UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 2011 Thèse n°

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

(Arrêté du 17 Juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement le 29 Juin 2011

Par

Monsieur NOBLET Jean-Baptiste

Né le 17 Janvier 1984

THERAPIE GENIQUE ET DOPAGE

COMPOSITION DU JURY :

Président: M. **BENEYTOUT** Jean-Louis	Professeur, Université de Limoges
Membres : M. **LIAGRE** Bertrand	Maître de Conférences, Université de Limoges
M. **PICARD** Nicolas	MCU-PH, Université de Limoges
Membre invité : M. **NOUAILLE** Yves	Praticien hospitalier, CHU Limoges
Directeur de thèse : M. **PICARD** Nicolas	MCU-PH, Université de Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine et de Pharmacie

Année 2011 Thèse n°

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

(Arrêté du 17 Juillet 1987)

Présentée et soutenue publiquement le 29 Juin 2011

Par

Monsieur NOBLET Jean-Baptiste

Né le 17 Janvier 1984

THERAPIE GENIQUE ET DOPAGE

COMPOSITION DU JURY :

Président: M. **BENEYTOUT** Jean-Louis	Professeur, Université de Limoges
Membres : M. **LIAGRE** Bertrand	Maître de Conférences, Université de Limoges
M. **PICARD** Nicolas	MCU-PH, Université de Limoges
Membre invité : M. **NOUAILLE** Yves	Praticien hospitalier, CHU Limoges
Directeur de thèse : M. **PICARD** Nicolas	MCU-PH, Université de Limoges

Professeurs à la faculté de Pharmacie-Médecine de Limoges

DOYEN DE LA FACULTE : Monsieur le Professeur Jean-Luc **DUROUX**

1er VICE-DOYEN : Madame Catherine **FAGNERE**, Maître de Conférences

2ème VICE-DOYEN : Monsieur Serge **BATTU**, Maître de Conférences

PROFESSEURS :

BENEYTOUT Jean-Louis	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
BOTINEAU Michel	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
BROSSARD Claude	PHARMACOTECHNIE
BUXERAUD Jacques	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CHULIA Albert	PHARMACOGNOSIE
CHULIA Dominique	PHARMACOTECHNIE
DELAGE Christiane	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DREYFUSS Gilles	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
OUDART Nicole	PHARMACOLOGIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

LACHATRE Gérard	TOXICOLOGIE
MOESH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
ROGEZ Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GYRI Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE

DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
ROUSSEAU Annick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE GENERALE ET MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

DREYFUSS Maire-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE

PROFESSEURS CERTIFIE :

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Nicolas PICARD Maître de Conférences et Praticien hospitalier pour avoir accepté de devenir directeur de cette thèse ainsi que pour ses compétences et sa disponibilité.

Je remercie également Mr Bertrand LIAGRE Maître de Conférences pour m'avoir fait l'honneur de participer à ce jury.

Un grand merci à Mr Jean-Louis BENEYTOUT Professeur de Biochimie pour avoir accepté la présidence de ce jury et pour l'ensemble de son enseignement consciencieux au cours de mes études.

Je remercie Mr Yves NOUAILLE Docteur et Responsable de l'Antenne Médicale de Prévention du Dopage (AMPD) du Limousin pour avoir souhaité juger cette thèse.

Mes remerciements vont ensuite à Mr Philippe DUMAS et Mr Hervé MOUTIER pour leur sympathie, leurs conseils avisés et leur confiance qu'ils m'ont accordée que ce soit lors du stage de 6ème année ou lors des mois d'été.

Je souhaite exprimer mes profonds remerciements à mes parents, ainsi qu'à mes deux sœurs pour leur soutien indéfectible aussi bien moral que matériel tout au long de mes études. Qu'ils me soit ici permis de souligner leur courage exemplaire dans l'épreuve, et la fierté qu'ils m'inspirent.

Je remercie aussi mon amour de toujours qui m'a soutenu durant l'élaboration de cette thèse et pour toute la joie, le bonheur et la tendresse qu'elle m'apporte chaque jour.

J'exprime mes salutations à mes amis qui chacun à leur manière, m'ont apporté l'oxygène et les moments de bonne humeur dont j'ai eu besoin durant mes années d'étude.

TABLE DES MATIERES

Professeurs. . . . . p. 2
Remerciements. . . . . p. 4
Table des matières. . . . . p. 5
Liste des figures. . . . . p. 7
Liste des abréviations. . . . . p 8
Introduction générale. . . . . p. 10

Partie I : Généralités sur la thérapie génique

I / Introduction. . . . . p. 13
II / Historique. . . . . p. 14
II.1) Les débuts de la thérapie génique. . . . . p. 14
II.2) La première réussite. . . . . p. 16
III / Le gène comme médicament. . . . . p. 18
IV / Les objectifs et les méthodes de la thérapie génique. . . . . p. 21
IV.1) Les pathologies visées. . . . . p. 21
IV.2) Les obstacles du transfert de gène . . . . . p. 23
IV.3) Les approches envisagées . . . . . p. 25
V / Les outils du transfert de gène. . . . . .p. 26
V.1) Les vecteurs de transfert de gène. . . . . p. 27
V.1.1) Les vecteurs viraux. . . . . .p. 27
V.1.1.1) Les vecteurs associés aux adénovirus. . . . . p. 28
V.1.1.2) Les rétrovirus dérivés du virus de leucémie murine. . . . . .p. 29
V.1.1.3) Les rétrovirus de type lentivirus. . . . . p. 30
V.1.1.4) Les adénovirus. . . . . p. 30
V.1.1.5) Les virus herpétiques. . . . . .p. 32
V.1.2) Les vecteurs synthétiques. . . . . p. 33
V.1.2.1) Les lipides cationiques. . . . . p. 34
V.1.2.2) Les polymères cationiques. . . . . p. 35
V.1.2.3) Les dendrimères. . . . . p. 36
V.2) Les méthodes physiques. . . . . p. 37
V.2.1) L'injection d'ADN nu plasmidique. . . . . .p. 37
V.2.2) La microinjection. . . . . p. 38
V.2.3) La biolistique ou « gene gun ». . . . . p. 39
V.2.4) L'électroporation. . . . . .p. 39
V.2.5) Les techniques parallèles. . . . . p. 40
V.3) Transfert de gène dans le muscle. . . . . .p. 40
V.3.1) Technique non virale prometteuse. . . . . p. 41
V.3.2) Technique non virale efficace. . . . . p. 41
VI / Conclusion. . . . . p. 43

Partie II : Du concept à l'utilisation détournée

I / Introduction. . . . . p. 45

II / Performance sportive liée au polymorphisme de gène. . . . . p. 46

III / Dopage génétique. . . . . .p. 49

IV / Cibles pour le dopage génétique . . . . . p. 51

IV.1) Application potentielle de transfert de gène. . . . . p. 51

IV.1.1) Myostatine et follistatine. . . . . .p. 51

IV.1.2) Hormone de croissance, GHRH et IGF-1. . . . . p. 54

IV.1.3) Facteurs de transcription de type Pax. . . . . p. 57

IV.1.4) Transporteurs du glucose et PPAR-δ. . . . . .p. 57

IV.1.5) EPO. . . . . p. 60

IV.1.6) Angiogenèse et *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF). . . . . .p. 62

IV.1.7) Gènes de réparation de fractures. . . . . .p. 63

IV.1.8) Gènes soulageant la douleur. . . . . p. 64

IV.2) Risques et effets indésirables pour la santé. . . . . p. 66

IV.2.1) Risques résultant de l'insertion de matériel génétique. . . . . p. 66

IV.2.2) Risques résultant de la manipulation génétique. . . . . p. 67

V / Détectabilité. . . . . .p. 68

V.1) Détection de segments génétiques typiques : ADN transgénique. . . . . .p. 69

V.2) Détection directe d'un gène inséré. . . . . .p. 71

V.3) Détection d'une activité génétique modifiée. . . . . .p. 72

VI / Conclusion. . . . . p. 73

Partie III : Situation actuelle des procédures d'interdiction et point de vue éthique

I / Introduction. . . . . p. 75

II / Le cadre international de lutte contre le dopage. . . . . p. 76

II.1) Efforts de réglementation. . . . . p. 76

II.2) Organismes de réglementation et modification génétique . . . . . .p. 76

II.2.1) Les premières recommandations. . . . . p. 77

II.2.2) Attitude actuelle. . . . . p. 78

III / Obstacles liés à l'interdiction de la modification génétique. . . . . p. 79

III.1) Difficultés de sanctions. . . . . .p. 79

III.2) Dilemme éthique. . . . . p. 80

III.3) Impact social. . . . . p. 81

IV / Conclusion . . . . . .p. 83

Conclusion générale . . . . . .p. 84

Annexes . . . . . .p. 86

Bibliographie . . . . . p. 98

Serment de Galien . . . . . p. 113

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Principe du premier essai de thérapie génique (1989) sur une patiente atteinte de déficit immunitaire par absence d'expression de l'adénosine désaminase (ADA) par les lymphocytesT. . . . . .p. 15

Figure 2 : Origine du déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X. . . . . .p. 17

Figure 3 : Répartition du pourcentage de protocoles par maladies. . . . . p. 21

Figure 4 : Obstacles, barrières et étapes majeurs qui jalonnent le transfert de gène. . . . . p. 24

Figure 5 : Voies d'administration et méthodes physiques du transfert de gène. . . . . p. 27

Figure 6 : Particule d'AAV non enveloppé de 18 à 25 nm de diamètre. . . . . .p. 28

Figure 7 : Structure d'un adénovirus. . . . . p. 31

Figure 8 : Représentation schématique d'un lipide cationique. . . . . .p. 34

Figure 9 : Structure chimique des branchements d'un dendrimère. . . . . p. 37

Figure 10 : Analyse histologique du muscle tibial antérieur de souris après application d'un champ électrique de 200 à 250 V/cm. . . . . .p. 42

Figure 11 : Représentation schématique de la biosynthèse de la myostatine. . . . . p. 52

Figure 12 : Synthèse et sécrétion de GH et d'IGF. . . . . p. 55

Figure 13 : Implication de PPAR-δ dans la régulation du développement et dans le métabolisme des lipides. . . . . p. 59

Figure 14 : Principe de la spiPCR. . . . . p. 70

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AAV : *Adeno-Associated Virus*

ACE : *Angiotensin Converting Enzyme*

ACTIIB : Récepteurs des Activines de Type II B

ADA : Adénosine Désaminase

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADNt : ADN transgénique

AMA : Agence Mondiale Anti-dopage

Ang : Angiotensine

ARN : Acide Ribonucléique

$ATCN_3$: Alpha Actinine 3

B

BMP : *Bone Morphogenetic Proteins*

C

CIO : Comité International Olympique

D

D : Délétion

DICS : Déficit Immunitaire Combiné Sévère

DICS-X : Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié au chromosome X

DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne

E

EPO : Erythropoïétine

F

FDA : *Food and Drug Administration*

FGF : *Fibroblast Growth Factor*

FGF-1 : *Fibroblast Growth Factor-1*

G

GH : *Growth Hormone*

GHRH : *Growth Hormone-Releasing Hormone*

GLUT : *Glucose Transporters*

H

HSV : Herpès simplex virus

HSV-1 : Herpès Simplex Virus de type 1

HIF-1α : *Hypoxia Inductible Factor*

I

I : Insertion

IGF-1 : *Insulin-like Growth Factor-1*

IM : Intramusculaire

K

Kb : Kilobase

M

MGF : *Mechano Growth Factor*

MLV : *Murine Leukemia Virus*

P

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PEI : Polyéthylèneimine

PPAR-δ : *Peroxisome Proliferated-Activated Receptor-delta*

S

SIDA : Syndrome d' Immunodéficience acquise

spiPCR : *Primer-internal Intron-Spanning* PCR

T

TGF : *Transforming Growth Factor*

V

VEGF : *Vascular Endothelial Growth Factor*

µm : Micromètre

INTRODUCTION GENERALE

Il y a une trentaine d'années, le concept de thérapie génique a été imaginé à des fins médicales de manière à mettre en application les nouvelles connaissances de biologie moléculaire et génétique. Le but de la thérapie génique est de soigner ou prévenir les maladies en se servant du gène comme médicament. En pratique, cela consiste à introduire du matériel génétique dans les cellules somatiques voire germinales afin de corriger le dysfonctionnement d'un gène altéré ou absent, ou de pallier au manque d'une protéine en ajoutant le gène responsable de sa synthèse.

Cette nouvelle approche de traitement des pathologies traduit un important changement dans les stratégies thérapeutiques et ouvre de nouvelles perspectives pour des maladies incurables dont la cause peut être traitée en plus des symptômes. Le domaine d'application de la thérapie génique concerne non seulement des maladies génétiques mais aussi des maladies acquises.

Cependant, les premiers essais cliniques de thérapie génique chez l'homme dans le traitement de déficits immunitaires sévères (DICS) ont révélé des difficultés d'obtenir une méthode de thérapie génique fiable et sans danger pour l'homme. C'est la raison pour laquelle de grands efforts ont été accomplis ces dix dernières années pour parvenir à un transfert de gène efficace et durable en mettant au point des vecteurs viraux et synthétiques.

Alors que la thérapie génique constitue un pas en avant prometteur dans la recherche médicale, son mésusage pourrait bientôt fournir aux sportifs les moyens d'améliorer leurs performances sportives. Cette possibilité d'utilisation abusive des technologies génétiques ont attiré l'attention des représentants d'organismes internationaux de réglementation mais aussi de différents domaines de la génétique et des sciences sociales.

Ainsi, plusieurs rapports et études ont soulevé différentes questions : Quel sera l'impact des avancées récentes de la thérapie génique sur le sport de haut-niveau ? Peut-on penser que le « dopage génétique » devienne une réalité de demain connaissant les applications actuelles de transfert de gène ? Quels résultats la recherche a-t-elle apporté en matière de connaissance des risques et de méthodes de détection de manipulation génétique ? Quelles sont les priorités de la communauté anti-dopage ?

Pour répondre à ces questions, nous allons tout d'abord décrire les objectifs et les outils de transfert de gène, puis définir la notion de « dopage génétique » en montrant l'intérêt potentiel des vecteurs et des voies d'administration appliquées à différentes cibles biologiques, et enfin nous expliquerons le rejet alarmiste du « dopage génétique », provoquant la mise en place de procédures d'interdiction étroitement liées à un contexte éthique et social.

PARTIE I

Généralités sur la thérapie génique

I / Introduction

La thérapie génique, débutée il y a une trentaine d'années, repose sur l'introduction de matériel génétique tels que l'ADN ou l'ARN dans des cellules cibles d'un patient dans le but d'obtenir un effet thérapeutique. Le concept initial de la thérapie génique consistait en la compensation de gènes dont l'altération était responsable de maladies génétiques.
Par la suite, ce concept a évolué vers l'utilisation du gène comme nouveau type de médicament applicable évidemment à des maladies génétiques et plus généralement à toutes sortes d'affections héréditaires ou acquises.

C'est ainsi que de nombreuses approches ont été envisagées en fonction de l'effet désiré, avec comme exemple, celle du transfert d'une copie fonctionnelle du gène muté, ou bien celle de la correction *in situ* du gène muté ou encore celle de la modification de l'épissage d'Acide Ribonucléique Messager (ARNm) de façon à restaurer la protéine manquante. Bien que la thérapie génique soit née avec l'idée de traiter des pathologies héréditaires, elle s'est rapidement étendue à d'autres champs d'applications dont le traitement de maladies acquises ou le développement de vaccins à ADN.

Les difficultés rencontrées par les thérapeutiques conventionnelles et l'augmentation constante des coûts de développement des médicaments rendent les produits de thérapie génique compétitifs. En effet, la production à grande échelle de protéines recombinantes coûte très chère pour une efficacité qui reste limitée par une élimination rapide. De plus, les traitements utilisant ces protéines nécessitent des injections à forte dose qui doivent être répétées dans le temps, entraînant des effets indésirables voire une certaine toxicité. La thérapie génique permet quant à elle, une production (*in vivo)* à long terme et potentiellement régulée de protéine thérapeutique avec une expression localisée du transgène.

Même si la thérapie génique présente de nombreux atouts, son approche en est encore à un stade expérimental montrant de nombreuses difficultés pour demeurer fiable. C'est pourquoi le développement d'une thérapie génique sûre et efficace passe par la connaissance des outils permettant le transfert du gène médicament au sein des cellules.
Malgré les succès obtenus dans certains essais cliniques, un travail important reste encore à accomplir avant de pouvoir obtenir une utilisation courante chez l'homme.

II / Historique

II.1) Les débuts de la thérapie génique

La thérapie de génique, en tant que réparation ou modification du patrimoine génétique pour traiter une maladie, est évoquée par la communauté scientifique sur un plan théorique à la fin des années 1960 [1]. Cependant, le savoir-faire technologique ne permet pas encore la mise en pratique de ce projet.

La thérapie génique est réellement née suite aux progrès extraordinaires de la génétique à partir des années 1970. A cette époque sont apparus les premiers outils du « génie génétique » : techniques d'amplification de *Polymerase chain reaction* (PCR) et de clonage moléculaire, enzymes de restriction permettant de couper à un endroit précis, appelé site de reconnaissance, un fragment d'ADN réintroduit par la suite dans un autre fragment d'ADN. Le génome humain devenait enfin accessible à une analyse détaillée [2].

L'amélioration des connaissances concernant les liens entre certains gènes mutés et certaines maladies, la création de systèmes de transfert de gène à partir de virus sécurisés et l'amélioration des technologies de manipulation de l'ADN ont été regroupées sous le terme de biotechnologies et ont permis d'entreprendre une première expérience, aux Etats-Unis, menée par le Professeur Martin Cline sur deux patients atteints de thalassémie au stade terminal. Malheureusement cette première expérience échoua et fut décriée de part ces manquements à l'éthique médicale. Le Professeur Cline perdit son autorisation de pratiquer la médecine et fut banni de la communauté scientifique.

Il faut attendre la fin des années 1980 pour pouvoir parler de succès partiel de thérapie génique avec la réalisation du tout premier essai clinique (Figure 1) initié par S.Rosenberg, F.Anderson et M.Blaese, sur une Américaine de quatre ans, atteinte d'une maladie génétique qui provoquait un effondrement total de ses défenses immunitaires. Cette déficience, due à l'absence d'une enzyme, l'adénosine désaminase (ADA), nécessitait le maintien de l'enfant dans un environnement totalement stérile, en attendant une greffe de moelle ou, comme ce fut le cas, une « greffe génétique ». Cette petite fille reçut une greffe de ses propres lymphocytes T dans lesquels avait été introduit le gène permettant de produire l'enzyme dont elle était dépourvue.

La modification génétique de ses lymphocytes fut effectuée au moyen d'un vecteur rétroviral dérivé du *Murine Leukemia Virus* (MLV) exprimant le gène de l'ADA. Le fait d'injecter à la fillette ses propres lymphocytes T a permis d'écarter les problèmes de rejets de greffe. Cependant, l'expression du gène transféré s'est montrée très fugace, imposant des injections répétées.

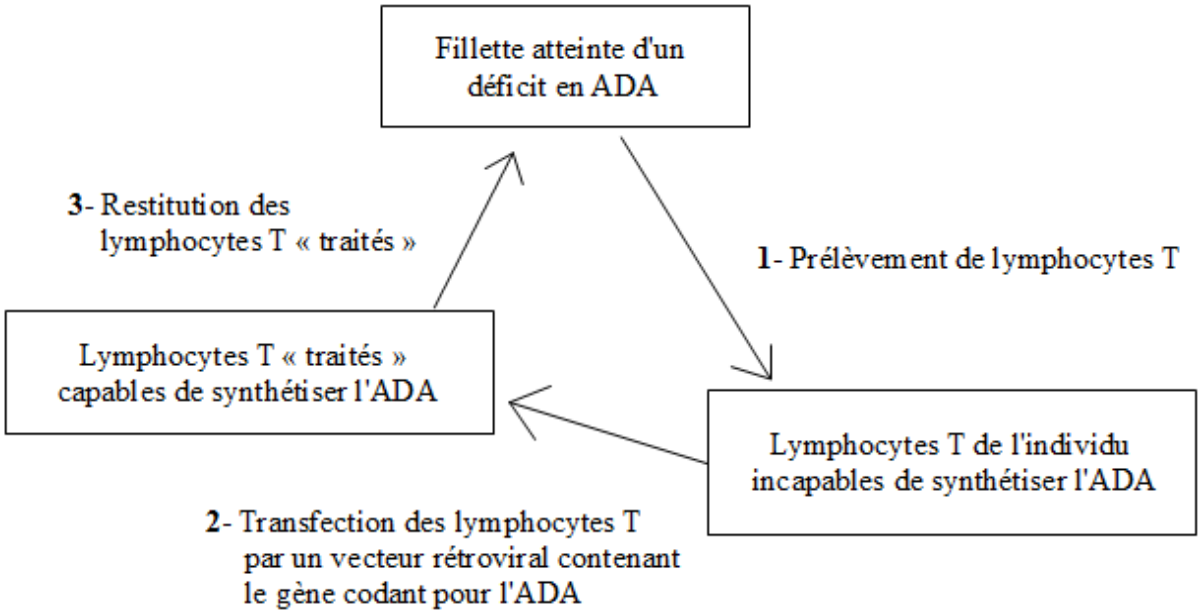


Figure 1 : Principe du premier essai de thérapie génique (1989) sur une patiente atteinte de déficit immunitaire par absence d'expression de l'adénosine désaminase (ADA) par les lymphocytes T.

Cette percée a permis le développement d'une multitude d'essais cliniques dès les années 1990 pour des maladies aussi diverses que le cancer, les maladies cardio-vasculaires, les infections virales, les immunodéficiences héréditaires [3, 4]. Ces approches innovantes sont apparues alors comme une nouvelle étape fondamentale dans l'histoire de la médecine. En effet, elles permettaient d'envisager de traiter directement les causes de la maladie plutôt que de s'attaquer seulement aux symptômes. Ces avancées se sont associées à un engouement majeur du public et à des investissements dans le domaine des biotechnologies au début du XXIème siècle, notamment grâce au Téléthon.

