next, we mimicked as close as possible an in vivo setting for targeting gene transfer to CD34+ cells by transducing fresh cord blood containing only 0.001% CD34+ cells. Importantly, RD/SCF-pseudotyped LVs efficiently targeted transduction to CD34+ cells with 95-fold selectivity for CD34+ cells as compared to T-cells in the sample. G/SCF-vectors transduced also the non-target T-cell population resulting in only 1.8-fold selectivity for CD34+ cells transduction. In conclusion, the new RD/SCF-displaying lentiviral vectors allow a targeted gene transfer in the CD34+ progenitors in a CB sample, mimicking in vivo administration. Currently, we are testing the vectors by intra-marrow injection of humanized mice.

1. Verhoeyen E, Wiznerowicz M, Olivier D, et al. Novel lentiviral vectors displaying "early acting cytokines" selectively promote survival and transduction of NOD/SCID repopulating human hematopoietic stem cells. *Blood*. 2005;106:3386-3395.
2. Sandrin V, Boson B, Salmon P, et al. Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and non-human primates. *Blood*. 2002;100:823-832.

Poster N°20

Electropermeabilization for DNA transfer: from 2D to 3D cellular models

Luc Wasungu*, Jean-Michel Escoffre*, Annie Valette§ and Marie-Pierre Rols*

*Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, UMR 5089, 205 route de Narbonne, 31077 Toulouse, France. §Université Paul Sabatier- CNRS UMR 5088, 118 Route de Narbonne 31062 Toulouse, France.

Electropermeabilization consists in the use of membrane destabilizing electric pulses to transiently and specifically permeabilize the plasma membrane. This technique permits the entry of small molecules as well as macromolecules including proteins or DNA by quite a different mechanism. During the electric pulse the DNA migrates towards the membrane where it is inserted in some "competent microdomains" (1). The intracellular translocation and following trafficking of the DNA towards the nucleus are less characterized.

In vivo, the efficiency of electrotransfection has been demonstrated on a wide range of tissues including muscles, tumours, liver or skin (2). However some problems persist: if the level of expression is high in the muscle and spread to a lot of cells, in tumours this expression is much lower and heterogeneous in distribution. More over on dystrophic muscles the recovery after electrotransfection can be impaired. Therefore, understanding the molecular mechanisms of electropermeabilization will allow for a better efficiency and safety of the method and permit to adapt protocols for different tissues. Consequently, we are interested in studying those mechanisms at different levels from artificial membranes to single cells or cells organised in tissue.

The permeabilization to propidium iodide and the interaction of plasmid DNA with the plasma membrane is studied in vitro on CHO cells and on C2C12 mouse myoblasts. Those cells can be differentiated into myotubes to study the mechanism of electrotransfection on a muscle cell model.

Finally, we are using multicellular tumor spheroids (MCTS) to study the effect of the electric field on cells organised in tissue and as a model of tumour ex-vivo. Using two-photon excitation (TPE) and confocal microscopy, we plan to visualize the repartition of permeabilized cells in a spheroid subjected to electric pulses.

1. Golzio, M., Teissie, J., and Rols, M. P. (2002) Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1292-1297

2. Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., and Teissie, J. (1998) In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 16, 168-171

Poster N°21

Utilisation des introns de groupe II comme vecteurs site spécifiques de thérapie génique

Madeleine ZERBATO, Nathalie HOLIC-BARLET, Marie-Noëlle MONIER et Javier PEREA

Centre de recherches et d'applications sur les thérapies géniques. Genethon-CNRS-UEVE FRE 3087.
1, bis rue de l'Internationale 91002 Evry

Un des principaux problèmes auquel se heurte la thérapie génique actuellement est l'incapacité de cibler un site précis du génome lors d'un transfert de gène. De plus, la faible capacité des vecteurs viraux nécessite l'utilisation des transgènes sous forme d'ADNc et dépourvus des signaux cis-actifs de régulation de la transcription. L'expression est donc fortement influencée par le contexte chromatinien des cellules hôtes qui entoure chacune des copies du transgène. L'utilisation de nouveaux vecteurs, dont l'intégration puisse être ciblée, pourrait résoudre un grand nombre de ces problèmes.