Néanmoins, face à des industriels et à des patients avides de résultats positifs immédiats, et desservie par une communication faisant peu la part des choses entre la réalité du terrain et les hypothèses, la thérapie génique s'est rapidement confrontée à un constat d'échec. En effet, aucun bénéfice réel n'a été observé pour les 4000 patients jusque là inclus dans les essais. Cela a inévitablement conduit les capitaux-risqueurs à se désengager du projet et la thérapie génique a du amorcer son entrée dans le XXIème siècle accompagnée de la méfiance de beaucoup concernant son réel potentiel en génétique médicale.

II.2) La première réussite

Le premier succès probant de thérapie génique remonte à 1999. L'équipe du Professeur Alain Fisher de l'unité INSERM U429 de l'hôpital Necker de Paris envisagea le traitement des enfants atteints d'un déficit immunitaire grave : le Déficit Immunitaire Combiné Sévère lié au Chromosome X (DICS-X) [5]. Ces « enfants bulles » ne devaient pas être en contact avec le moindre antigène car leur organisme était incapable de résister aux infections, mêmes légères, dues aux divers agents pathogènes, bactéries et virus, présents dans l'environnement normal. Ils étaient par conséquent confinés dans des enceintes hospitalières sous atmosphère stérile. Cette maladie héréditaire touche exclusivement les garçons et concerne environ un garçon sur 300 000. Les lymphocytes T et les cellules *Natural killer* (NK) ne sont pas produits car leurs cellules souches, dépourvues des récepteurs gamma *c* et gamma *yc* pour deux cytokines, sont incapables de se différencier et de se multiplier (Figure 2). La maladie est létale durant la première année de vie en l'absence de moelle osseuse allogénique [6].

L'absence de récepteur fonctionnel pour l'Interleukine de type 2 (IL2) a pour conséquence une absence de différenciation des cellules souches lymphoïdes en lymphocytes, la transduction du signal ne pouvant s'effectuer.

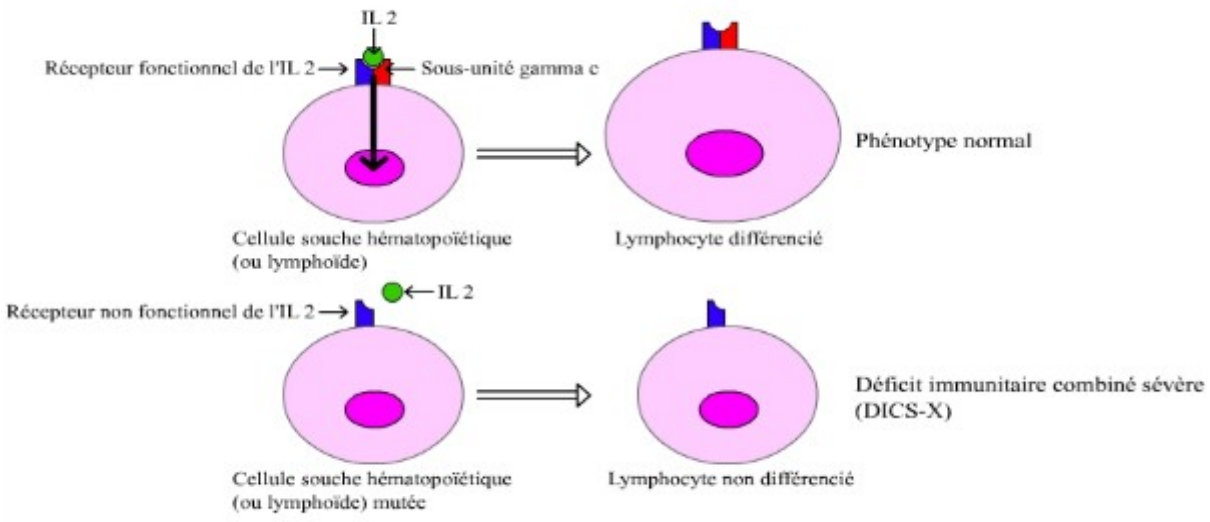


Figure 2: Origine du déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X.
D'après IBARRANDO F. *Vers une nouvelle voie de thérapie génique* [en ligne].[s.l.] : CAMUS G., [s.d]. Disponible sur <http://www.snv.jussieu.f r/vie/dossiers/therapie_genique/>. (consulté le 13.02.2011)

Dix patients ont été traités par transfert *ex vivo* du gène *yc* au niveau des précurseurs médullaires $CD34^+$ à l'aide d'un vecteur rétroviral de souris. Une fois modifiées, les cellules souches ont été réinjectées aux patients par voie sanguine. Une correction stable du déficit immunitaire a été obtenue chez huit d'entre eux, permettant ainsi à ces enfants de vivre et de se développer normalement dans un environnement non protégé.

Néanmoins, la survenue d'une complication sévère chez un des enfants traités a soulevé la question des risques inhérents à cette approche de thérapie génique. En effet, près de trois ans après le traitement, ce dernier développa une prolifération clonale de lymphocytes T différenciés, ou leucémie [7]. En janvier 2003, un second cas de leucémie fut découvert chez un autre enfant. Ceci nécessita la mise en place d'un traitement par chimiothérapie, suivi d'une allogreffe de moelle osseuse. Une rémission complète a aisément été obtenue chez l'un d'eux, alors que le deuxième patient décéda de ses complications.

III / Le gène comme médicament

La décision de recourir à la thérapie génique suppose avant tout que la sévérité de la maladie réclame un traitement et que les traitements connus soient inefficaces ou difficilement envisageable comme dans le cas des DICS qui nécessite une allogreffe provenant d'un donneur de la famille porteur d'antigènes *Human Leucocyte Antigens* (HLA) identiques. L'autre condition est une connaissance parfaite de la physiopathologie de la maladie à traiter.

Actuellement, on dénombre environ 4000 maladies d'origine génétique. La plupart de ces maladies sont rares et n'affectent que très peu de personnes. Ces maladies dites orphelines n'ont, dans la majorité des cas, aucun traitement curatif.

Parallèlement aux thérapies conventionnelles, qui traitent les symptômes des maladies génétiques, le concept de thérapie génique consiste à traiter la base de l'anomalie génétique en utilisant le gène comme médicament. Cette thérapie a de nombreux avantages par rapport à l'administration répétée de protéines recombinantes utilisées notamment dans le cas de l'hémophilie ou du diabète. Le gène directement inséré dans la cellule permet, en théorie, une production continue de la protéine, et ainsi des effets thérapeutiques sur une période plus longue, avec moins d'effets secondaires par rapport à l'administration répétée de protéines recombinantes.

Depuis plusieurs années, de nombreuses équipes de recherche dans le monde se mobilisent pour expérimenter et évaluer les applications de la thérapie génique dans de nombreuses maladies génétiques héréditaires, mais également acquises (cancer, Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA), maladies neurodégénératives). Néanmoins le succès de cette thérapie repose en grande partie sur l'efficacité et le bon choix de vecteur pour le transfert du gène médicament ou transgène vers son site d'action.

Un premier niveau d'exigence concerne la production des vecteurs. Les principaux tests réalisés pour les vecteurs viraux et plasmidiques ont pour but de vérifier l'identité du produit, sa pureté, sa concentration et sa stabilité. Les lieux de production et de contrôle de ces vecteurs sont soumis à une réglementation stricte précisant les conditions de fonctionnement et de confinement ainsi que les mesures de protection prises pendant et après la fabrication. Par ailleurs, en plus de ces mesures de sécurité il est nécessaire de savoir si le transfert de gène vers son site d'action sera efficace, avec comme idéal le fait qu'il traverse efficacement et sans dégradation les barrières biologiques jusqu'au noyau, et qu'il s'insère en lieu et place du gène défaillant.

Le but de la thérapie génique est donc d'insérer un gène médicament dans une cellule afin qu'il exprime une protéine. Selon le type de cibles cellulaires, on distingue la thérapie des cellules germinales et la thérapie des cellules somatiques.

La « génothérapie » germinale consiste à introduire un gène dans les cellules de la lignée germinale d'un individu afin de transmettre ce gène à sa descendance, ou bien encore de modifier de façon précoce le génome d'un embryon. Cette thérapie est inapplicable à l'homme en France pour des raisons éthiques comme le précise la loi de bioéthique du 29 juillet 1994 relative au respect du corps humain. Cependant il n'existe aucune réglementation limitant la thérapie génique germinale ou l'utilisation d'embryons humains aux Etats-Unis pour autant que ces techniques obtiennent l'autorisation de la *Food an Drug Administration* (FDA) [8].

La « génothérapie » somatique consiste à obtenir une correction phénotypique d'un groupe de cellules par l'expression d'un transgène, sans pour autant toucher au patrimoine génétique germinal. Cette thérapie est acceptée au niveau international, avec un encadrement et des procédures de contrôle variant d'un pays à l'autre. En France, tout protocole d'essai clinique doit passer devant la Commission Consultative pour la Protection des Personnes se prêtant à la Recherche Biomédicale (CCPPRB). L'avis de cette commission est ensuite transmis à l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé (AFSSAPS) qui autorise le protocole et peut le suspendre selon l'avis d'experts.

Les essais cliniques dans le domaine de la thérapie génique relèvent, en général, des phases I et II. Une particularité dans ce domaine est que les essais de phase I se font chez des malades et non des sujets sains, qu'ils sont sans bénéfice direct et qu'ils ont pour objectif d'évaluer la sécurité d'emploi du produit. Les essais de phase II étudient l'activité à court terme du produit et permettent de préciser la posologie appropriée. Ces deux types d'essais sont souvent combinés. Les essais de phase III en thérapie génique sont plus rares parce que l'étape de phase II est difficile à franchir dans beaucoup de cas. Ils restent toutefois indispensables pour confirmer les propriétés thérapeutiques et apprécier l'efficacité en comparaison avec les traitements en vigueur. La plupart des études cliniques entreprises jusqu'à présent sont monocentriques. Les essais cliniques multicentriques dans le domaine de la thérapie génique sont malheureusement encore trop rares, sinon exceptionnels.

Un travail scientifique colossal de recherche de cartographie du génome humain a permis d'établir depuis 1990 de nombreuses cartes de liaisons génétiques de caractères [9]. En avril 2003, 99% du génome fut identifié, représentant alors un immense potentiel d'accumulation de données, à condition de transformer les gènes en médicaments et de les insérer efficacement dans les cibles cellulaires [10]. Cependant, de nombreux obstacles ralentissent le cheminement vers une thérapie génique fiable et efficace.

Les exemples sont nombreux avec notamment la grande diversité de pathologies, qui nécessite une application au cas par cas de la thérapie, ainsi que la fragilité et l'incapacité du gène à subsister dans les milieux biologiques ou à traverser les membranes cellulaires de part sa nature polyanionique, et enfin, le manque d'efficacité vers un organe ou un type cellulaire. Malgré les nombreuses approches envisagées, la thérapie génique est ainsi tributaire d'un système gène/vecteur fiable qui permettra au transgène de migrer vers sa cible cellulaire afin de s'exprimer efficacement et durablement.

IV / Les objectifs et les méthodes de la thérapie génique

IV.1) Les pathologies visées

La thérapie génique est une méthode ambitieuse de traitement qui peut s'appliquer à un grand nombre de maladies, l'importante série d'essais cliniques engagés dans le monde en est la preuve [11] (Figure 3). Contrairement à l'idée que la thérapie génique soit seulement indiquée pour soigner des maladies héréditaires, les 2/3 des protocoles concerne des maladies acquises telles que les cancers (mélanome, glioblastome, cancers du poumon, du colon, de l'ovaire, de la thyroïde, du foie, de la tête et du cou) (Cf. Annexe 1). Malgré la multitude des méthodologies mises en œuvre et des gènes transduits, aucun succès réel aboutissant à la guérison du patient n'a été jusqu'à présent obtenu.

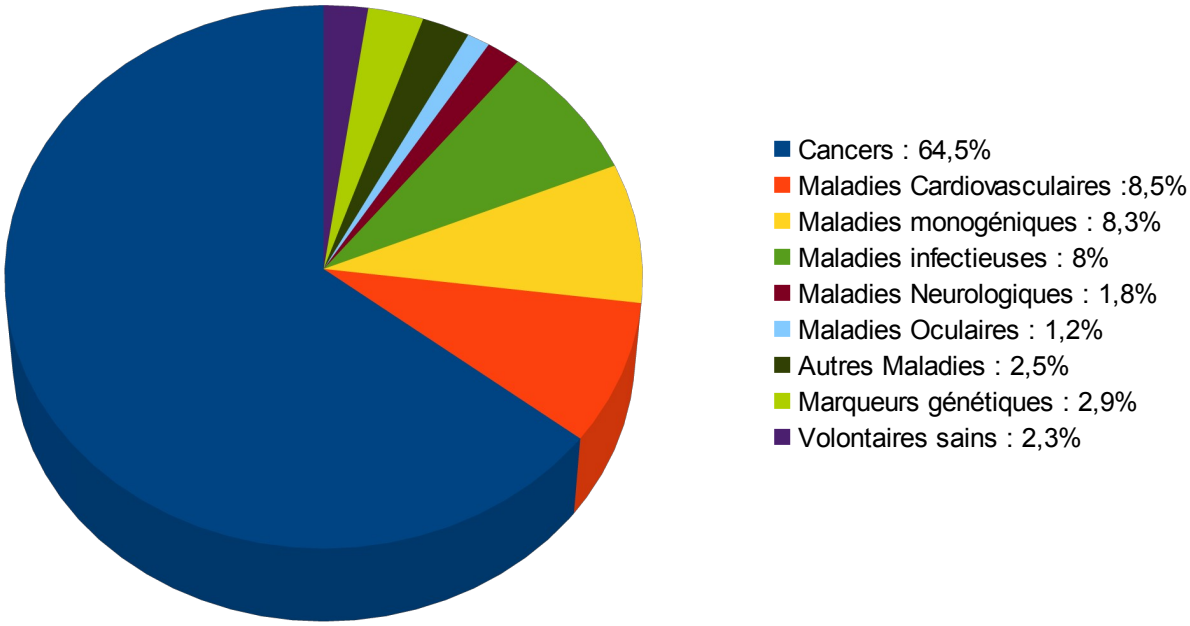


Figure 3 : Répartition du pourcentage de protocoles par maladies.

Les essais cliniques effectués ces dix dernières années montrent qu'une des causes essentielles des échecs de la thérapie génique est la faible efficacité du transfert, la brièveté de l'expression du transgène et la difficulté, dans les maladies polygéniques, de définir le meilleur gène cible.

C'est donc une des raisons pour lesquelles les principales indications de la thérapie génique sont les situations où ces problèmes peuvent être résolus : maladies héréditaires monogéniques avec déficit fonctionnel dont le gène muté responsable est connu, besoin limité en protéine manquante de sorte que la guérison est obtenue même lorsque la synthèse codée par le transgène est peu importante, cas où la population cellulaire transduite va acquérir un avantage sélectif par rapport aux autres cellules lui permettant de se multiplier.

Le traitement du DICS lié au chromosome X de l'enfant est un bon exemple réunissant beaucoup de conditions théoriques de succès. Un bénéfice clinique a pu être obtenu avec la guérison de ces « enfants bulles » même si certains d'entre eux ont développés des leucémies à la suite de l'activation d'oncogènes provoquée par l'insertion du transgène.

En contraste avec ce succès, de nombreux échecs sont survenus dans le traitement d'autres maladies héréditaires monogéniques. Dans la mucoviscidose, la faible longévité des cellules épithéliales bronchiques transduites avec le gène *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator* (CFTR) et l'absence de récepteurs des adénovirus sur ces cellules, a rendu l'expression du transgène trop faible pour obtenir la guérison.

Des progrès significatifs ont été obtenus chez des malades atteints de l'hémophilie de type A ou de type B. La réalisation de ce traitement a été envisagée par injection *in vitro* du gène codant pour le facteur VIII et le facteur IX dans le péritoine. L'une des raisons principales invoquée pour le succès de la thérapie génique dans ce traitement est la faible variabilité d'accroissement de la concentration plasmatique des facteurs en cause. Cette approche reste suffisante pour prévenir les hémorragies [12] même si la concentration de facteur VIII circulant n'atteint pas plus de 1% de sa valeur normale.

D'autres maladies sont ou ont été traitées au cours d'essais cliniques ou expérimentaux lorsqu'elles ont été considérées comme de bonnes candidates. C'est le cas du nanisme hypophysaire par défaut de sécrétion de l'hormone de croissance. Le gène de l'érythropoïétine a été également utilisé pour apporter le supplément nécessaire d'hormone au traitement de l'anémie de l'insuffisance rénale chronique et de la β-thalassémie.

Enfin, les maladies cardiovasculaires représentent un groupe de maladies non négligeables qui ont suscité des essais de thérapie génique. Le but a été de favoriser la revascularisation dans les maladies ischémiques comme l'artérite des membres inférieurs ou l'infarctus du myocarde par transfert de gène de facteurs de croissance tels le *Fibroblast Growth Factor* de type 1 (FGF-1) ou le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) [13]. La construction porteuse du transgène est administrée dans le muscle squelettique, dans le myocarde ou dans la circulation coronarienne. Ces techniques sont justifiées lorsque les autres solutions thérapeutiques sont impossibles ou inefficaces. D'autres essais ont été réalisés en vue de la prévention des accidents cardio-vasculaires de survenue précoce chez les malades atteints de dyslipidémies en manipulant le gène du récepteur des *Low Density Lipoprotein* (LDL) ou de l'Apolipoprotéine A-1 (ApoA-1) afin de réduire la fraction athérogène des lipoprotéines ou d'augmenter leur fraction protectrice.

IV.2) Les obstacles du transfert de gène

L'utilisation du gène comme médicament implique la connaissance des nombreux processus, peu habituels en pharmacologie conventionnelle. Il faut tenir compte de son expression au sein de la cellule sous forme de protéines thérapeutiques.

Dans l'optique d'une utilisation thérapeutique *in vitro*, le gène médicament peut être amené vers sa cible de deux manières : par voie systémique avec injection intraveineuse ou intra-artérielle ou par injection directe dans un tissu ou une tumeur cible. Cependant, l'ADN est susceptible d'être dégradé dans l'organisme et sa nature polyanionique ainsi que sa taille l'empêchent de pénétrer passivement dans les cellules. Par conséquent, pour ces deux voies d'administration, des obstacles physiologiques majeurs peuvent limiter la pénétration de l'ADN dans la zone cible. Afin de les contourner, le gène doit être associé à un système capable de le compacter, de le protéger des agressions du milieu biologique dont les nucléases et de le véhiculer au travers des différentes barrières physiologiques vers son site d'action. Enfin, le complexe vecteur/gène doit adhérer aux cellules, pénétrer dans celles-ci et délivrer le gène dans le noyau cellulaire. Il doit si possible cibler les tissus ou les cellules en dysfonctionnement et non les cellules saines. Ce système de vecteur est l'outil indispensable au succès de la thérapie génique.

Si l'utilisation de vecteurs de gènes a largement contribué au succès et au développement médical de transfert de gène, le transfert optimal du gène reste encore tributaire de nombreux obstacles. Cette méthode ne peut donc être fiable et efficace que si ces vecteurs s'affranchissent de ces nombreuses barrières. Les différents obstacles et étapes majeurs qui jalonnent le transfert de gène ont été identifiés et peuvent être résumés de la façon suivante (Figure 4). Les principales solutions proposées en réponse sont de faciliter le trafic extracellulaire du système de transfert de gène de son site d'administration vers la cellule cible et de faciliter la reconnaissance spécifique du système de transfert de gène par sa cellule cible.

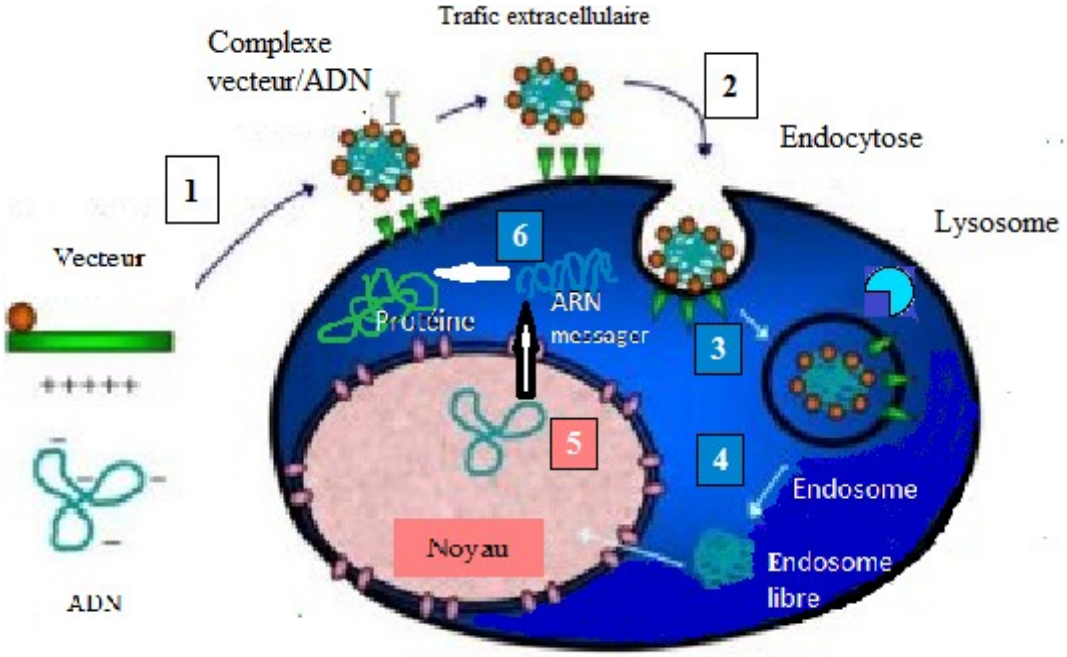


Figure 4 : Obstacles, barrières et étapes majeurs qui jalonnent le transfert de gène.

Légende :

1. <u>Adsorption sur la membrane cellulaire :</u> L'étape d'adsorption du complexe vecteur/gène présentant un excès de charges positives sur la membrane des cellules met en jeu des interactions non spécifiques de type électrostatique. L'acheminement du complexe vers la cellule est réalisé par voie systémique ou injection locale.

2. <u>Internalisation du complexe et formation de l'endosome :</u> La principale voie d'internalisation est l'endocytose mais la phagocytose ou encore d'autres voies comme les *caveolae* peuvent aussi intervenir. L'efficacité de l'une ou de l'autre voie semble dépendre de plusieurs paramètres tels que la taille des complexes et la nature des cellules.

3. Fusion de l'endosome avec les lysosomes : L'ADN doit sortir de l'endosome avant qu'il n'y ait fusion de la vésicule avec des lysosomes.

4. Transport cytosolique : Une fois relargué dans le cytosol, l'ADN doit encore faire face à deux problèmes majeurs, d'une part résister à la dégradation par les nucléases ou par d'autres systèmes de dégradation, et d'autre part pouvoir atteindre le noyau.

5. Import nucléaire : L'ADN, complexé ou non, doit pénétrer dans le noyau afin qu'il puisse y avoir expression du transgène. Cette pénétration peut se faire soit pendant la division cellulaire soit à travers le pore nucléaire laissant passer de petites molécules < 120 nm.

6. Transcription : Une fois dans le noyau, le plasmide peut soit rester sous forme épisomale soit s'intégrer dans le génome même si une seule minorité de cellules exprime le gène de façon stable.
   La transcription peut être inhibée par la présence de l'agent transfectant dans le noyau.

IV.3) Les approches envisagées

A côté des expérimentations *in vitro* de transfert de gène dans les cellules en culture, de nombreuses approches existent pour introduire un transgène chez un patient. Les stratégies les plus courantes sont les méthodes *ex vivo* et *in vivo*.

La méthode *ex vivo* est basée sur la technique de transplantation cellulaire et celle-ci est applicable à tous types de tissus transplantables. Elle consiste à prélever des cellules cibles chez un patient, à les cultiver de manière appropriée et à les traiter dans les conditions de culture cellulaire avec la combinaison transgène/vecteur [14]. Les cellules ainsi transfectées sont réimplantées chez le patient. Cette méthode s'est révélée efficace pour transfecter de nombreux types cellulaires tels que les hépatocytes, les kératinocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes [15]. C'est la technique la plus couramment utilisée dans les essais cliniques. Elle a notamment été utilisée pour le traitement des déficits immunitaires sévères chez les « enfants bulles ». Par ailleurs, elle permet de s'affranchir de nombreux obstacles lors du trafic extracellulaire du vecteur lorsqu'il est administré *in vivo*.

Néanmoins, cette approche reste compliquée et coûteuse, de part les différentes technologies employées allant de la chirurgie à la culture cellulaire.

L'approche *in vivo* consiste à administrer directement le gène médicament au patient. Cette technique permet d'injecter, par les voies d'administration systémique et locale ainsi que par différentes méthodes, le gène seul ou en association avec un vecteur. Toutefois, l'efficacité de cette méthode est fortement compromise par les multiples barrières physiologiques que doit franchir le transgène pour atteindre sa cible. De plus, l'expression du gène est souvent diffuse surtout lors d'une injection par voie systémique ou, au contraire, localisée au niveau du site d'injection. Par ailleurs, elle est souvent transitoire et nécessite des injections répétées. La fiabilité de cette technique est donc tributaire d'un système qui puisse véhiculer le gène thérapeutique de manière efficace à son site d'action.

V / Les outils de transfert de gène

Actuellement, on distingue deux grandes familles de systèmes de vectorisation de gènes : les vecteurs viraux et, les vecteurs non viraux. La barrière entre ces deux familles tend à s'estomper, car on observe progressivement l'apparition de vecteurs hybrides possédant à la fois des structures virales et non virales [16]. Parallèlement à ces deux familles, il existe des méthodes physiques originales. Ces différents vecteurs ainsi que leurs modes d'administration et les différentes méthodes physiques, sont récapitulés dans le schéma suivant [17] (Figure 5).

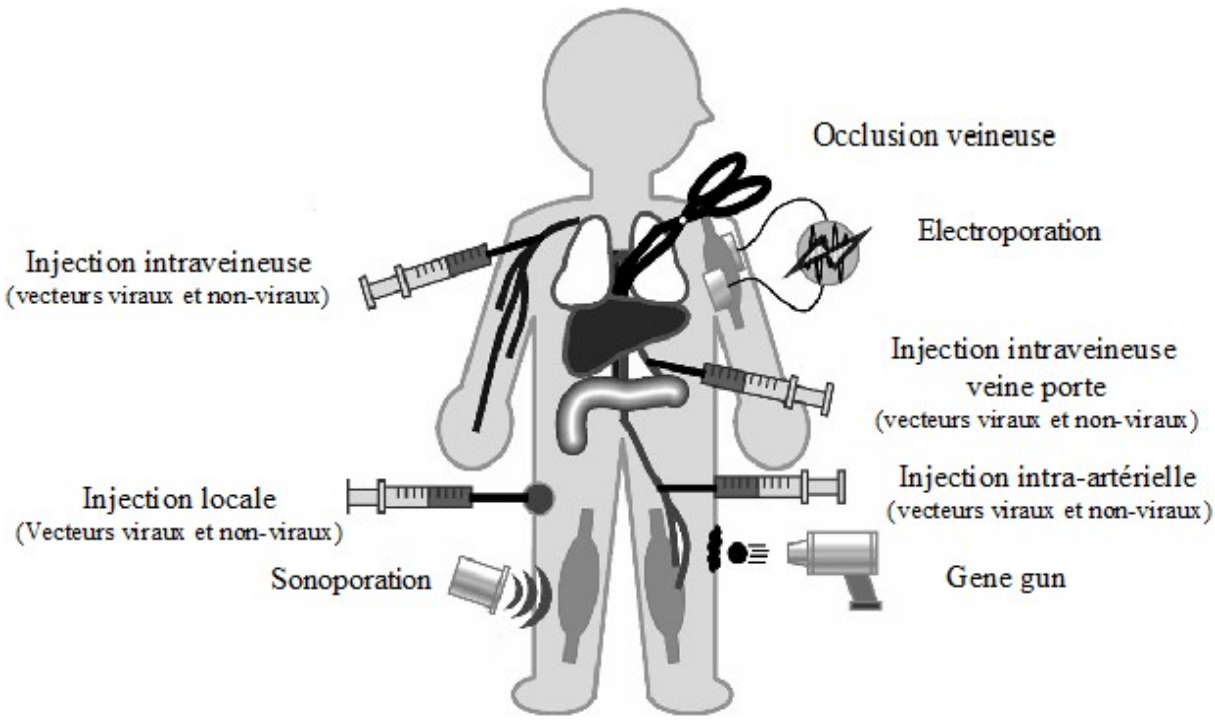


Figure 5 : Voies d'administration et méthodes physiques du transfert de gène.

V.1) Les vecteurs de transfert de gène

V.1.1) Les vecteurs viraux

Les virus constituent des outils de choix pour la thérapie génique. Ils ont été les premiers a pouvoir faire pénétrer, de manière spécifique et efficace, de l'acide nucléique dans de multiples cellules [18]. Ils ont aussi la capacité de pouvoir infecter d'autres cellules après s'être multipliés par expression de leur patrimoine génétique.

Cependant, tous les protocoles de thérapie génique n'utilisent pas ce type de vecteurs car la plupart d'entre eux sont pathogènes pour l'homme. C'est pourquoi le génome des virus est modifié afin d'obtenir des vecteurs non pathogènes après suppression des séquences infectieuses. Les virus conservent malgré tout leurs nombreuses structures qui leurs permettent d'infecter les cellules grâce aux protéines de l'enveloppe fusogène.

Différents vecteurs viraux sont utilisés pour des applications *in vivo* selon le type de tissus ou de cellules ciblées [19]. Ils peuvent être classés en deux groupes : d'une part ceux qui intègrent leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule hôte tels que les virus adénoassociés et les rétrovirus, et d'autre part ceux qui ne l'intègrent pas comme les adénovirus et les virus herpétiques.

V.1.1.1) Les vecteurs associés aux adénovirus

Les vecteurs *Adeno-Associated Virus* (AAV) font partie de la famille des parvovirus. Ils sont non enveloppés, de petite taille, et possèdent une molécule d'ADN à simple brin (Figure 6). Ils diffusent donc mieux dans les tissus, ils résistent à des conditions extrêmes de pH et de température. Ces virus sont largement présents dans les populations humaines et sont non pathogènes. Ils tirent leur nom du fait qu'ils ont besoin de l'aide d'un autre virus comme celui de l'adénovirus ou du virus herpétique, afin d'accomplir leur cycle complet de réplication. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules cibles latentes ou en prolifération. Les vecteurs AAV semblent conjuguer les avantages des rétrovirus et des adénovirus.

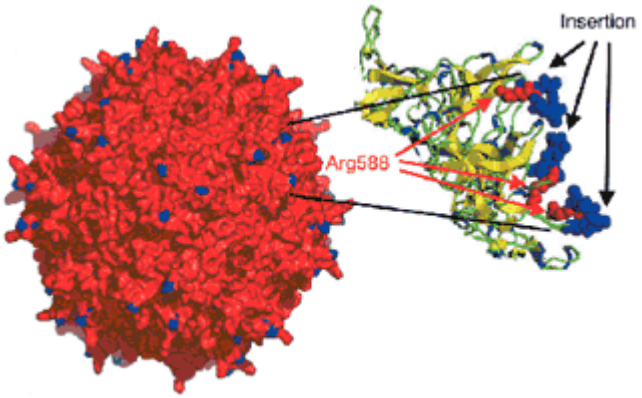


Figure 6 : Particule d'AAV non enveloppé de 18 à 25 nm de diamètre.
D'après MULLER O.., KAUL F., WEITZMAN M., PASQUALINI R., ARAP W., KLEINSCHIMDT JA., TREPEL M. *Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors*. [s.n.] : Nature Biotechnol, 2003. p. 1040-1046.

De nos jours, douze sérotypes ont été identifiés chez les primates. Le sérotype le mieux caractérisé et donc le plus utilisé en thérapie génique est le sérotype numéro deux. Malgré les problèmes des anticorps neutralisants, préexistants ou générés à la suite de une première administration, les vecteurs AAV semblent très prometteurs de part leur efficacité de transfection *in vivo* [20]. En effet, les essais *in vivo* ont montré une expression stable pendant plusieurs années chez la souris [21] et chez les autres animaux [22] après injection et même après administration orale [23].

Cependant, ces virus ont comme inconvénients majeurs leur difficulté de production et leur faible capacité de stockage de matériel génétique exogène qui est limitée à 4,5 Kilobases (Kb) soit l'une des plus petites tailles de plasmides.

V.1.1.2) Les rétrovirus dérivés du virus de leucémie murine

Les rétrovirus de façon générale possèdent un patrimoine génétique particulier sous forme de double brin d'ARN, ainsi qu'une enzyme spécifique la *Transcriptase reverse* (TR), qui permet le passage de l'ARN à l'ADN proviral [24]. Ces virus sont impliqués dans de graves pathologies humaines telles que les leucémies ou le SIDA.

Les rétrovirus dérivés de MLV ont été les premiers virus à être utilisés. Ils sont capables de transduire une grande fraction de cellules cibles en division mitotique et de permettre une intégration stable du matériel génétique dans le génome des cellules cibles [25]. Les gènes transférés sont ainsi transmis aux générations successives de cellules filles, permettant une expression à long terme.

Cependant, de nombreux inconvénients sont liés à leurs utilisations comme en témoigne la faible capacité d'incorporation d'un exogène de 8 Kb et le manque de spécificité cellulaire. L'emploi de ces rétrovirus reste donc limité au transfert de gène dans des cellules en division et également à des cellules qu'on peut prélever aisément pour l'application de stratégies *ex vivo*.

V.1.1.3) Les rétrovirus de type lentivirus

Depuis quelques années déjà des équipes de recherche travaillent sur le développement d'autres rétrovirus, en particulier les lentivirus.

Les lentivirus pénètrent activement dans le noyau cellulaire et peuvent transduire efficacement des cellules en prolifération mais aussi des cellules latentes. Ce sont les premiers vecteurs inactivés pour la réplication. Ils sont malheureusement pathogènes pour l'homme en le rendant immunodéprimé et ainsi susceptible d'être infecté par des maladies opportunistes.

Néanmoins ces lentivirus ont permis d'obtenir dernièrement des résultats encourageants. Ils ont rendu possible le traitement de deux enfants atteints d'une maladie cérébrale mortelle, l'adrénoleucodystrophie appartenant au groupe des leucodystrophies. Le traitement a consisté à greffer les propres cellules de moelle osseuse du patient après traitement par thérapie génique sans recourir à un donneur, évitant ainsi les complications de la greffe. Les cellules souches de la moelle osseuse ont été prélevées, puis corrigées par transfert d'une version fonctionnelle du gène déficient à l'aide d'un lentivirus. Les cellules ainsi corrigées ont été réinjectées aux patients comme après une greffe classique; elles ont gagné la moelle osseuse et certaines, par un mécanisme naturel, se sont dirigées vers le cerveau du patient pour y jouer leur rôle correcteur [26]. Plus de deux ans après le début du traitement, la progression de leur maladie a été arrêtée, et aucun effet secondaire n'a été observé jusqu'ici. Les résultats de cet essai clinique mené par des équipes de recherche françaises associant l'Inserm, l'Assistance Publique Hôpitaux de Paris et l'Université Paris-Descartes ont été publiées en novembre 2009.

V.1.1.4) Les adénovirus

Les adénovirus sont particulièrement adaptés aux protocoles de thérapie génique. Ils sont responsables chez l'homme d'infections bénignes telles que les conjonctivites, les gastroentérites. Actuellement, ces virus sont les outils les plus prometteurs et les plus utilisés en thérapie génique, malgré le décès d'un jeune patient en 1999 [27].

Ce sont des virus non enveloppés à capside icosaédrique possédant un double brin d'ADN de 36 Kb. La capside est formée de l'assemblage de polypeptides : hexons et pentons. Chaque penton est constitué d'une base et d'une fibre (Figure 7). Après fixation et pénétration par endocytose dans la cellule, le génome viral migre vers le noyau mais ne s'intègre pas au patrimoine génétique de l'hôte. Il ne provoque qu'une expression transitoire du gène thérapeutique, sans risques de mutagénèse.

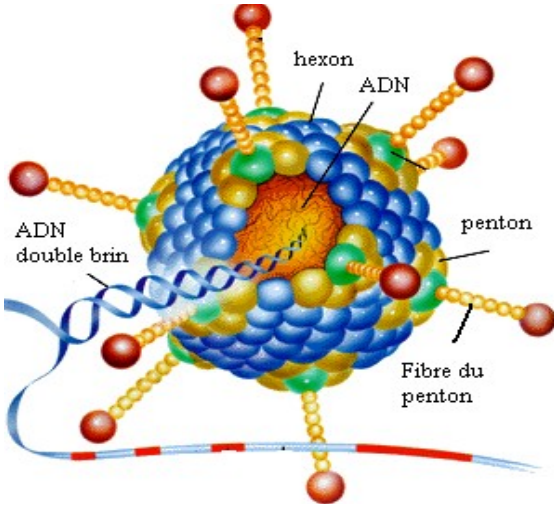


Figure 7 : Structure d'un adénovirus.
D'après MEDGADGET. *Obesity : an Infectious* Disease [en ligne]. El Granada : MEDGADGET, 2004.
Disponible sur : <http://www.medgadget.com/archives/img/bigadenovirus.gif>.
(consulté le 10.01.11)

Par ailleurs, ces virus sont capables d'infecter des cellules à la fois en division et latentes. La limite actuelle de ce type de vecteur réside dans sa faible capacité d'incorporation d'un exogène (taille limitée à 7,5 Kb). Cependant, une nouvelle génération d'adénovirus possèdant une capacité d'incorporation pouvant aller jusqu'à 35 Kb a été décrite.

L'inconvénient majeur de l'utilisation de ces vecteurs est lié à la forte réaction immunogène de l'hôte, qui développe des anticorps anti-adénovirus empêchant une administration répétée de ces vecteurs. Des adénovirus de deuxième et troisième génération sont créés pour réduire leur immunogénicité en étant dépourvus de leurs gènes viraux exceptés les adénovirus qui conservent uniquement les séquences *Inverted Terminal Repeat* (ITR) [28].

V.1.1.5) Les virus herpétiques

Le virus herpétique est un virus à ADN neurotropique peu pathogène pour l'homme. Les vecteurs utilisant ce virus sont capables d'infecter de nombreuses cellules, grâce aux multiples récepteurs reconnaissant les protéines de l'enveloppe. De plus, le virus modifié perd sa capacité réplicative et peut incorporer des séquences allant jusqu'à 25 Kb.

L'intérêt principal des vecteurs de transfert de gène dérivés de l'Herpès Simplex Virus de type 1 (HSV-1) réside dans la possibilité d'exploiter les multiples adaptations de ce virus, vis-à-vis du système nerveux. En effet l'HSV-1 est capable d'établir une période de latence du génome viral dans les neurones sensitifs [29]. Par ailleurs, il peut non seulement pénétrer dans le système nerveux après infection d'un tissu périphérique, mais aussi disséminer des particules virales par voie trans-synaptique avec la présence dans le génome viral de promoteurs neurospécifiques et de gènes contrôlant la neuro-invasivité et la neurovirulence.

Des progrès importants ont été acquis récemment dans notre connaissance de la biologie moléculaire de ce virus, tout particulièrement en ce qui concerne la nature des récepteurs cellulaires permettant l'infection, la structure et la fonction du seul promoteur restant actif pendant la phase de latence. L'apport de technologies propres à HSV-1 permet aujourd'hui de manipuler le génome herpétique, de manière à réduire sa toxicité et à contrôler de manière rigoureuse l'expression des transgènes portés par ce virus. Ainsi, il est devenu possible aujourd'hui de construire des nouvelles générations de vecteurs herpétiques défectifs qui sont non pathogènes pour l'organisme receveur, tout en permettant une expression transgénique à long terme. Des vecteurs atténués, capables de se répliquer de manière lytique seulement dans certains types cellulaires, et en particulier dans des cellules malignes, ont également été développés [30]. Le ciblage de ces cellules malignes peut désormais être théoriquement atteint de trois manières différentes : par la pénétration sélective du virus, par l'expression sélective du virus ou par la réplication sélective du virus.

Grâce à l'ensemble de ces développements, il a été possible d'utiliser des vecteurs herpétiques atténués pour le traitement de glioblastomes chez l'homme [31]. Les résultats de la phase III de ces protocoles cliniques, encore en cours d'évaluation, se révèlent d'ores et déjà extrêmement encourageants.

Tous les vecteurs viraux possèdent de nombreux avantages pour le transfert de gène. Leur succès dans les protocoles de thérapie génique repose sur leur important potentiel de transfection *in vivo*. Cependant, ils souffrent de sévères inconvénients qui limitent leur emploi. En effet, l'intégration d'un exogène de grande taille est difficile (Cf. Annexe 2 et 3). Certains engendrent des réactions immunitaires, d'autres peuvent devenir pathogènes après mutagénèse. Enfin, leur production et leur manipulation sont compliquées et coûteuses.

V.1.2) Les vecteurs synthétiques

Les lipides cationiques et les polymères cationiques sont les deux types de vecteurs les plus développés. Ils forment des complexes avec l'ADN par interactions électrostatiques. Ces complexes appelés lipoplexes ou polyplexes favorisent le transfert d'ADN à l'intérieur de la cellule [32]. En fonction de la quantité de vecteurs utilisés ces complexes sont de charge globale négative, positive ou neutre. Cependant les mécanismes de transfert de l'ADN dans la cellule sont encore mal connus. Deux hypothèses sont émises : la voie de l'endocytose et la fusion du complexe avec la membrane plasmique permettant la libération de l'ADN dans le cytoplasme [33].

La plupart des complexes sont très efficaces *in vitro*. Toutefois, ces résultats positifs obtenus sur des cellules en culture ne peuvent pas être extrapoler aux expériences *in vivo* de transfert de gène. Cette absence de corrélation est liée aux obstacles que rencontrent les vecteurs de transfert de gène lors du trafic extracellulaire dans les milieux biologiques.

Néanmoins, les vecteurs synthétiques représentent une alternative prometteuse aux vecteurs viraux. Leurs principaux avantages sont leur simplicité d'élaboration, d'utilisation et leur faible immunogénicité. L'enjeu des vecteurs synthétiques est donc d'acquérir des propriétes structurales qui leur permettront d'une part de résister aux milieux extracellulaires, et d'autre part de cibler les cellules où sera libéré le gène thérapeutique.

V.1.2.1) Les lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des molécules monomériques amphiphiles comportant trois parties : une partie polaire chargée positivement, une ou plusieurs chaînes hydrophobes et un domaine de liaison séparant les deux éléments appelé espaceur (Figure 8).

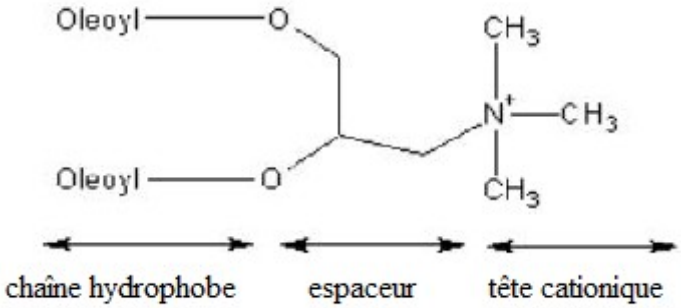


Figure 8 : Représentation schématique d'un lipide cationique.
D'après CHESNOY, S., HUANG L. *Enhanced cutaneous gene delivery following intradermal injection of naked DNA in a high ionic strength solution*. [s.l.] : Mol Ther, 2002. p. 57-62.