Notre laboratoire s'intéresse à un élément mobile naturel qui est capable de reconnaître un site précis de transposition (« homing »). Il s'agit de l'intron de groupe II PI.LSU/2 situé dans le gène codant l'un des ARN ribosomiaux du génome mitochondrial de l'algue brune *Pylaiella littoralis*. La molécule impliquée dans le homing est l'intermédiaire d'épissage en forme de « lasso ». A la différence des autres introns de groupe II, l'intron PI.LSU/2 possède la particularité de s'épisser efficacement *in vitro* à des concentrations de magnésium proches de celles physiologiques, ce qui pourrait permettre son utilisation comme vecteur de thérapie génique. Nous souhaitons explorer la capacité de « homing » de cet intron dans des cellules humaines et la possibilité de changer sa cible originelle par une autre choisie par l'expérimentateur.

Une partie de ce projet concerne l'étude des activités biologiques *in vitro* de la protéine codée par l'intron PI.LSU/2. En effet, cette protéine comporte les domaines putatifs d'activité reverse transcriptase (RT), endonucléase (En) et maturase (X) ainsi qu'un domaine putatif de liaison à l'ADN (D). Afin de vérifier si cette protéine possède bien ces différentes activités, nous l'avons exprimée chez *Escherichia Coli* puis purifiée. Les premiers résultats concernant la mise en évidence de l'activité reverse transcriptase seront présentés dans le poster.

Poster N°22

RECOVERY OF CILIARY BEATING IN HUMAN AIRWAY EPITHELIAL CELLS MUTATED IN *DNAII* GENE AFTER LENTIVIRUS *EX VIVO* GENE THERAPY

Brigitte CHHIN (1), Didier NEGRE (2), Olivier MERROT (3), Yves TOURNEUR (4, 5), Denis RESSNIKOFF (5), Martine JASPERS (6), François-Loïc COSSET (2), Mark JORISSEN (6), Patrice BOUVAGNET (1, 7)

Laboratoire Cardiogénétique, EA 4171, Université de Lyon, Lyon, France (1); Université de Lyon, F-69000; INSERM, UU758, Human Virology Department, F-69007; Ecole Normale Supérieure de Lyon, F-69007; Université Lyon 1, F-69007, Lyon, France (2); Service ORL, Hôpital de la Croix-Rousse, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France (3); Laboratoire de Cardioprotection, INSERM U886, Lyon, France (4); Centre Commun de Quantimétrie (CCQ), Université de Lyon, Lyon, France (5); ENT department, Head and Neck Surgery, UZ GHB, Leuven, Belgium (6); Laboratoire Cardiogénétique, CBPE, Groupe Hospitalier Est, Hospices Civils de Lyon, Lyon, France (7).

Introduction: Primary Ciliary Dyskinesia (PCD) is a heterogeneous genetic disease which is characterized by axonemal abnormalities of respiratory cilia resulting in recurrent upper and lower respiratory tract infections. Recessive mutations in *Dynein Axonemal Intermediate chain type 1 (DNAII)* gene have been described in 10% of PCD cases.

Our long term aim is to develop gene therapy to alleviate respiratory symptoms of patients suffering from PCD. A first step is to demonstrate that *ex vivo* gene therapy of human airway epithelial cells (HAEC) from *DNAII* deficient patient rescue the cilia beating defect.

Material and methods: HAEC were cultured and infected by viral particles containing a lentiviral vector based on Simian Immunodeficiency Virus (SIV) pseudotyped with Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein (VSV-G). First, HAEC transduction efficiency was evaluated with a transgenesis vector containing *eGFP* (enhanced green fluorescent protein) gene. Then, *DNAII* cDNA alone and plus a hemagglutinin (HA) tag were inserted in this vector. Transcription was verified by RT-PCR. Proteins expression was evaluated by Western blot and immunofluorescence. Ciliary beating was recorded to determine ciliary beat frequency (CBF). Finally, axoneme ultrastructure was analyzed by TEM.

Results: HAEC were efficiently infected by lentiviral particles. *DNAII* or HA-tagged *DNAII* were transcribed and translated from the transduced constructs. After infection and culture of *DNAII* deficient HAEC, immotile cilia recovered a beating to reach a normal frequency. Finally, TEM axoneme analysis showed the presence of outer dynein arm which were totally missing in mock- and untreated *DNAII* deficient HAEC.

Conclusion: We demonstrated a transition from immotile cilia to normal ciliary beating after therapeutic gene transduction. Recovery of a ciliary beating by *DNAII* gene transfer constitute a conceptual proof, an indispensable preliminary step in the perspective of PCD's *in vivo* gene therapy.