La tête cationique permet la liaison avec l'ADN pour former un complexe ADN/lipide. L'efficacité de transfection est dépendante du rapport de charge ADN/lipide, du lipide utilisé, du type de cellules ou tissus transfectés. Lors de la formation des complexes, des lipides neutres tels que le Dioléyl-Phosphatidyl-Ethanolamine (DOPE) ou le cholestérol peuvent être ajoutés afin d'améliorer la stabilité des complexes et de faciliter la sortie de l'ADN des endosomes [34]. De plus, l'absorption du complexe sur la membrane cellulaire peut être favorisée en modulant son état de compaction d'après le rapport de charge - (ADN) / + (lipides) [35, 36].

Le premier lipide cationique a avoir été utilisé en 1987 est un lipide cationique monovalent, le chlorure de Dioléoyloxypropyl-Triméthylammonium (DOTMA) [37]. Depuis plusieurs autres lipides ont pu être synthétisés comme le Trifluoroacétate de Dioléoyloxy [(spermine-carboxyamido) éthyl] diméthylpropanaminium (DOSPA), le Dioléoyloxypropyltriméthylammonium Propane (DOTAP) ou l' Acide trifluoroacétique Dioctadécylamidoglycylspermine (DOGS) (Schéma 1).

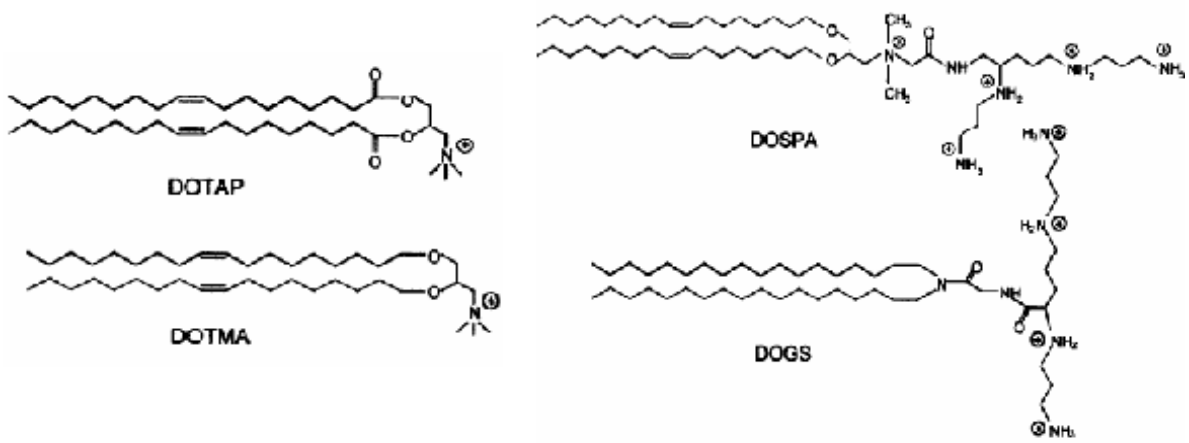


Schéma 1 : Structure de lipides cationiques monovalents (DOTAP et DOTMA) et multivalents (DOSPA et DOGS).
D'après SEGURA T., D SHEA L. *Material for non-viral gene delivery.* 2001, vol. 31, p. 25-46.

Ces nouveaux lipides cationiques permettent d'augmenter l'efficacité du transfert de gène, de diminuer la cytotoxicité, d'augmenter la stabilité des complexes en milieu biologique et d'ajouter des éléments de ciblage cellulaire [38].

V.1.2.2) Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des molécules riches en amines et imines comme les Polyéthylèneimines (PEI) (Schéma 2), en lysines (poly-L-Lysine) ou encore en arginines. L'association de ces polymères à l'ADN est ainsi possible par de multiples interactions électrostatiques pour former un polyplexe.

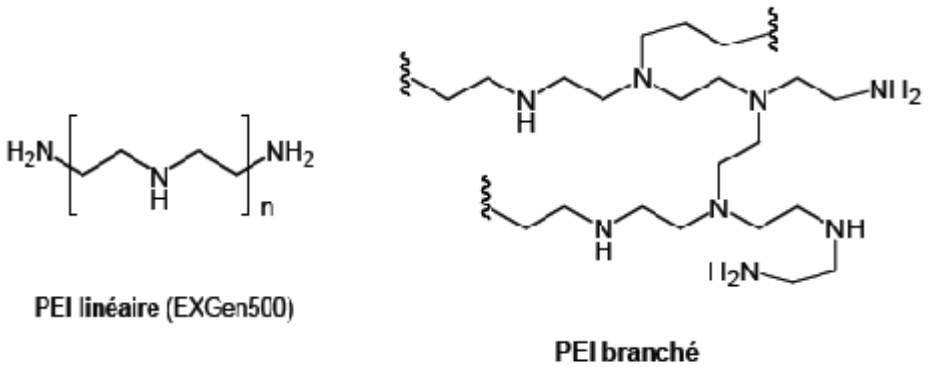


Schéma 2 : Formule chimique d'un PEI linéaire ou branché.
D'après POLYMER CHEMISTRY INNOVATIONS. *Products* [en ligne]. Tucson : Polymer Chemistry Innovations, 2010. Disponible sur <http://www.polychemistry.com/>. (consulté le 08.01.2010)

La poly-L-Lysine est souvent le polymère le plus utilisé car il est capable de compacter efficacement l'ADN. Selon la quantité de polymère utilisé, les polyplexes peuvent intéragir de façon efficace avec les membranes cellulaires dans la mesure où ils présentent un excès de charges positives [39].

Cependant, l'inconvénient de ce polymère est qu'il ne possède pas les fonctions nécessaires à la sortie des endosomes. C'est pourquoi d'autres polymères tels que les PEI, ayant des propriétés supérieures à celles de la Poly-L-Lysine, sont désormais utilisés. En effet, les PEI sont très efficaces pour le transfert de gène *in vitro* et *in vivo* dans de nombreux types cellulaires [40]. Les PEI riches en groupements amines fonctionnent comme une éponge dans les endosomes entraînant d'abord une augmentation de la pression osmotique puis la rupture de l'endosome et enfin la libération de l'ADN dans le cytosol [41]. Toutefois, il existe des disparités entre les PEI lors du transfert de gène. Les PEI linéaires sont plus efficaces que les PEI branchés car ces derniers, sortis de l'endosome, sont incapables de se dissocier de l'ADN en y restant fixé même jusque dans le noyau [42].

V.1.2.3) Les dendrimères

Les dendrimères sont des structures semblables aux polymères cationiques mais présentant de nombreux branchements (Figure 9).

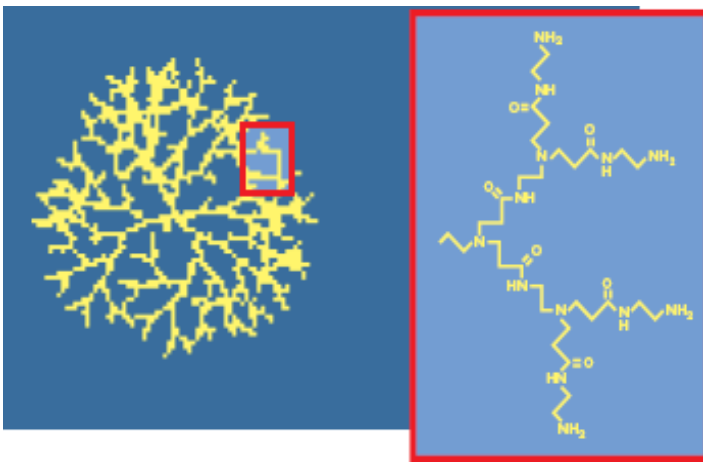


Figure 9 : Structure chimique des branchements d'un dendrimère.
D'après QIAGEN. *Transfection Ressource Book* [en ligne]. [s.l.] : Qiagen S.A., [s.d]. Disponible sur : <http://www1.qiagen.com/literature/brochures/.pdf>.
(consulté le 22.02.2011)

Les dendrimères sont capables d'interagirent avec plusieurs molécules d'ADN en formant des complexes stables à structure circulaire par interaction de charges. Ils possèdent également d'autres avantages tels qu'une bonne solubilité dans les milieux aqueux et une faible cytotoxicité. Une fois lié aux dendrimères, l'ADN possède une résistance à la digestion par les nucléases et garde sa faculté de transcription du gène [43].

V.2) Les méthodes physiques

V.2.1) L'injection d'ADN nu plasmidique

L'injection d'ADN nu plasmidique, c'est-à-dire non vectorisé, est le système d'administration le plus simple, et le moins cher alors qu'au départ il n'était pas envisageable qu'une simple injection d'ADN puisse permettre la transfection de cellules *in vivo*.
Depuis 1990, diverses expériences d'injection d'ADN nu plasmidique dans le muscle ont montré une expression efficace du transgène pendant plusieurs mois [44]. Par ailleurs, le muscle squelettique n'est pas le seul organe cible pour l'injection d'ADN nu plasmidique car l'expression du transgène a pu être démontrée dans d'autres organes ou tissus tels que la peau, les articulations, le foie, le rein et le cerveau.

Cependant, cette technique ne possède pas que des avantages. En effet, elle possède une efficacité de transfection dans le muscle qui est faible allant de 1 à 5% des fibres musculaires totales. De plus, l'injection de l'ADN nu plasmidique par voie intra-veineuse systémique est difficilement applicable à l'homme et l'expression du transgène reste très localisée au niveau du site d'injection. C'est pourquoi des améliorations doivent être apportées au niveau du plasmide par modification d'éléments de séquence comme le promoteur, le signal de polyadénylation, la séquence de terminaison ou la nature du transgène.

Ainsi, l'efficacité de transfection sera améliorée *in vitro* et *in vivo* non seulement par la suppression des séquences constitutives du plasmide qui limitaient l'expression du transgène, mais aussi en favorisant la pénétration cellulaire et la migration vers le noyau du fait de la réduction de la taille du plasmide.

V.2.2) La microinjection

La microinjection est une technique consistant à introduire le matériel génétique par pression hydrostatique dans le cytoplasme ou le noyau d'une cellule. Elle a été utilisée pour la première fois en 1980 sur des cellules en culture [45].

Les microinjections sont réalisées à l'aide d'un appareillage composé d'une aiguille de 0,7 à 1 micromètre (µm) de diamètre, d'un micro-manipulateur assurant le déplacement motorisé de l'aiguille, d'un micro-injecteur et enfin d'un microscope.

Cette technique permet d'injecter de manière reproductible une quantité définie de solution dans les cibles cellulaires. Toutefois, le principal inconvénient est qu'une seule cellule peut être traitée à la fois limitant ainsi les applications de cette technique au domaine de la thérapie génique *in vitro.*

V.2.3) La biolistique ou « Gene Gun »

La biolistique est une méthode utilisée pour incorporer un gène dans les cellules de mammifères et les tissus. Le principe de cette pratique consiste à bombarder les cellules cibles avec des particules de 1µm de diamètre composées d'or ou de tungstène et recouvertes d'ADN plasmidique. Ces particules sont accélérées soit par un gaz, soit par un système d'arme à feu appelé « Gene Gun » [46]. Cette technique est applicable aussi *in vitro* qu'*in vivo* après intervention chirurgicale sur la plupart des organes.

L'efficacité de transfection de cette méthode varie suivant l'organe ciblé : 10 à 20% de cellules épidermiques sont transfectées contre 1 à 5% pour les cellules musculaires [47]. Toutefois, l'expression du gène reste visible 14 jours après injection dans la peau ou dans le foie de souris. L'efficacité de cette méthode est principalement limitée par la faible pénétration de la particule dans les tissus, qui n'excède pas quelques millimètres de profondeur.

Néanmoins, l'avantage de cette méthode réside dans le fait que l'ADN n'est pas dégradé dans le milieu biologique. En effet, celui-ci pénètre directement dans le cytosol ou dans le noyau, évitant ainsi sa destruction enzymatique dans le sang ou dans les compartiments intracellulaires comme les endosomes.

V.2.4) L'électroporation

Le principe de l'électroporation est d'appliquer des impulsions électriques pendant de courtes périodes sur les cellules ou les tissus cibles après administration de l'ADN. Le résultat de cette méthode est une déstabilisation de la membrane plasmique qui s'accompagne de la création transitoire de pores permettant ainsi à l'ADN de pénétrer dans la cellule.

L'efficacité de cette technique va donc être modulée en fonction de plusieurs paramètres électriques tels que la nature du générateur, la configuration des électrodes, l’intensité du champ électrique, la forme, la durée, le nombre et la fréquence des impulsions électriques.

La connaissance des effets de chacun de ces facteurs est importante puisqu'elle conditionne la qualité de l'électroperméabilisation et donc l'efficacité de l'électrotransfert de gène. L'électroporation, ayant vu le jour en 1982 [48], est utilisée pour transférer des acides nucléiques *in vitro* dans des cellules bactériennes, des cellules végétales, mais aussi pour le transfert de molécules chimiques *in vivo* dans le cadre de traitements anti-tumoraux [49, 50]. Les premiers travaux *in vivo* ont été réalisés en 1991 sur les cellules de peau de souriceaux nouveaux-nés à la suite de l'application d'impulsions électriques exponentielles [51]. Par la suite différentes conditions d'application des pulses électriques ont été testées, notamment des trains d'impulsions de 100 microsecondes dans le foie en 1996 [52] ainsi que des impulsions de plus longue durée dans le muscle squelettique. Depuis 1996, plusieurs études ont été développées par l'équipe du Professeur MIR à l'IGR de Villejuif UMR 8203 Vectorologie et thérapeutiques anti-cancéreuses (voir Figure 10).

V.2.5) Les techniques parallèles

Plusieurs techniques parallèles existent. L'une d'entre elles est la magnétofection dont le principe est d'introduire des acides nucléiques ou d'autres molécules dans les cellules en utilisant l'énergie cinétique de particules magnétiques. Ce procédé récent permet d'accroître l'expression du transgène à la suite d'expériences réalisées *in vivo* [53].

Une autre technique appelée sonoporation a permis au milieu des années 1990 le transfert de gène en appliquant des ultra-sons afin de perméabiliser les membranes des cellules et ainsi d'augmenter la pénétration de molécules. L'ADN plasmidique est en général co-injecté avec des « microbulles » de 1 à 3 µm constituées de protéines, de lipides ou polymères, et remplies d'air ou d'un gaz inerte. Cette méthode a pour avantages d'être non invasive et d'envisager une utilisation dans de nombreux tissus, y compris le muscle ou le cœur [54, 55].

V.3) Transfert de gène dans le muscle

Parmi les tissus cibles, le muscle squelettique se révèle être un tissu de choix. En effet, le muscle est un territoire facilement accessible qui se transfecte bien notamment avec la présence de cellules multi-nucléées.

Il représente près de 30% du poids total et est particulièrement bien vascularisé, ce qui lui permet de véhiculer les protéines actives dans la circulation sanguine vers des cibles lointaines et multiples [56].

V.3.1) Technique non virale prometteuse

L'utilisation de l'ADN nu plasmidique s'est montrée relativement efficace dans le muscle squelettique et dans la peau grâce à l'équipe de Jon Wolff en 1990. En effet, des résultats surprenants ont été obtenus en injectant en intramusculaire de l'ADN nu plasmidique sans aucun système de vectorisation. Des niveaux détectables d'expression du transgène ont alors été observés dans le muscle [57]. De plus, l'expression du transgène semblait durer dans le temps puisqu'elle a été observée plusieurs mois après l'injection initiale [58]. Cette découverte reste encore une promesse d'espoir pour le traitement de maladies génétiques, même si l'on ne connaît pas exactement le mécanisme d'entrée de l'ADN nu plasmidique dans les cellules de l'organe injecté *in vivo.*

Cette technique peut être aussi étendue au domaine de la production de protéines sécrétées et de la vaccination. Des expériences ont montré que l'injection directe d'ADN nu plasmidique dans le muscle permet la production d'antigènes protéiques *in situ* et l'induction de réponses immunitaires protectrices, sans l'aide d'adjuvants [59]. Ainsi, la vaccination constitue de nos jours une des applications majeures de l'injection d'ADN nu plasmidique puisque les niveaux d'expression du transgène dans le muscle sont encore insuffisants pour envisager une application autre que vaccinale.

V.3.2) Technique non virale efficace

De façon générale un grand nombre de conditions différentes d'électrotransfert peuvent être utilisées selon le tissu cible car le transfert de gène est hautement dépendant de l'organisation du tissu et de la taille des cellules transfectées. L’un des tissus le plus largement utilisé est le muscle squelettique parce qu'il offre de nombreux avantages. En effet, il présente un large volume facilement accessible, il possède une vascularisation développée qui permet aux protéines produites d'atteindre rapidement la circulation sanguine.

De plus, il est constitué de fibres parallèles de telle sorte que leurs orientations par rapport au champ électrique facilitent le transfert de gène, et enfin ses cellules ont une longue durée de vie qui permet une expression du transgène à long terme.

Toutefois, même si l'efficacité de l'électroporation sur les fibres musculaires est positive, celle-ci reste limitée par la présence de lésions tissulaires. Ces lésions sont des marques blanches, situées au niveau de la zone électrostimulée, semblables à des brûlures. Le tissu apparaît remanié et présente un infiltrat inflammatoire (Figure 10). Après plusieurs jours et plusieurs semaines, les fibres présentent des noyaux en position centrale, révélateur d'un phénomène de régénération [60, 61]. Seul un ajustement des paramètres électriques permet de réduire les lésions tissulaires tout en maintenant une expression du transgène supérieure à celle obtenue à la suite de l'injection d'ADN nu plasmidique.

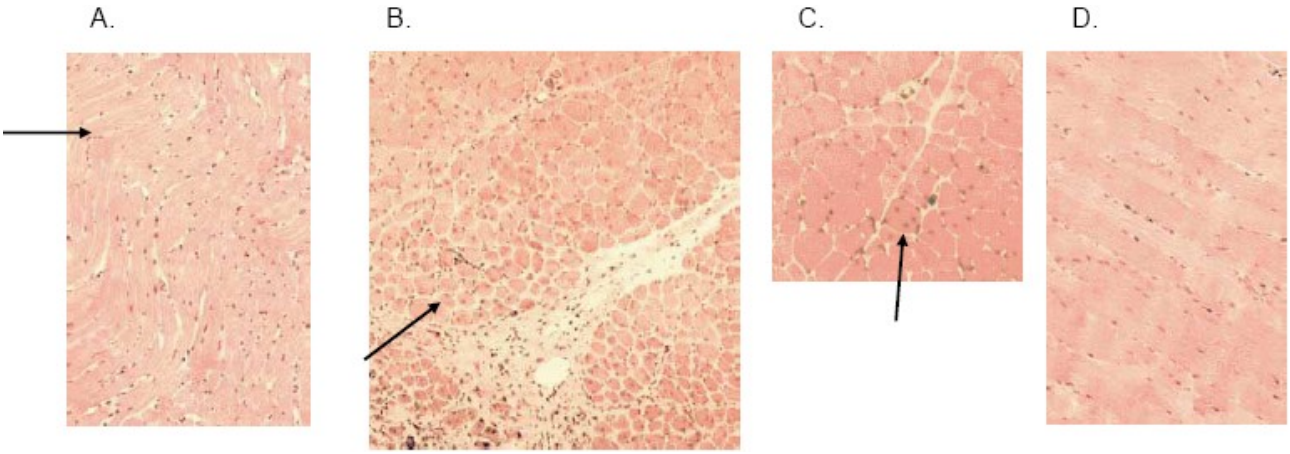


Figure 10 : Analyse histologique du muscle tibial antérieur de souris après application d'un champ électrique de 200 à 250 V/cm.
D'après ANDRE F., M. MIR L. (dir.). *Electrotransfert de gène in vivo : optimisation et mécanisme*. 314 p. Thèse de doctorat : Agronomie. Paris : 2006.

Légende :

A : ondes de chaleur.

B : zone nécrotique.

C : régénération avec présence de fibres musculaire à noyau en position centrale.

D : architecture normal d'un muscle, traité avec un champ électrique plus faible.

L'électroporation appliquée au muscle est une méthode qui présente, dans certaines conditions, un certain nombre d'atouts et qui permet de s'affranchir de vecteurs biologiques comme les virus et qui ne fait appel qu'à de l'ADN nu plasmidique facilement reproductible.

VI / Conclusion

La thérapie génique ouvre de nouvelles perspectives thérapeutiques pour traiter de nombreuses maladies et les connaissances acquises ces quinze dernières années permettent d'avoir un certain recul sur les vecteurs de transfert de gène, leurs potentialités et leurs limites.

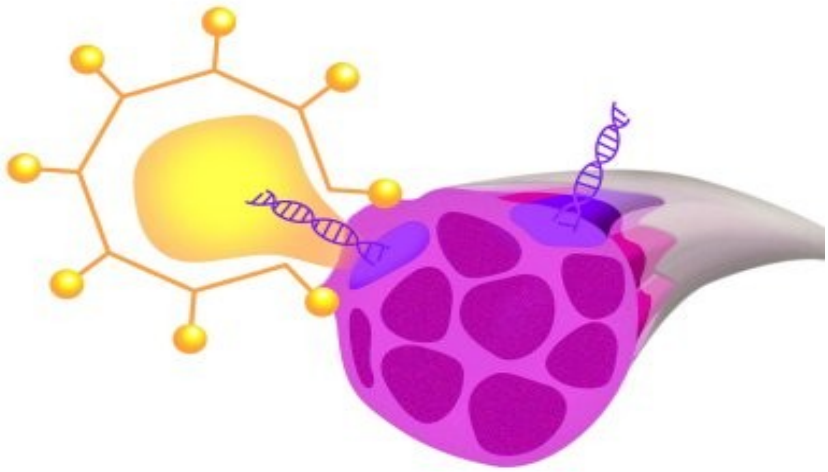
L'obstacle majeur à sa réalisation réside encore dans les difficultés techniques à transférer le transgène dans les cellules avec efficacité, aussi bien en terme de niveau que de durée d'expression et avec le plus de spécificité cellulaire possible. La sécurité d'emploi pour le patient reste par ailleurs à confirmer.

Aujourd'hui, aucun de ces vecteurs, qu'il dérive ou non de virus, ne présente l'efficacité et la sécurité requise pour une utilisation thérapeutique chez l'homme. Il est d'ailleurs probable qu'il n'y aura pas un vecteur idéal mais différents vecteurs selon le type de pathologies à traiter, le mode d'administration et les caractéristiques du gène. L'objectif des années à venir est de développer un large éventail de vecteurs, de nature différente tout comme les vecteurs synthétiques qui occupent déjà une place de choix, de part les nombreux avantages qu'ils présentent par rapport aux vecteurs viraux (coût, facilité de mise en œuvre, sécurité et éthique).

La thérapie génique est donc encore dans une phase de mise au point. Ses avancées passeront par une meilleure connaissance de la virologie, de la biologie moléculaire et de l'élucidation des mécanismes de transfert de gène des virus et des vecteurs synthétiques, et par le développement de nouveaux vecteurs ayant une biodisponibilité accrue et permettant une transfection cellulaire spécifique et efficace.

PARTIE II

Du concept à l'utilisation détournée



I / Introduction

Du concept à sa pratique, la thérapie génique a montré en l'espace de trois décennies un réel potentiel pour traiter des maladies humaines graves. Malgré ce succès, la thérapie génique reste réservée au domaine de la médecine expérimentale dans laquelle beaucoup d'études précliniques et cliniques supplémentaires sont encore nécessaires pour affirmer l'efficacité et l'innocuité de cette approche dans le traitement de maladies chez l'homme.

Cependant, les avancées considérables effectuées dans le domaine des méthodes d'introduction de gènes pourraient être détournées par certains, comme des moyens d'amélioration de la performance sportive. Cette pratique représenterait une nouvelle méthode de dopage dite « dopage génétique ». Appliquer la technologie de transfert de gène, encore très immature, à des sportifs à des fins d'amélioration d'une fonction est risquée pour la santé, immoral, contraire à l'éthique, et constitue une faute professionnelle délibérée.

Face à cette menace, les scientifiques travaillant sous la direction de l'Agence Mondiale Anti-dopage (AMA) recueillent des informations précieuses sur les fonctions de certains gènes pouvant être utilisés à des fins de dopage, afin de pouvoir mettre en place des méthodes de détection efficaces et précises. Parmi ces objectifs cruciaux une question se pose : le « dopage génétique » ne met-il pas à l'épreuve notre conception des « talents naturels » athlétiques ?

II / Performance sportive liée au polymorphisme de gène

Un grand nombre de variables génétiques influent sur la performance sportive des athlètes de haut niveau ainsi que d'autres facteurs environnementaux tels que la nutrition, la consommation de produits dopants ou de médicaments [62-64]. Beaucoup d'études montrent que certains polymorphismes génétiques sont associés à divers traits physiques comme la fonction musculaire ou cardio-respiratoire et ont de ce fait un réel impact sur la performance athlétique [65-68].

Même s'il n'existe actuellement aucune preuve établie de « dopage génétique », le désir d'établir le profil du génome d'un athlète d'élite, induisant des modifications spécifiques phénotypiques, est bien présent comme en témoigne le nombre important d'études réalisées depuis les années 1980. Chaque année, plusieurs gènes sont découverts et plus de 100 *loci* sont impliqués dans la performance athlétique [69]. Le succès important des progrès réalisés en biologie moléculaire depuis ces quarante dernières années a permis la compréhension des interactions entre les gènes et la performance physique [70].

En effet, différentes études ont montré une association entre les capacités athlétiques et le génotype de l'*Angiotensin Converting Enzyme* (ACE). Pour simple rappel, l'ACE est une dipeptidylcarboxypeptidase peu spécifique ayant comme fonction principale l'hydrolyse de l'Angiotensine I (Ang I) en Angiotensine II (Ang II) et l'inactivation de la bradykinine (Cf. Annexe 4 et 5). L'Ang I ainsi que l'Ang II sont de puissants vasorégulateurs ayant des fonctions opposées sur le tonus vasculaire. L'ACE peut donc augmenter la tension artérielle de deux façons distinctes soit en dégradant la bradykinine, un puissant vasodilatateur, soit en synthétisant l'Ang II, un puissant vasoconstricteur. La présence de l'ACE est observée dans plusieurs tissus principalement sous forme d'ectoenzyme, c'est-à-dire agissant à l'extérieur de la cellule mais aussi sous forme soluble dans la circulation sanguine. Il existe une grande variation interindividuelle des concentrations plasmatiques de l'ACE mais la concentration reste constante pour un même individu [71]. Le gène de l'ACE a été cloné en 1988 [72] et est localisé sur le chromosome 17.

Plusieurs polymorphismes sont présents sur ce gène. Le plus étudié est le polymorphisme Insertion/Délétion (I/D) [73]. Il implique la présence ou l'absence de 287 paires de bases de la séquence répétitive Alu dans l'intron 16 du gène.

Un individu peut donc être homozygote pour la délétion (DD), hétérozygote (ID) ou homozygote pour l'insertion (II). Depuis 1998, le polymorphisme I/D du gène de l'ACE attire l'attention comme marqueur de la performance athlétique et de la réponse à l'entraînement. Tout d'abord, des analyses d'association ont démontré une prévalence plus élevée de l'allèle I parmi les athlètes élites comparativement à un groupe contrôle (Cf. Annexe 6). En effet des chercheurs [74] ont observé une distribution génotypique et une fréquence allélique significativement différente entre un groupe de 25 alpinistes élites ayant monté jusqu'à 7000 m d'altitude sans supplémentation en oxygène et un groupe contrôle, démontrant ainsi une incidence surnuméraire du génotype (II) et une sous représentation du génotype (DD) chez les alpinistes. De plus, parmi les 15 alpinistes ayant franchi 8000 m d'altitude sans supplémentation en oxygène, aucun n'était homozygote pour la délétion. Cette étude démontre un avantage potentiel de posséder l'allèle I dans des conditions hypoxiques.

De même d'autres études [75] ont mesuré la $V0_2$ max auprès de 47 femmes ménopausées et ont observé qu'elle était supérieure chez les femmes homozygotes pour l'insertion, intermédiaire chez les hétérozygotes (ID) et inférieure chez les femmes homozygotes (DD). La variation de la $V0_2$ max observée entre les groupes a été entièrement expliquée par une plus grande différence artériovéneuse et non par une augmentation du débit cardiaque.

Récemment, il a été rapporté que la fréquence de l'allèle I était plus élevée chez 60 athlètes professionnels incluant des cyclistes, des coureurs de longue distance et des joueurs de handball comparativement au groupe contrôle.

Toutes ces études semblent véritablement associer le polymorphisme I/D du gène de I'ACE à la performance en endurance [76]. D'autre part, plusieurs chercheurs ont étudié l'influence du polymorphisme I/D du gène de l'ACE sur la réponse à un programme d'entraînement physique. Des expériences ont évalué la durée pendant laquelle des hommes (n = 78) ont pu maintenir un rythme constant de flexion de l'avant-bras avec poids et haltères, avant et après dix semaines d'entraînement. Il a été noté que les sujets (II) avaient une amélioration en moyenne onze fois supérieure aux sujets (DD). Il en a été déduit que l'amélioration était due à une plus grande augmentation de l'endurance des muscles testés.

Toutefois, des résultats contradictoires ont été observés par certains groupes de recherches chez des enfants Caucasiens montrant une plus grande augmentation de la $V0_2$ max et une diminution plus marquée de la fréquence cardiaque lors d'un effort sous-maximal de 50 watts chez les individus (DD)**,** comparativement aux individus (II). Ainsi le génotype (DD) de l'ACE semble associé à une meilleure performance aérobie de courte durée.

D'autres variations associées à la performance sportive ont également été mise en évidence avec l'exemple du polymorphisme de gène de l'Alpha Actinine 3 (ACTN3) exprimé spécifiquement dans les fibres musculaires de type II, c'est-à-dire celles à contraction rapide. L'ACTN3 est un gène que chaque individu possède. Il a une influence sur une protéine qui dope les fibres musculaires de notre organisme, et qui crée des différences de prédisposition au sprint chez les individus sous la forme de trois génotypes différents à savoir : le génotype XX, le génotype RX et le génotype RR.

Le génotype XX correspond à un athlète possédant le variant R577X sur les deux copies du gène ACTN3, qui est naturellement plus endurant. Le gènotype est dit alors actif mais mauvais pour le sprint.

Le génotype RX correspond à la présence du variant sur une copie du gène. L'athlète bénéficie donc de "la double combinaison", signifiant qu'il est prédisposé aux épreuves d'endurance, tout en étant performant dans les épreuves nécessitant de la puissance et de la vitesse, telles que le sprint. Ce génotype est nommé silencieux.

Le génotype RR révèle l'absence du variant R577X sur les deux copies du gène ACTN3 avec pour conséquence le fait que l'athlète fait preuve à la fois d'une grande rapidité, mais aussi d'une remarquable puissance. Dans ce cas le gène est également dit actif [77].

Les avantages apportés par le gène ACTN3, lorsqu'il est actif, n'ont pas une influence notable sur les performances d'athlètes de niveau moyen. En revanche ce gène actif peut faire la différence lorsqu'il s'agit de performances de haut niveau. Ceci a été confirmé grâce aux études de Daniel Mac Arthur de l'Institut de recherche neuromusculaire de Sydney [63].

La découverte et la caractérisation des variables génétiques influençant la performance sportive permettraient dans le futur d'effectuer des tests d'ADN chez les enfants afin d'identifier leurs talents et leurs qualités pour un sport en particulier. En outre si ces tests se révèlent négatifs l'enjeu serait d'introduire un gène augmentant les capacités physiques. Cette possibilité risque néanmoins de se heurter à un grand nombre d'obstacles dont certains émanent du Comité Directeur pour la Bioéthique (CDBI) même si les plus importants sont le choix du vecteur et sa voie d'administration.

III / Dopage génétique

Les progrès de la technologie génétique et en particulier de la thérapie génique permettront de fournir aux sportifs les moyens d'améliorer leurs performances par manipulation de l'expression de certains gènes. Cette pratique est appelée « dopage génétique ». L'avantage majeur pour les sportifs, par rapport au dopage classique, est que la protéine produite de façon endogène par le gène transféré ou modifié sera beaucoup plus difficile à détecter avec les méthodes actuelles.

C'est ainsi qu'un grand nombre de prédictions sont envisagées quant aux prochaines années voire aux prochains Jeux Olympiques en matière de « dopage génétique ». En effet, il est possible que des laboratoires privés de biologie moléculaire offrent à des sportifs un accès au « dopage génétique ». Inversement, il est probable que des membres de la communauté sportive approchent des scientifiques travaillant sur des méthodes visant à soigner des maladies musculaires ou sanguines.

Cette prédiction s'est avérée être vraie puisqu'en 2007 un célèbre entraîneur allemand a été accusé d'avoir essayé d'obtenir du matériel expérimental destiné à augmenter la production des lignées sanguines chez des patients souffrant de cancer ou de maladies rénales [78]. Ce premier exemple de mésusage de la thérapie génique représente déjà une menace pour l'intégrité du sport et la santé du sportif. C'est une des raisons pour lesquelles les projets de l'AMA débutés en 2002 sont d'autant plus motivés et relancés avec l'engagement de 8 millions de dollars dans la recherche liée au « dopage génétique ».

L'AMA, définit le « dopage génétique » comme : « le transfert d'acides nucléiques ou de séquences d'acides nucléiques » et « l'utilisation de cellules normales ou génétiquement modifiées » [79]. A cette première définition ont été rajoutés dernièrement, « les agonistes du récepteur activé par les proliférateurs des péroxysomes δ (PPARδ) et les agonistes de l'axe PPARδ-protéine kinase activée par l'AMP ».

La présence du « dopage génétique », dans cette liste des substances dopantes interdites, est lié au risque important encouru pour les sportifs comme en témoigne déjà les études réalisées sur des modèles animaux ou sur des patients atteints de maladies génétiques ou acquises. Par conséquent, si de tels effets néfastes surviennent, la plupart des sportifs qui essaieront le « dopage génétique » ne bénéficieront d'aucune amélioration de leurs performances, tandis que d'autres verront leurs capacités diminuer et, dans certains cas, leur santé en souffrir.

Malheureusement, l'historique des techniques utilisées pour améliorer la performance dans le sport démontre d'une façon générale que les incertitudes et les risques pour la santé ne découragent pas pour autant certains entrepreneurs sans scrupules ou certains sportifs prêt à tout. Appliquer des techniques de transfert de gène ou encore de modulation de l'expression de gènes endogènes, à des fins d'amélioration d'une fonction physiologique, demeure immoral, contraire à l'esprit du sport et aux principes de fair-play [80].

IV / Cibles biologiques pour le dopage génétique

IV.1) Application potentielle de transfert de gène

Dans un proche avenir, la technologie de transfert de gène pourra être appliquée non seulement au traitement de maladies potentiellement mortelles, mais aussi dans le domaine du sport pour améliorer les performances physiques des athlètes (Cf. Annexe 7).

Le « dopage génétique » a plusieurs objectifs tels que pouvoir augmenter la taille et la puissance du muscle, améliorer l'endurance ou encore favoriser une guérison plus rapide et enfin réduire la douleur associée. Les gènes candidats les plus adaptés au « dopage génétique » sont classés en fonction de leurs effets probables liés à la performance physique ainsi qu'à leur utilisation en thérapie génique. Toutefois, certains de ces gènes peuvent appartenir à plusieurs catégories à la fois.

Le « dopage génétique » peut devenir une stratégie privilégiée pour les sportifs cherchant à contourner les méthodes actuelles de détection de dopage classique. En plus de cet argument illicite, le « dopage génétique » donne aux sportifs l'avantage d'agir sur trois cibles physiologiques qui sont la formation du muscle squelettique, l'alimentation en oxygène et l'offre en énergie.

IV.1.1) Myostatine et follistatine

La myostatine ou *Growth Differenciation factor-8* (GDF-8) appartient aux membres de la superfamille des *Transforming Growth Factor β* (TGF-β) décrit pour la première fois en 1997. C'est un régulateur négatif de la croissance du muscle squelettique et de sa régénération. L'inactivation du gène de la myostatine, naturelle ou expérimentale, provoque une augmentation de la masse de muscle squelettique, et sa sur-expression, une atrophie musculaire. La myostatine est synthétisée presque exclusivement dans le muscle squelettique sous la forme d'un précurseur protéique (Figure 11).

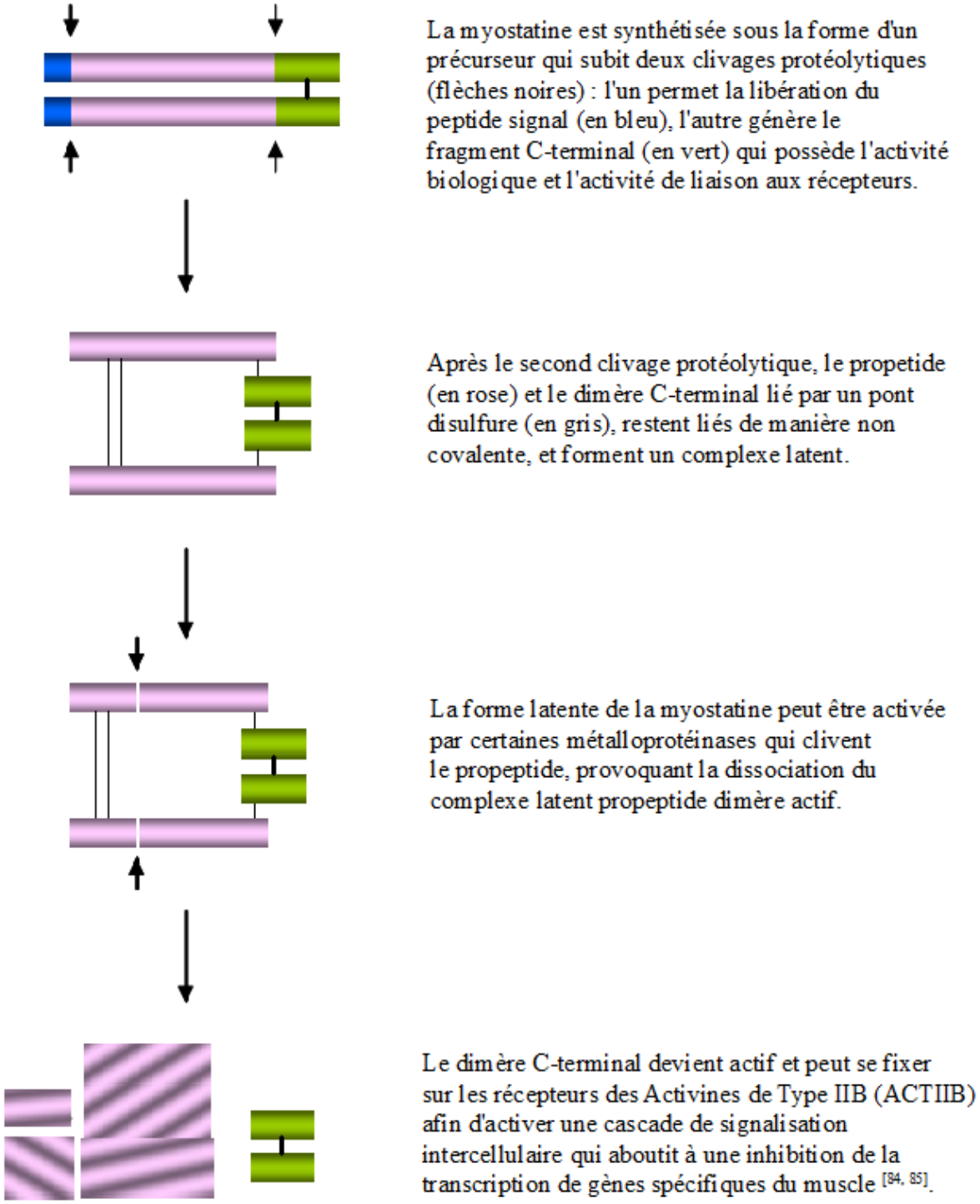


Figure 11 : Représentation schématique de la biosynthèse de la myostatine.

D'après McPHERRON, A.C., LAWLER, A.M. And LEE, S.J. *Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily* member. [s.n.] : Nature, 1997, p. 83-90.

Le gène codant la myostatine est constitué de trois exons et deux introns, l'exon trois codant pour le domaine bioactif de la protéine mature. La séquence du peptide actif est identique à 100% chez l'homme, le rat, la souris, le porc et les séquences protéiques bovine et ovine contiennent seulement un à trois acides aminés différents dans la protéine mature. Des mutations ou des variations de gène codant pour la myostatine ont été décrites chez certaines personnes, y compris certains athlètes. De plus, certaines races de bovins telles que la race Blanc Bleu Belge ou Piémontaise possèdent un gène dit « culard » responsable d'une hypertrophie musculaire de l'arrière train. Cette modification phénotypique a été créé expérimentalement dans la fin des années 1990 en désactivant le gène de la myostatine avec des ARN interférents. Ceci impliqua un changement définitif du génome transmis à la descendance de la race bovine.

Contrairement à la myostatine, un glycopeptide monomérique nommé la follistatine joue le rôle de régulateur positif de la croissance du muscle squelettique. Des études réalisées chez des souris transgéniques ont pu montré la surexpression de la follistatine par une augmentation spectaculaire de la croissance musculaire [83]. L'effet de la follistatine est partiellement attribuable à son effet inhibiteur sur la myostatine. En effet, la follistatine se lie avec une très haute affinité à la myostatine ce qui inhibe sa liaison avec les ACTIIB et réduit son activité. De même, les actions antagonistes de la follistatine et de la myostatine peuvent être observées à la suite d'une lésion musculaire où l'expression du gène codant la follistatine est supérieure à celle de la myostatine [84].

L'inactivation du gène de la myostatine peut également être obtenue non seulement par inhibition du propeptide et de sa maturation, mais aussi par blocage de son expression en injectant en intra-musculaire (IM) un AAV codant pour une myostatine mutée. Ce processus d'inhibition présente un intérêt potentiel pour le traitement des maladies caractérisées par une atrophie musculaire. En effet, des études cliniques ont été d'abord réalisées sur des modèles murins avant de pouvoir injecter, par voie intrapéritonéale, un anticorps bloquant ou une version stabilisée du propeptide de la myostatine chez des patients atteints de dystrophie musculaire. L'anticorps bloquant de la myostatine, le MYO-29 mis au point par le laboratoire Américain Wyeth, a été testé en 2005 dans des essais cliniques de phase I et II chez 116 patients atteints de Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) et de Becker. Les premiers résultats se sont révélés être positifs avec une bonne tolérance du produit mis à part quelques intolérances cutanées [85].

Alors que ces approches pharmacologiques sont susceptibles d'être bénéfiques pour des malades atteints de DMD ou autres maladies touchant le muscle, des sportifs risquent d'en tirer profit en tant que potentiel gain de force et de masse musculaire.

Quatre niveaux d'inhibition de la myostatine seraient possibles en terme de « dopage génétique » :

- Inhibition de la lecture du gène ou de la production de myostatine en utilisant des inhibiteurs d'ARN.

- Inhibition de la maturation du propeptide de la myostatine par blocage des métalloprotéinases.

- Blocage des récepteurs ACTIIB de la myostatine avec des protéines concurrentielles telles que l'ACE-031 produite par le laboratoire Américain Acceleron Pharma [86].

- Blocage de la myostatine avec des anti-corps spécifiques tel que le MYO-29.

Les deux dernières méthodes mentionnées ne sont pas du « dopage génétique » en soi car elles agissent seulement sur l'action de la myostatine et pas sur sa production. Toutefois, il est préférable d'en tenir compte afin de pouvoir lutter contre le « dopage génétique » au sens large.

IV.1.2) Hormone de croissance, GHRH et IGF-1

L'hormone de croissance (GH), souvent appelée somatotropine, est synthétisée dans l'hypophyse. Sa production est stimulée par la *GH-releasing hormone* (GHRH) au niveau de l'hypotalamus (Figure 12). La GH est sécrétée pendant les phases de croissance avec un pic survenant au cours de la puberté. Lorsque la croissance en taille cesse, la production de l'hormone diminue fortement, mais continue d'être stimulée par des processus consommateurs d'énergie tels que l'activité physique, le stress ou la faim.
Si la production de l'hormone de croissance est altérée ou si il y a un défaut de rétro-inhibition au cours de la croissance, le résultat est un gigantisme ou un nanisme.

La GH est l'une des hormones peptidiques qui a longtemps été usurpée à des fins de dopage car elle possède de nombreux avantages pour les sportifs. En effet, cette hormone est considérée comme un anabolisant indirect dont les effets attendus sont nombreux. Ils sont dits de type insulinomimétiques et se caractérisent par une meilleure assimilation et incorporation des acides aminés dans les protéines musculaires et le foie, une meilleure pénétration du glucose dans le muscle et le tissu adipeux, et une action antilipolytique sur le tissu adipeux. L'utilisation de la GH procure à long terme des effets indésirables diabétogène par inhibition de l'incorporation du glucose et de son utilisation.

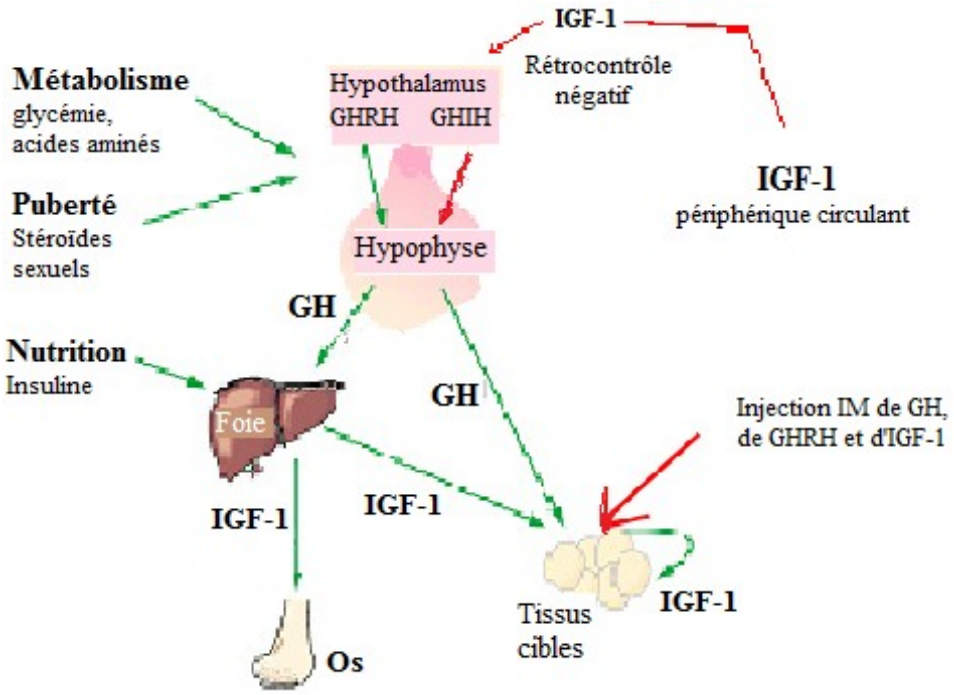


Figure 12 : Synthèse et sécrétion de GH et d'IGF.

D'après INRA. *Facteurs de contrôle de la biosynthèse et sécrétion de GH et d'IGF* [en ligne]. Tours : INRA, 2008.

Disponible sur :<http://wcentre.tours.inra.fr/societeneuroendocrino/images/JB08-Fig3.jpg>. (consulté le 08.06.2010).

Plusieurs rapports ont été publiés sur le transfert de gène *in vivo* et *ex vivo* de la GH chez des animaux. L'expression prolongée et régulée de la GH humaine transgénique a été obtenue après IM en utilisant un AAV chez des souris immunocompétentes.

Cependant, ce succès n'a pas pu être observé avec le transfert de gène par adénovirus en raison de l'activation d'une réponse immunitaire. Une alternative a été proposée pour éviter les effets indésirables associés à l'injection de GH recombinante. Il s'agit de l'administration en IM de GHRH qui permet une régulation de la libération hypophysaire de GH par rétrocontrôle [87].

Par ailleurs, les effets de la GH sont médiés par la synthèse hépatique et périphérique de l'*Insulin-like Growth Factor-1* (IGF-1). L'IGF-1 favorise d'une part la captation et l'utilisation des acides aminés et d'autre part la prolifération et la différenciation des cellules souches musculaires.

L'utilisation abusive de l'hormone de croissance dans le sport fait déjà l'objet de nombreuses spéculations. En effet, de nombreuses entreprises pharmaceutiques, utilisant des techniques de recombinaisons pour produire cette hormone, sont suspectées de vente illégale. L'injection IM d'IGF-1 et de ses isoformes (mIGF-1 et *Mecano Growth Factor* (MGF)) dans le muscle a été rendue possible par transfection de AAV au cours d'expériences réalisées sur des souris [88]. Les résultats positifs ont révélé une production de nouvelles myofibrilles plus grandes et plus solides à la suite d'une blessure musculaire.

Cette méthode de thérapie génique s'avèrerait être un atout intéressant pour certains athlètes qui pratiquent un sport exigeant de la force. La méthode d'injection d'IGF-1 chez l'homme semble théoriquement facile et sûre. Cependant, en pratique de nombreuses injections de cette hormone sont nécessaires avant de pouvoir avoir un effet compte tenu de son élimination rapide et de sa courte demie-vie. La conséquence directe de ces nombreuses injections est une élévation des taux sériques d'IGF-1. Ces taux élevés ne sont pas sans risques pour la santé puisqu'ils sont retrouvés dans des cancers de la prostate, du poumon et colorectal [89].

IV.1.2) Facteurs de transcription de type Pax

Des cibles moléculaires intéressantes en terme de « dopage génétique » sont les facteurs de transcription de type Pax7 et Pax3. Ce sont des marqueurs spécifiques associés aux stades de la différenciation myogénique [90], dont la fonction n'est pas encore définitivement élucidée.

Cependant, le rôle attribué à ces facteurs est celui de cellules progénitrices contribuant à la fois à la croissance musculaire et au maintien d'un réservoir de cellules progénitrices/ souches en prolifération. Les cellules souches se situent en périphérie de chaque fibre musculaire mononucléée et sont appelées cellules satellites.

L'interaction entre les facteurs Pax et les gènes de facteurs de régulation musculaire (MRF) détermine probablement l'auto-renouvellement des cellules satellites [91]. La perte progressive des cellules satellites et un défaut important dans la régénération musculaire, ont été observés chez une souris après blocage du gène Pax7 [91, 92]. En l'absence de Pax3 et Pax7, les cellules progénitrices musculaires ne sont pas destinées à rester seulement spécifiques du muscle squelettique.

La mutation génétique de Pax3 et Pax7 est impliquée chez l'homme dans des cancers et dans une maladie grave (syndrome de Waardenburg) [93]. C'est pourquoi de grands espoirs thérapeutiques sont fondés sur la manipulation génétique de ces facteurs. Ainsi, la DMD ou la perte musculaire liée à l'âge par baisse du taux de cellules satellites pourraient être traités [94, 95].

IV.1.3) Transporteurs du glucose et PPAR-δ

Le métabolisme du glucose et des acides gras dans le muscle squelettique est le principal mécanisme par lequel l'énergie est fournie lors d'une activité physique. La disponibilité du glucose est un des facteurs cruciaux de la performance du muscle squelettique qui pourrait être utilisée pour le dopage. Les transporteurs du glucose sont des protéines capables de stimuler le flux de glucose à la fois à l'extérieur et à l'intérieur des cellules telles que les cellules musculaires.

A l'image des protéines de transport d'acide gras, les *Glucose Transporters* (GLUT) constituent une famille de sept protéines étroitement apparentées. Chacune d'elles étant désignées GLUT-1 à GLUT-7 [96].

La protéine GLUT-1 est le principal transporteur du glucose au travers de la barrière hématoencéphalique. Son déficit est à l'origine d'un syndrome associant une épilepsie pharmacorésistante, un retard psychomoteur et des signes pyramidaux.

La protéine GLUT-4 est quant à elle exprimée dans les tissus insulino-sensibles et se caractérise par sa faculté de déplacement entre la zone intracytoplasmique et la membrane plasmique sous l'effet de l'insuline [97].

Des expériences réalisées chez des souris transgéniques ont montrées que l'utilisation spécifique du glucose, dans le muscle squelettique ou cardiaque, pouvait être améliorée par la surexpression du gène codant pour GLUT-4 [98]. Des stratégies thérapeutiques visant à accroître l'expression de GLUT-4 dans le muscle squelettique ont donc été proposées pour le traitement du diabète de type 2. Ces stratégies y compris celles caractérisées par l'inhibition de la *Protein Tyrosine Phosphatase 1-B* (PTP-1B) sont à surveiller pour éviter un abus dans le dopage.

Les PPAR-δ sont des protéines appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Ils contrôlent de nombreuses fonctions physiologiques, notamment en matière de développement et de métabolisme, et agissent comme facteurs de transcription des gènes cibles impliqués dans l'adipogenèse (Figure 13).

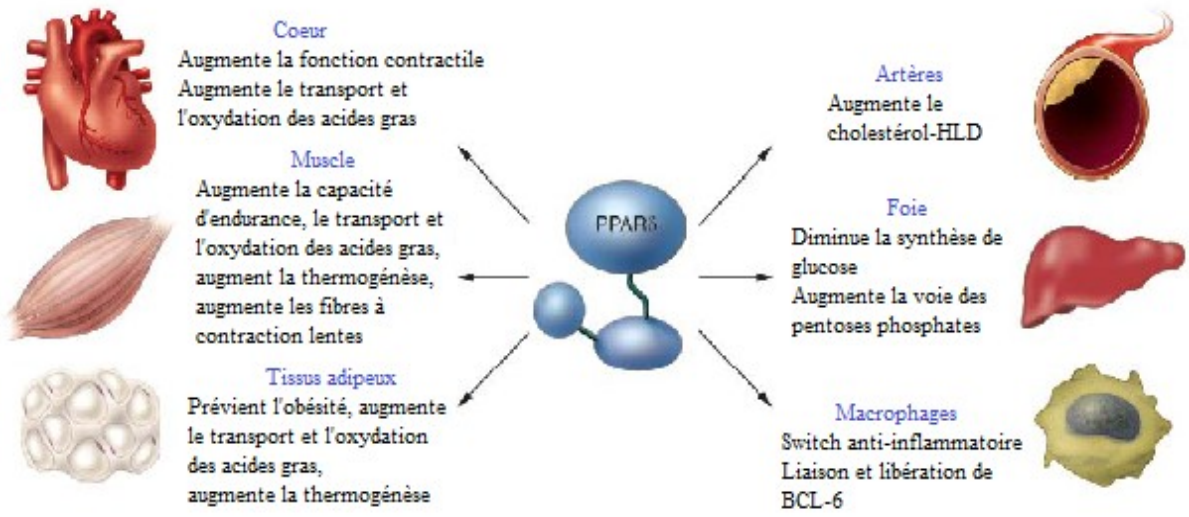


Figure 13 : Implication de PPAR-δ dans la régulation du développement et dans le métabolisme des lipides.
D'après BARISH G., NARKAR V., EVANS R. PPAR delta : a dagger in the heart of the metabolic syndrome. *J Clin Invest*, 2006, p. 590.

Il existe trois isoformes de PPAR : α, β/γ et δ. Les rôles des PPAR α et β/γ sont connus, depuis la commercialisation de leurs agonistes pharmacologiques, respectivement les normolipémiants de la classe des fibrates, et les antidiabétiques de la classe des thiazolidinediones.

Les fonctions de PPAR- δ sont quant à elles partiellement connues, même si des données relativement récentes mettent en évidence son rôle dans la régulation des acides gras dans différents tissus tels que le muscle squelettique et le tissu adipeux. Des expériences réalisées sur des souris transgéniques ont révélé qu'une surproduction de PPAR-δ se traduisait d'une part par une transformation des fibres musculaires rapides (type II) en fibres musculaires lentes (type I) et d'autre part par une augmentation de la capacité oxydative du muscle. Ces souris ont été en mesure d'exécuter deux fois plus de distance sur un tapis roulant que leurs homologues non génétiquement modifiés. Dans un même temps, les souris ont été protégées contre les conséquences néfastes d'une alimentation riche en matières grasses ne présentant aucun gain de poids, ni de résistance à l'insuline ou de diabète de type II [99].
Ces souris ont été surnommées « souris marathoniennes ».

Par ailleurs, des investigations chez l'homme semblent avoir confirmé la relation entre le PPAR-δ et l'endurance [100]. En effet, les cyclistes professionnels ont une proportion significativement plus grande de fibres musculaires de type I que le reste des individus.
La conversion de leurs fibres musculaires s'accompagne également d'une meilleure sensibilité à l'insuline, c'est-à-dire une plus grande quantité de glucose transportée vers le muscle.
Ces constatations supposent qu'il pourrait être possible d'influencer l'endurance par le biais de manipulations génétiques au niveau du muscle squelettique. Des laboratoires pharmaceutiques Américains mettent déjà au point des médicaments agonistes de PPAR- δ qui pourraient dans le futur être utilisables à des fins de dopage [101].

IV.1.5) EPO

L'érythropoïétine (EPO) est une glycoprotéine qui est synthétisée principalement dans les reins mais également dans le foie et d'autres organes. Cette hormone joue un rôle clé dans l'hématopoïèse comme facteur de régulation en augmentant le nombre d'érythrocytes (globules rouges) par interaction avec les récepteurs médullaires de l'EPO (EPOR). Des niveaux élevés d'EPO dans le sérum stimulent l'érythropoïèse entraînant une hausse des taux d'hémoglobine, d'hématocrite et un renforcement de la quantité d'oxygène délivrée aux tissus.

Le gène codant pour l'EPO a été isolé en 1983. Il a été produit avec succès par des techniques de recombinaison dans des cellules d'Escherichia Coli en 1984 puis dans des cellules de mammifères en 1985. L'EPO a été l'un des premiers médicaments produits par génie génétique à grande échelle et depuis sa mise sur le marché en 1989, il a été de loin le plus vendu. L'important succès des premiers produits d'EPO a donné lieu à de nombreuses stratégies thérapeutiques visant à accroître l'activité moléculaire de l'EPO, de faciliter son administration, ou d'améliorer sa tolérance.

Ceci n'a pourtant pas pu empêcher l'EPO d'être réputée comme l'une des méthodes de dopage les plus utilisées dans les sports d'endurance [102]. L'un des exemples utilisant l'EPO comme produit dopant est le médicament MIRCERA® du laboratoire Roche.

Cette EPO dite de 3ème génération est normalement indiquée dans le traitement de cancers mais surtout d'anémie sévère chez des patients dialysés où la formation de sang est altérée en raison d'une maladie rénale sous-jacente.

Un grand nombre de sportifs, dont des cyclistes professionnels, ont été persuadés que cette EPO de 3ème génération était indétectable tant par bilan urinaire que par bilan sanguin. Cette affirmation ne s'est pas révélée être exacte puisqu'après le Tour de France 2008 plusieurs cyclistes ont été accusés de dopage avec ce type d'EPO par observation dans leur sang de taux anormaux d'hématocrite, associés à d'autres anomalies biologiques. C'est une des raisons pour lesquelles le dopage par transfert de gène de l'EPO doit être aujourd'hui fortement suspecté dans le milieu sportif.

Plusieurs approches concernant le transfert de gène de l'EPO ont été développées *in vivo* et *ex vivo* chez les animaux. En effet, la transfection d'EPO par AAV après injection IM ou électroporation chez des souris a été réalisée avec succès [103]. Une augmentation des concentrations plasmatiques d'EPO a pu être obtenue [104].

Cependant, afin d'éviter les effets indésirables associés à des niveaux excessifs de production d'EPO tels que la polyglobulie, l'hypertension, l'hyperviscosité du sang et l'insuffisance cardiaque, des systèmes régulant l'expression du transgène ont été développés.

Les systèmes de régulation mis au point sont les suivants :

- Agents pharmacologiques : tétracycline (antibiotique), rapamycine (un immunosuppresseur), mifépristone (anti-progestérone) et ecdysone (hormone stéroïdienne d'insecte).
  Le principe théorique de ces quatres systèmes de régulation est d'associer au transgène un de ces systèmes. L'expression du transgène est placée sous le contrôle d'une molécule exogène appelée inducteur. Cet inducteur joue en quelque sorte le rôle d'un interrupteur. Si l'inducteur est présent, il y a production de la protéine, et inversement. La quantité de protéine produite reste proportionnelle à celle de l'inducteur administré. C'est ainsi que la production de protéine peut être maîtrisée.

- Molécules physiologiques : glucose, oxygène

  Ce système de régulation fait appel à un médicament de thérapie génique, mis au point en 2000-2002 par Oxford Biomedica, appelé REPOXYGEN®. Il s'agit du gène de l'EPO associé à un inducteur. L'inducteur est un élément sensible à l'hypoxie. Ainsi, lorsque la pression partielle de l'oxygène dans le sang diminue, l'injection de REPOXYGEN® dans le muscle permet de produire de l'EPO. Par contre, dès que le taux d'hématocrite atteint sa valeur normale, la production d'EPO s'arrête. Aucun essais cliniques n'a jusqu'alors été réalisé chez l'homme car le développement du produit a été suspendue.

  Toutefois, son intérêt n'est pas à négliger chez des futurs sportifs voulant se doper. En effet, si le REPOXYGEN® est utilisé conjointement avec des chambres hypobares ou hypoxiques, il en résulte une augmentation de la production d'EPO pendant la nuit en chambre hypoxique, et inversement le jour en normoxie.

  Enfin, d'autres procédés existent mais sont à l'étude. L'un d'entre eux consiste à injecter en intradermique des lentivirus modifiés qui portent le gène de l'EPO et dont la production est activée grâce à un corticoïde sous forme de pommade [105].

IV.1.6) Angiogenèse et *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF)

L'angiogenèse est un terme qui désigne la croissance des petits vaisseaux sanguins et des capillaires. Ce terme n'est pas à confondre avec la nouvelle formation des vaisseaux sanguins appelée vasculogenèse.

Le VEGF est un important facteur de croissance dans le contrôle de l'angiogenèse. Sa principale fonction est d'activer certains types de cellules tels que les cellules endothéliales, musculaires lisses, les péricytes qui sont responsables de la formation des parois des vaisseaux. Une expression accrue de VEGF augmente la perfusion tissulaire et la distribution d'oxygène au cœur, aux muscles, au foie et aux autres organes. C'est la raison pour laquelle le VEGF fait partie des cibles potentielles de « dopage génétique » pour des athlètes voulant augmenter leur endurance.

Stimuler la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins dans le cœur ou des membres ischémiques a été étudié comme stratégie thérapeutique pour le traitement de patients atteints de maladie vasculaire avancée. En effet, des essais cliniques ont été réalisés chez l'homme *in vivo* soit par injection intramyocardique de VEGF sous la forme d'ADN nu plasmidique, soit par injection intracoronarienne au moyen de vecteurs viraux. Ces essais ont démontré que le facteur de croissance angiogénique pouvait être utilisé dans le traitement de la *Peripheral Arterial Disease* (PAD) et de l'ischémie [106, 107, 108].

Un grand nombre de chercheurs travaillent sur la stimulation d'une meilleure capillarisation des tissus basée sur l'utilisation de facteurs de transcription tels que l'*Hypoxia-Inductible Factor 1alpha* (HIF) 1α [109].

Cependant, plusieurs effets négatifs sont associés à l'utilisation de gènes angiogéniques. Les principaux effets retrouvés sont un risque accru de maladies néoplasiques, de tumeurs malignes et l'aggravation d'athérosclérose ou de rétinopathie [109, 110].

IV.1.7) Gènes de réparation de fracture

Les entraînements et les compétitions provoquent sur les sportifs de haut niveau des contraintes importantes tant au niveau des os, des ligaments qu'au niveau des cartilages et des tendons. Cela laisse supposer que la performance athlétique peut être améliorée par la capacité des tissus musculaires à résister aux blessures et/ou à être réparés plus efficacement en réduisant la douleur et l'inflammation des traumatismes répétés.

Le développement du tissu osseux implique l'activation de plusieurs gènes conduisant à la différenciation des ostéoblastes à partir des cellules mésenchymateuses.
La régulation de ce processus implique plusieurs protéines osseuses spécifiques et non spécifiques, des facteurs de transcription et de croissance tels que l'IGF-1, le *Fibroblast Growth Factor* (FGF), les *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) et le VEGF [111, 112].

Des méthodes de thérapie génique *in vivo* ont été utilisées avec succès chez des animaux en insérant des facteurs de croissance de gène directement dans la lésion osseuse ou musculaire afin de guérir les fractures.

Les adénovirus ont été les plus appropriés pour vectoriser les gènes codants pour les BMP [114, 115]. Cependant, ces vecteurs de gènes ne sont pas les seuls à avoir été employés. En effet, d'autres études chez l'animal ont utilisé des AAV et des lentivirus pour transfecter les gènes nécessaires aux BMP [111-113].

Par ailleurs, les progrès de transfert de gène sont moins avancés pour le traitement des ligaments, tendons et cartilages qui subissent fréquemment des blessures.
Le cartilage est un tissu avasculaire, alymphatique et non innervé. Il ne possède pas la capacité intrinsèque de guérir, et reste difficile à réparer avec les procédés médicaux existants [113, 114]. L'utilisation de la thérapie génique a été proposée comme une alternative aux procédés chirurgicaux et pharmacologiques pour la réparation du cartilage. Afin d'améliorer la chondrogenèse, plusieurs techniques expérimentales de manipulations génétique de la moelle osseuse (chondrocytes, cellules mésenchymateuses) ont été utilisées en culture cellulaire puis sur des animaux [113-115].

Un nombre limité d'études de thérapie génique *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* ont été effectuées ces dernières années sur les ménisques, les ligaments et les tendons. Ceux-ci ont également une capacité limitée à guérir spontanément et d'autant plus qu'ils sont souvent endommagés dans le sport.

La thérapie génique ne semble pas encore prête à donner aux sportifs la possibilité d'accélérer la guérison de leurs muscles, os, cartilages, tendons et ligaments.
Le jour où ces méthodes de thérapie génique seront au point, il est probable que leurs mésusages chez des athlètes ne se trouvent pas dans l'optique de la réparation d'un tendon blessé mais plutôt dans celle de l'amélioration de sa résistance en prévision d'une compétition.

IV.1.8) Gènes soulageant la douleur

La variabilité est inter-individuelle dans la perception de la douleur et la réponse aux agents analgésiques et connue depuis de nombreuses années. Même si les opioïdes sont très utilisés dans le traitement des douleurs aigües et chroniques, la réponse obtenue est variable selon les individus tant au niveau de leur efficacité que de leur tolérance ou de leurs effets indésirables.

De plus, l'utilisation en continue de ces médicaments opioïdes est limitée par la nature des effets indésirables tels que la sédation, la constipation et la dépression respiratoire.
Les opioïdes interfèrent avec les substances naturelles produites dans l'organisme (endorphines et enképhalines) en se fixant sur leurs récepteurs afin d'inhiber la sensation de douleur.
Malgré toutes les mises en garde que suscitent les opioïdes, de nombreux sportifs continuent de les utiliser dans le but de repousser les limites physiologiques de leur organisme, en augmentant le seuil de résistance à la douleur.

Cependant, il est possible que les sportifs s'orientent vers une nouvelle stratégie thérapeutique de suppression de la douleur qui implique le transfert de gène.
Récemment, plusieurs équipes de chercheurs ont montré l'intérêt potentiel des transferts de gènes, médiés par divers vecteurs, dans des modèles animaux de douleurs chroniques.
En effet, un premier transfert de gène codant pour des précurseurs peptidiques opioïdes (acide glutamique décarboxylase, pro-opiomélanocortine, préproenképhaline) a permis de produire de grandes quantités de peptides physiologiquement actifs [116, 117, 118]. L'un des vecteurs a avoir été les plus utilisés est celui dérivé de l'HSV-1 en raison de sa forte affinité naturelle pour les neurones sensoriels périphériques.

Dans des modèles expérimentaux de douleur de type inflammatoire, neuropathique ou associée à un cancer des os chez le rat, l'injection sous-cutanée *in vivo* de HSV-1 contenant l'ADN complémentaire des précurseurs peptidiques opioïdes a montré la diminution de l'hyperalgésie consécutive à l'inflammation [116, 117, 119]. Les premières réussites de ces approches expérimentales pourront à l'avenir être détournées à des fins de « dopage génétique » dans le seul but d'améliorer la performance athlétique en faisant produire plus d'endorphines.

Ainsi, les sportifs s'exposeront à de nombreux risques tant sur la mauvaise innocuité des vecteurs que sur la dépendance aux peptides endogènes. Cette dépendance se manifestera même après la fin de carrière professionnelle des sportifs en favorisant les toxicomanies aux drogues dites « dures ».

IV.2) Risques et effets indésirables pour la santé

D'un point de vue général, la connaissance des risques pour la santé des médicaments et des autres méthodes thérapeutiques est acquise par l'observation des patients traités avec la plus petite dose efficace possible.

En revanche quand il s'agit d'une utilisation détournée de la thérapie génique cela implique une situation physiologique différente très peu prévisible d'autant plus qu'aucune de ces méthodes n'a été testée pour une amélioration de la performance chez des individus sains. En effet, transférer un gène ne peut pas avoir d'effets prévisibles sachant que le génome humain ressemble d'avantage à un ensemble d'écosystèmes intriqués, présentant des interactions complexes entre les gènes eux-mêmes et l'environnement interne et externe. Par exemple, une souris génétiquement modifiée peut mourir de vieillesse bien avant que des complications à long terme du transfert de gène n'apparaissent, tandis qu'un sportif âgé de vingt ans s'exposera à plusieurs dizaines d'années d'incertitude, pendant lesquelles des conséquences catastrophiques pourront se manifester.

C'est pourquoi les risques pour la santé, découlant d'une mauvaise utilisation des méthodes de thérapie génique à des fins de dopage, ne peuvent pas être évalués de façon aussi fiable que dans le cadre des essais cliniques des médicaments. Néanmoins, il est possible d'identifier certains risques spécifiques liés à la modification de l'activité du gène (Cf. Annexe 8). Une distinction peut donc être faite entre les risques résultant de l'insertion de matériel génétique et les risques résultant de la manipulation génétique [120].

IV.2.1) Risques résultant de l'insertion de matériel génétique

Dans son état actuel de développement, la thérapie génique est au même titre que des nouvelles substances pharmacologiques dont les résultats à très long terme demeurent inconnus. Avec les systèmes de vecteurs d'insertion habituellement utilisés, il est impossible de contrôler l'endroit précis du génome où l'ADN étranger a été inséré.

Lorsque les vecteurs non viraux sont utilisés, par exemple l'injection directe d'ADN plasmidique dans le tissu musculaire, ils provoquent des réactions inflammatoires locales [121]. Les vecteurs viraux déclenchent habituellement des réactions systémiques qui peuvent être graves dont les symptômes sont proches de ceux de la grippe. Ces réactions peuvent être dues à la toxicité intrinsèque résiduelle des virus. En effet, même si les virus ont été préalablement modifiés de façon à ne plus être infectieux, il existe toujours une éventualité qu'ils ne soient pas complètement inactifs.

La simple administration du vecteur viral suffit à déclencher un processus immunitaire avec accumulation locale de lymphocytes cytotoxiques entraînant un processus de cytolyse tumorale. C'est ce qui a été constaté dans le cancer du poumon où l'injection dans la tumeur d'un adénovirus porteur d'un gène a suffi pour obtenir la régression de cette tumeur.

Par ailleurs, les vecteurs viraux peuvent entraîner également une réaction plus grave lorsque le système immunitaire rejette les protéines produites par les gènes injectés. Il s'agit dans ce cas de réaction auto-immune car le système immunitaire ne se défend pas contre une intrusion extérieure, mais contre un élément de l'organisme.

IV.2.2) Risques résultant de la manipulation génétique

Compte tenu de la complexité de l'activité intracellulaire des gènes, il est compréhensible que la manipulation de ces mécanismes puisse conduire à une variété d'effets secondaires causant potentiellement des dommages graves pour la santé. En effet, les interactions d'un gène avec les séquences génétiques voisines influent fortement sur son fonctionnement et sa régulation. Si la régulation du gène est mauvaise cela entraîne la formation d'une trop grande quantité du produit génique avec comme conséquence l'apparition de nombreux effets indésirables.

Cependant, aucun scientifique ne peut se prononcer aujourd'hui sur les dangers à long terme de la thérapie génique. Seules des suppositions sont envisagées au vu des effets connus de certains gènes qui se prêtent au « dopage génétique » tels que l'IGF-1 et l'EPO .

L'IGF-1 utilisé à des fins de dopage pour augmenter la masse musculaire fait croître non seulement les cellules musculaires, mais aussi toutes les cellules de l'organisme.
Le dopage utilisant le gène qui code pour l'IGF-1 peut donc perturber le métabolisme et entraîner une prolifération incontrôlée des cellules. Les conséquences seraient donc fatales si des cellules tumorales venaient à se multiplier. Ainsi, il se développerait une tumeur bénigne ou maligne à partir d'une seule cellule dégénérée par dopage à l'IGF-1 qui, dans des conditions normales, serait détectée et éliminée par les mécanismes de contrôle de l'organisme.

L'EPO utilisé comme moyen de dopage expérimental chez des souris montre un certain nombre de conséquences. En effet, les souris dopées par l'EPO vivent moins longtemps et plusieurs de leurs organes ainsi que leur système nerveux sont endommagés.
De plus, le REPOXYGEN® présente également des effets indésirables graves sur les souris tels que des réactions allergiques, une hypotension, un épaississement du sang, des thromboses, des anémies sévères voire un arrêt cardiaque. Bien que ces effets secondaires varient certes d'une étude à l'autre, globalement les risques d'un « dopage génétique » à l'EPO sont considérés comme nettement plus élevés que ceux du dopage à l'EPO traditionnel [122].
Ces effets secondaires pèsent d'autant plus lourd puisque les modifications du patrimoine génétique sont irréversibles et car l'effet du « dopage génétique », accompagné de ses effets indésirables, se font sentir toute la vie.

V / Détectabilité

Le « dopage génétique » pourra être prouvé si trois conditions de base sont remplies. Tout d'abord, l'information sur les méthodes et les médicaments pouvant être utilisés pour le dopage doit être disponible, ensuite les méthodes de détection doivent être efficace, fiable, valide et enfin un système de contrôle antidopage doit s'appliquer non seulement aux compétitions mais aussi aux entraînements.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de dépistage spécifique du « dopage génétique ». Les tests urinaires et sanguins pratiqués de nos jours se révèlent en effet inefficaces car ils ne permettent pas de détecter directement un gène de synthèse inséré dans l'organisme.

Toutefois, ce gène laisse des traces détectables puisque des récentes recherches ont montré qu'il existait des moyens de dépister l'utilisation de matériel génétique pour améliorer ses performances sportives.

Le problème majeur que rencontre les procédés de dépistage du « dopage génétique » est que le produit d'un gène de synthèse inséré dans l'organisme ne se distingue pas de celui produit par l'organisme de l'athlète. L'AMA encourage donc les chercheurs à résoudre ce problème en misant sur plusieurs techniques à savoir la détection de segments génétiques typiques pour un transfert de gène; la détection directe de la séquence génique insérée dans l'organisme; la détection de l'activité d'autres gènes influencés par le « dopage génétique ».

V.1) Détection de segments génétiques typiques : ADN transgénique

Les produits de gènes transgéniques ne se différencient pratiquement pas de ceux des gènes présents dans l'organisme. Néanmoins, il existe des différences entre ces gènes qui pourraient suffire à développer un test de détection de « dopage génétique ».
L'ADN implanté est dépourvu de certaines séquences présentes dans tous les gènes naturels. Ces séquences sont appelées introns. Ce sont des segments du patrimoine génétique qui sont éliminés après la lecture du gène et qui contiennent non pas des informations codantes mais des ordres. La distinction entre l'ADN naturel et l'ADN transgénique (ADNt) peut ainsi être établie par la recherche des introns. C'est ainsi qu'une technique fut mise au point sur l'absence d'introns de manière à détecter les traces les plus infimes d'ADNt dans le sang.

Cependant, l'une des principales difficultés que rencontre cette méthode est que la concentration d'ADNt est extrêmement faible. Dans le sang d'un athlète supposé dopé génétiquement, l'ADNt ne représente en effet qu'un pour mille de l'ADN total. Cette concentration baisse d'autant plus que le transfert de gène est ancien.

Toutefois, ce problème peut être résolu à l'aide d'un nouveau processus appelé *Primer-internal Intron-Spanning* PCR (spiPCR). En effet, les difficultés techniques liées d'une part à l'absence de connaissance des séquences d'ADN transgénique médiées par des vecteurs viraux, et d'autre part à l'homologie entre la protéine produite par « dopage génétique » et celle naturelle, peuvent être surmontées grâce à la spiPCR (Figure 14).

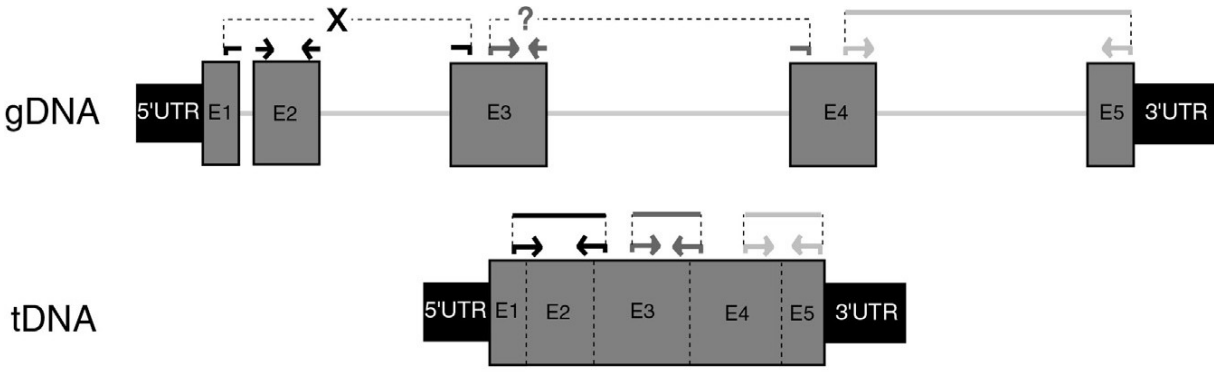


Figure 14 : Principe de la spiPCR.

D'après : BEITER T., ZIMMERMANN M., FRAGASSO A., [*et.al.*]. Establishing a novel single-copy primer-internal intron-spanning PCR (spiPCR) procedure for the direct detection of gene doping. *Exerc Immunol Rev*, 2008, vol. 14, p. 73-85.

Légende :

- Amorce sens liée
- Amorce anti-sens liée
- Partie de séquence utilisée pour le dopage
- ? Amplification éventuelle par PCR
- X Pas d'amplification par PCR
- E1 Exon 1
- Intron/Produit de PCR
- Amorce incapable de se lier

De façon générale la technique de PCR implique le choix d'amorces spécifiques qui se lient à une séquence d'ADN connue. Ces amorces sont associées aux quatres désoxyribonucléotides (dNTP) et à l'enzyme Taq Polymérase (ADN polymérase thermostable) pour provoquer la réplication de l'ADN par multiplication exponentielle.

Le principe de la spiPCR est d'utiliser des amorces se liant uniquement à des séquences d'exons (mais aussi d'introns). Toutefois, ce type d'amorces ne peut être fonctionnelle qu'à partir du moment où suffisamment de séquences d'exons sont connues pour pouvoir déclencher la réplication de l'ADN. La spécificité des amorces est maximale pour l'ADNt car celui-ci ne contient aucun intron à la différence de l'ADN génomique [123].

Cette différence entre l'ADNt et l'ADN génomique est utilisée comme méthode de détection de « dopage génétique ». Comme l'illustre la figure 14, les amorces doivent être choisies en tenant compte à la fois de la spécificité des séquences de gènes mais aussi de la sensibilité de l'amplification de l'ADNt. Seule la taille des séquences amplifiées permettra de distinguer l'ADN génomique de l'ADNt.

La spiPCR se présente donc comme une méthode prometteuse pour la détection du « dopage génétique » avec comme objectif d'être capable de déterminer précisemment la séquence de gènes intervenant dans l'amélioration de la performance physique.

V.2) Détection directe d'un gène inséré

La détection directe de l'insertion d'un gène dans l'organisme pourrait être démontrée facilement, compte tenu de la sensibilité des techniques de détection d'ADN, d'ARN, en procédant à une biopsie des tissus supposés avoir reçu le gène. Pour cela un prélèvement d'une petite quantité de tissu musculaire serait nécessaire pour tester la présence ou non d'ADN étranger ou d'une protéine modifiée. En effet, le transfert de gène dans le muscle pour produire des protéines peut être facilement détecté, car une étude a montré que la glycosylation de l'Epo produite à partir du muscle squelettique diffère de celle produite par le rein [124]. Malheureusement, cette intervention est assez lourde et n'est pas encore acceptée d'un point de vue réglementaire car elle nécessite l'emploi d'une aiguille à biopsie et d'une anesthésie locale causant de nombreux dommages dont la formation d'hématome.

A ces difficultés techniques de réalisation s'ajoute le fait que la zone d'échantillonnage prélevée ne peut pas être représentative de tout le muscle, et encore moins lorsque le muscle libère des niveaux faibles de matériel génétique dans la circulation sanguine après un effort physique [125]. La biopsie tissulaire n'est donc pas encore envisageable pour devenir une méthode standard de dépistage du « dopage génétique ».

V.3) Détection d'une activité génétique modifiée

L'insertion de gènes dans l'organisme par le biais du « dopage génétique » provoque des changements inhabituels au niveau du métabolisme des tissus, de la concentration de cellules sanguines et des hormones peptidiques. Ces modifications peuvent être le résultat d'un « dopage génétique » et permettre de confondre les athlètes coupables.

Néanmoins, avant d'être en mesure d'utiliser ces changements d'expression de gènes comme preuve de dopage, des variations de profils génétiques interindividuel, de régimes alimentaires et de facteurs environnementaux sont à prendre en compte. Ce qui impose une surveillance permanente de chaque athlète en prélevant des échantillons pour déterminer des valeurs normales de référence. Ainsi, les athlètes qui présentent par exemple un profil sanguin avec des variations rapides ne peuvent plus prétendre que cela résulte d'un entraînement intensif.

L'une des techniques à l'étude pour visualiser la localisation inhabituelle de l'expression de gènes est un procédé d'imagerie tel que la Tomographie par Résonance Magnétique (TRM). Cependant, ce procédé se veut être très coûteux. D'autres méthodes sont mises au point pour mettre en évidence des activités génétiques anormales dans certains tissus tels que le tissu musculaire. En effet, le Professeur Jordi Segura de l'unité de recherche en pharmacologie de Barcelone étudie la production d'EPO dans les cellules musculaires. Le but de ses recherches est de montrer qu'une hormone issue d'un gène approprié peut avoir des modifications post-traductionnelles qui ne seraient pas les mêmes dans les muscles et dans les reins [126].

L'AMA encourage depuis 2002 le dépistage du « dopage génétique » pour protéger les athlètes et l'éthique du sport en développant, en collaboration avec le Comité d'Orientation Scientifique (COS), des projets de méthodes de détection (Cf. Annexe 9).

VI / Conclusion

A ce jour de nombreux gènes, dont les produits peuvent affecter les performances physiques, sont des candidats potentiels pour le « dopage génétique ».
Beaucoup de ces gènes découverts se trouvent être liés à des maladies humaines pour lesquelles une recherche intensive est menée dans l'élaboration d'approches de traitement par thérapie génique.

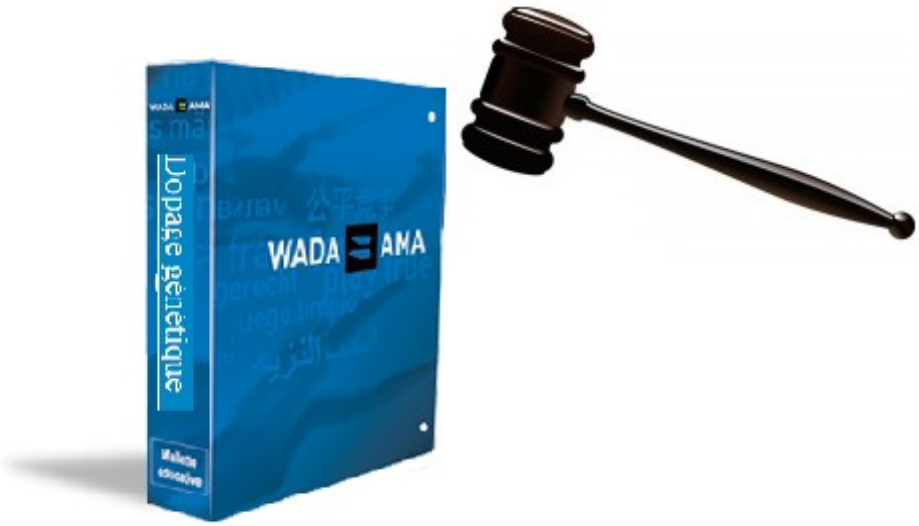
Les connaissances issues de ces recherches seront sans aucun doute d'un grand intérêt pour les sportifs et leur entourage afin de bénéficier d'un avantage injuste.
Néanmoins, la recherche dans les domaines de conception, transfection de vecteurs et de contrôle de l'expression des gènes est encore au stade de développement.

La thérapie génique chez l'homme est une réalité seulement pour un très petit nombre de maladies phénotypiques. Toute personne qui aura recourt à la manipulation génétique illicite prendra des risques de santé majeurs, sans nécessairement bénéficier des effets escomptés.

Le « dopage génétique » sera une menace pour le sport dans la mesure où l'amélioration de la performance physique pourra être réalisée en utilisant les technologies actuelles. Néanmoins, de nombreux scientifiques travaillent sur l'élaboration de méthodes novatrices, spécifiques, sensibles et non invasives pour détecter le « dopage génétique ».

PARTIE III

Situation actuelle des procédures d'interdiction et point de vue éthique



I / Introduction

Les progrès en biotechnologie font craindre le développement du « dopage génétique ». Alors que les thérapies de transfert de gène sont relativement immatures et non applicables de façon généralisée chez l'homme, la possibilité d'amélioration de la performance offerte, et l'absence de technique de détection fiable rendent cette dérive séduisante pour certains athlètes.

Etant donné les risques de la thérapie génique et les conséquences imprévisibles de son utilisation, les organisations sportives internationales, agissant au nom de la sécurité des athlètes et du fair-play, ont unanimement condamné la pratique de la modification génétique dans le sport. Cependant, l'application du modèle punitif mis en place par l'AMA se heurte non seulement à la difficulté de dépistage génétique mais aussi à l'éventuelle acceptation sociale de la pratique de modification génétique.

L'idée de modification génétique des cellules germinales ou de dépistage génétique soulève un grand nombre de questions éthiques. Doit-on considérer le « dopage génétique » au même titre que l'usage illicite de stéroïdes ? La modification génétique n'est-elle pas plutôt une innovation technologique admissible qui permet seulement à l'athlète de mieux exprimer ses propres compétences, comme des suppléments nutritionnels ou une raquette de tennis en graphite ?

II / Le cadre international de lutte contre le dopage

II.1) Efforts de réglementation

Au cours des dix dernières années, les réglementations en matière de dopage ont été de plus en plus harmonisées. Une série d'affaires de dopage embarrassantes, en particulier dans le domaine du cyclisme et du sprint, a conduit le Comité International Olympique (CIO) à faire une conférence mondiale sur le dopage dans le sport à Lausanne, en Suisse, en 1999. A l'issu de cette conférence, qui réunissait les Fédérations Internationales de sports et les Comités Nationaux Olympiques, a été créée l'AMA.

L'AMA a été chargée de superviser le développement de politiques internationales anti-dopage avec deux objectifs principaux : celui de protéger le bien-être des athlètes et de promouvoir un sport plus juste [127]. Une des fonctions les plus importantes de l'AMA est la publication et la mise à jour continue du Code mondial anti-dopage, qui contient la liste de toutes les substances et méthodes interdites. Tous les pays jouent individuellement un rôle majeur dans le suivi des athlètes et le respect des normes internationales. C'est le cas de l'Agence contre le dopage des Etats-Unis (USADA) qui mène des politiques anti-dopage dans son pays depuis novembre 2001.

II.2) Organismes de réglementation et modification génétique

La menace de la modification génétique dans le sport n'a cessé d'être évoquée dans les discussions sur le dopage au cours des dix dernières années. Les experts et les organisations sportives reconnaissent le « dopage génétique » comme une menace d'avenir auquel ils devront probablement être confrontés.

Ces organisations mènent des actions préventives et pénales afin de décourager les demandes illicites de technologies génétiques par certains sportifs ou leur entourage.
En effet, le 9 janvier 2006 un entraîneur Allemand a comparu devant le Tribunal d'instance de Magdebourg pour avoir exercé de façon illégale la médecine en ayant injecté à trois reprises du REPOXYGEN® chez des athlètes mineurs [128].

II.2.1) Les premières recommandations

Peu après la création de l'AMA, le CIO a convoqué un groupe de travail pour établir des protocoles et méthodes de détection de « dopage génétique ». Pour cela le CIO a conseillé de s'appuyer sur le développement et l'application de la thérapie génique pour la prévention et le traitement des maladies humaines.

Depuis plusieurs années plus d'une demi-douzaine de grands symposiums sur le sujet du « dopage génétique » ont eu lieu avec de nombreux organismes autres que le CIO tels que l'Association américaine pour l'avancée de la Science (AAAS) et le Conseil du Président des Etats-Unis pour la bioéthique (PCBE) [129].

L'un des symposiums les plus importants organisé par l'AMA en 2002, a été celui se déroulant à Banbury. Les membres ayant contribué à ce symposium ont encouragé les gourvernements nationaux à coopérer dans le but d'établir un cadre de travail s'appliquant aux technologies de transfert de gène et à leurs abus dans le domaine du sport. Les résultats issus de cette conférence ont été deux principales recommandations.

La première recommandation a été de lancer un programme de recherche pour la détection du « dopage génétique ». Ce programme a été mis en place et largement financé par l'AMA. En effet entre 2003 et 2007, l'AMA a donné vingt-et-une subventions dans le domaine de la génomique, la protéomique, la détection virale, la bio-informatique et l'imagerie afin de détecter les gènes dopants [130]. Ces subventions représentaient 7,8 millions de dollars. En plus de ses ressources financières, l'AMA a réuni un panel composé de cinq chercheurs réputés dans différents domaines de la génétique.

A ce jour les membres du panel, présidé par le Professeur Theodore Friedmann de l'Université de San Diego, conseillent le Comité « Santé, médecine et recherche » de l'AMA à propos du « dopage génétique » pour s'assurer que l'Agence dispose des informations les plus à jour. Ils encouragent également la recherche et le développement de nouveaux moyens d'expertises.

La deuxième recommandation a été pour l'AMA et d'autres organismes de réglementation d'inclure les définitions de modification génétique et de transfert de gène à la liste des substances dopantes et méthodes interdites du Code mondial anti-dopage [131]. Le « dopage génétique » est inclus depuis 2009 à la liste des interdictions (Cf. Annexe 10).

II.2.2) Attitude actuelle

La proscription du « dopage génétique » dans le Code mondiale anti-dopage caractérise la position actuelle à l'encontre de l'athlète « génétiquement modifié ». L'AMA organisa un troisième symposium à Saint-Pétersbourg (Russie) en 2008 faisant à la suite de ceux tenus à Banbury et à Stockholm (Suède) [132]. Ce troisième symposium permis de faire le point sur les avancées en matière de transfert de gène à des fins thérapeutiques et de détection du « dopage génétique ». Les membres participants ont pu discuter des limites entre la thérapie génique et l'amélioration de la performance sportive d'un point de vue technique et éthique. Ce symposium fut aussi l'occasion d'examiner le cadre légal et les applications des sanctions de l'AMA envers le « dopage génétique ». En plus des arguments développés sur l'équité et l'éthique, les conclusions retenues lors de ce symposium ont été un renforcement du développement continu des méthodes de détection de transfert de gène et la volonté de protéger les athlètes contre les risques de la modification génétique.

En réponse à cela, les gouvernements du monde entier ont établi des protocoles stricts pour l'approbation des études sur la thérapie génique. Par exemple, aux Etats-Unis les chercheurs qui souhaitent entreprendre des études de transfert de gène doivent obtenir l'approbation de la FDA, du *National Institutes of Health* (NIH) et du *Recombinant DNA Advisory Committee* (RAC). Toute tentative de « dopage génétique » risque donc de se produire en dehors des procédures de surveillance de transfert de gène. La perspective du développement d'un « marché noir » de la thérapie génique pourrait compromettre la santé des athlètes.

L'AMA et d'autres organismes mondiaux ont un rôle crucial d'information et de sensibilisation auprès des athlètes. Ils ont pour obligation de fournir aux athlètes, aux entraîneurs et aux médecins des informations objectives et fiables quant aux dangers de la thérapie génique utilisée pour améliorer la performance sportive.

III / Obstacles liés à l'interdiction de modifications génétiques

III.1) Difficultés de sanctions

Dans un cadre réglementaire, les tentatives pour localiser et sanctionner les modifications génétiques sont difficiles pour un certain nombre de raisons. L'une des raisons majeure est la difficulté de détection. Il n'existe pas encore de méthode de dépistage spécifique du « dopage génétique » même si l'utilisation de la PCR a été probante. D'autres techniques en cours de développement sont envisagées telles que la biopsie musculaire mais celles-ci demeurent trop coûteuses et trop invasives.

Le « dopage génétique » constitue un réel défi en terme de réglementation. Il est vrai qu'il existe un problème de distinction entre les mutations génétiques d'origine naturelle et celles provenant du « dopage génétique » illicite. De plus, la modification génétique possède un caractère permanent. Une fois que les gènes étrangers sont insérés dans le corps de l'athlète, il n'y a aucun moyen de les retirer ni de les désactiver.

Ainsi, si les autorités anti-dopage adoptaient une politique de tolérance zéro, les athlètes en compétition accusés de « dopage génétique » seraient condamnés à vie à ne plus pouvoir faire de sport. Une telle politique ne laisserait aucune place à une seconde chance ou une opportunité de se repentir ou d'avouer la vérité. Cela serait en contradiction avec les politiques actuelles de l'AMA qui imposent une suspension de deux ans pour les athlètes qui présentent une substance prohibée ou ses métabolites.

Cette politique pourrait également poser un problème dans le contexte où les athlètes ayant obtenu une Autorisation d'Usage Thérapeutique (AUT) pour la thérapie génique souhaiteraient l'utiliser pour soigner une blessure ou autre. Les athlètes, tout comme d'autres personnes, méritent d'avoir accès aux meilleurs traitements disponibles qui peuvent inclure des traitements avec des substances interdites pour la pratique du sport en compétition [133].

Enfin, le fait de sanctionner un athlète sur la base de son patrimoine génétique, pourrait constituer une discrimination en contradiction avec le code international des droits de l'homme [134].

III.2) Dilemme éthique

Le sport s'apparente à une quête de la performance. Les méthodes et moyens utilisés pour améliorer la performance ne sont pas par nature incompatibles avec les principes éthiques. Les activités exigeant du sportif qu'il se surpasse et qu'il fasse preuve de discipline sont acceptables d'un point de vue éthique.

Cette catégorie comprend par exemple les exercices de sophrologie et de préparation mentale. De telles méthodes font partie intégrante de l'activité des sportifs de haut-niveau et ne peuvent pas être assimilées au dopage car elles correspondent à l'essence du sport.

En outre, les méthodes qui augmentent les chances de réussir sans renforcer la volonté ni forger le caractère ne sont pas acceptables du point de vue éthique. Ces méthodes font référence à l'usage de stimulants, d'hormones, d'anabolisants, d'autotransfusion, ainsi qu'au « dopage génétique ». Même si le « dopage génétique » est considéré comme immoral et frauduleux par beaucoup d'organismes mondiaux et médias [135], il suscite de nouvelles discussions par rapport au dopage traditionnel en étant au cœur d'une contreverse éthique.

L'égalité des chances dans le sport n'existe pas aujourd'hui si l'on se place dans une perspective génétique. Toutes les compétitions de haut-niveau nécessite des prédispositions génétiques. Il ne pourrait y avoir égalité des chances que si chaque individu présentait les mêmes conditions génétiques. Cependant, cet argument n'est pas conforme à la réalité d'une part parce que l'égalité des chances signifie pour chaque individu la possibilité de tirer le maximum de ses capacités naturelles, et d'autre part car l'amélioration de gènes ciblés est contraire au principe de faire du sport par plaisir.

De plus, dans de nombreux sports les compétitions se disputent par catégories comme dans les sports de combat (catégories de poids) afin de garder l'égalité des chances. De nouvelles catégories génétiques pourraient être créée pour les athlètes qui ont acquis des caractéristiques par des manipulations génétiques ciblées. Cette idée demeure absurde puisque l'objectif des athlètes est de se perfectionner dans leur catégorie et non pas de s'élever au-dessus de toutes les autres.

Par ailleurs, les méthodes génétiques ont été développées pour traiter des maladies graves et mortelles et non pas pour être utilisée dans le sport. De nombreux essais et recherches sur des animaux ont montré les avantages et capacités de la thérapie génique. Néanmoins de nombreux risques pour la santé demeurent présents et doivent être signalés aux athlètes. Exposer des jeunes athlètes à des effets secondaires et les encourager à se doper génétiquement sans leur accord est moralement indéfendable.

Le sport ne peut pas être un terrain de jeu où des apprentis sorciers se livrent à des expériences génétiques. Cette idée est difficilement défendable car de nombreux sportifs ont toujours expérimenté tous les moyens de dopages possibles et inimaginables alors qu'ils connaissaient les dangers d'une manipulation ou d'une intervention quelconque. Face à cela certains éthiciens se posent la question de savoir s'il ne faut pas s'opposer à l'interdiction du « dopage génétique » dans la mesure cela diminuerait l'usage des autres substances dopantes tout en permettant d'exprimer l'authenticité des athlètes à travers leur relation avec la technologie [136].

III.3) Impact social

Dans la société les athlètes se doivent d'être des modèles. Si ces athlètes utilisent le « dopage génétique » il est indispensable de savoir comment cette pratique sera considérée au sein même de la société. La façon dont sont traitées les technologies de modification génétique dans le milieu sportif pourra avoir un impact important dans le contexte social.

Il est possible que la société permette l'utilisation des modifications génétiques dans le sport. Dans ce cas si ce ne sont plus les organismes sportifs réglementaires qui dictent l'utilisation non thérapeutique de la thérapie génique mais la société, chaque individu aura la possibilité d'obtenir des gènes améliorant la performance sportive. Cela pourrait conduire ainsi à la création d'une « super-classe » génétique d'athlète ou d'individu [137]. Toutefois, les outils de modifications génétiques pourraient être trop coûteux pour certains, de sorte que ceux qui sont riches seraient en mesure de devenir génétiquement améliorés.

A ces craintes s'ajoute le fait que la thérapie génique puisse interférer avec le cours naturel de l'évolution. Ainsi, nous serions capable d'interrompre la sélection naturelle, ce qui pourrait de façon inattendue être dommageable à l'humanité. Toutefois, ces perspectives négatives sont plus du domaine de la fiction que celui de la réalité. La modification génétique est très différente des autres formes de dopage, car elle a des applications importantes en médecine impliquant la société.

Enfin, la question fondamentale qui reste en suspens est de savoir où se situe la ligne entre la thérapie et l'amélioration des performances. La réponse à cette question permettrait d'être moins fataliste quant à la menace inévitable du « dopage génétique ».

IV / Conclusion

Le modèle actuel des organismes mondiaux anti-dopage basé sur l'interdiction et les dépistages de modification génétique risque de ne pas suffir, en admettant d'ailleurs que la détection soit possible. Les comités de surveillance des technologies génétiques mis en place par les nations vont devoir collaborer avec le monde du sport.

La réglementation anti-dopage ne pourra pas dépendre que d'une seule autorité mondiale comme l'AMA car son application et sa mise en œuvre fondée sur la sécurité des athlètes sont difficiles. Il est vrai qu'actuellement, l'inquiétude pour la sécurité des athlètes est une justification suffisante pour interdire le « dopage génétique ». Cette interdiction ne semble pas être immuable puisque deux situations sont susceptibles de se produire : d'un côté les technologies de transfert de gène seront plus sûres et de l'autre la société développera une attitude permissive envers l'amélioration génétique.

Si l'une de ces deux situations se réalisent, l'interdiction de la modification génétique dans le sport deviendra une position beaucoup moins défendable. Cela ne signifie pas pour autant que les organismes sportifs devront autoriser la modification génétique, mais tout du moins, ils seront probablement obligés d'adapter leurs mesures d'application. Afin de mieux répondre aux enjeux éthiques, sociaux et médicaux, les organismes anti-dopage pourraient approfondir certains de leurs objectifs tels que maintenir une position plus neutre sur le caractère éthique du « dopage génétique », établir des relations avec les organisations internationales médicales et éthiques capables de mesurer les attitudes du public envers la modification génétique.

CONCLUSION GENERALE

Des efforts notables ont été réalisés depuis plusieurs années afin de rendre possible l'application de la thérapie génique à l'homme. Les résultats actuels ne sont pas encore à la hauteur des espoirs que laissait entendre au départ cette nouvelle méthode thérapeutique.

Toutefois, un bilan objectif de ce qui a été précédemment réalisé permet d'être optimiste pour l'avenir. En effet, il a été montré que la thérapie génique représentait une méthode efficace de traitement du DICS-X et de l'hémophilie par exemple. Malgré ces premières réussites, les études expérimentales et cliniques effectuées jusqu'à aujourd'hui ont permis de définir les obstacles du transfert de gène inhérents au processus de la méthode : d'une part le manque de spécificité, d'efficacité et d'innocuité du transfert de gène à cause de vecteurs imparfaits utilisés, et d'autre part l'insuffisance d'essais cliniques multicentriques.

La thérapie génique demeure une voie de recherche essentielle dans l'apport de protéines déficitaires, le traitement de maladies héréditaires monogéniques voire de cancers et d'athérosclérose, même si la contribution à ces maladies du siècle reste incertaine. Afin de surmonter les obstacles liés au développement de la thérapie génique, tous les organismes concernés (recherche, laboratoires, industries pharmaceutiques, hôpitaux, administrations) devront collaborer au niveau national mais aussi européen.

De nombreuses preuves existent sur le fait que le patrimoine génétique des athlètes influe sur leur performance physique. En effet, il a été montré que le polymorphisme de gène associé à divers traits physiques pourrait avoir un impact sur la performance d'un athlète. A ce jour, de nombreux gènes identifiés dans le cadre de maladies (codant pour la myostatine, l'EPO, l'IGF-1, le VEGF) peuvent améliorer les performances physiques. Ces gènes représentent des candidats potentiels pour le « dopage génétique » en étant capable d'accroître la formation de muscle squelettique, l'alimentation en oxygène, et l'approvisionnement en énergie.

Les connaissances issues des recherches basées sur la thérapie génique pourraient profiter aux sportifs et à leur entourage de façon injuste et illicite. Cependant, chaque sportif qui aura recourt à la manipulation génétique prendra des risques de santé majeurs sans pour autant tirer profit des effets escomptés.

L'amélioration de la performance sportive médiée par le « dopage génétique » ne peut pas être réalisée en utilisant les technologies actuelles et ne constituent donc pas une menace immédiate pour le sport. Seule une partie limitée des systèmes de transfection génétique pourraient être développés par des laboratoires illégaux.

Néanmoins, des scientifiques de différentes disciplines travaillent sous l'égide de l'AMA, du CIO et d'autres organismes mondiaux dans le but d'élaborer des méthodes de détection novatrices, spécifiques, sensibles et non invasives. Ces méthodes de détection se révèlent être plus exigeantes que dans le cadre des pratiques actuelles de dopage car des échantillons de tissus musculaires seraient nécessaires en plus des échantillons de sang. La récente disponibilité de méthodes de contrôle de « dopage génétique », avec la technique de PCR couplée au développement et à la mise en œuvre de mesures préventives réglementaires et éducatives, risque de dissuader les athlètes.

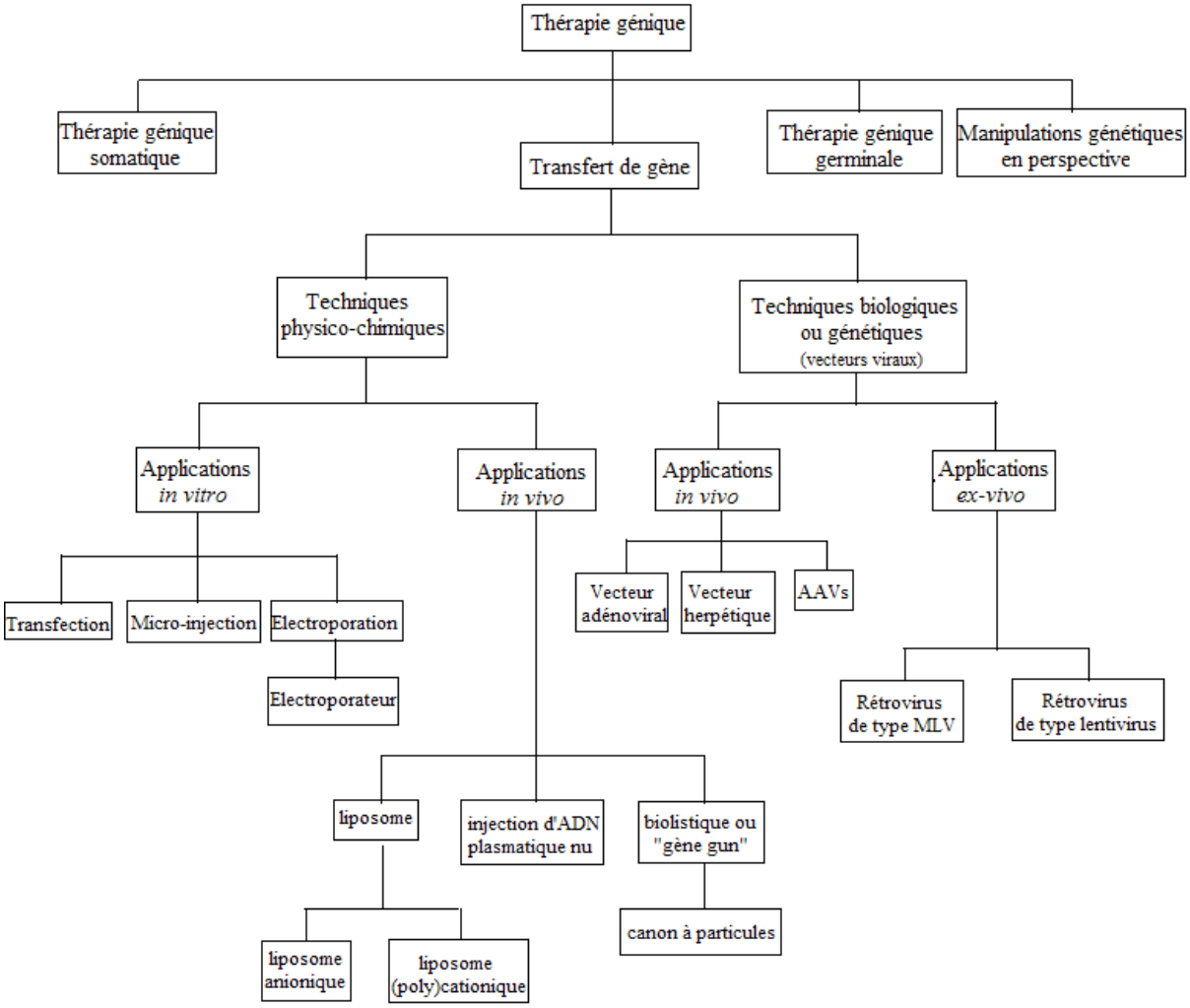
Le dopage est un acte auquel se voue un sportif dans un contexte social où la notoriété et l'appât du gain sont primordiaux. Compte tenu de l'ampleur que le dopage a pris dans le sport, il ne suffit pas de pointer du doigt le comportement déviant des athlètes, mais au contraire d'acquérir une attitude compréhensive de la pratique dopante face aux attentes du public qui banalise la performance sportive. Ainsi le « dopage génétique » ne va-t-il pas « déshumaniser » les athlètes en détruisant les valeurs du sport ?

ANNEXES

Annexe 1 : Utilisation actuelle des vecteurs de thérapie génique dans les essais cliniques.

Vecteurs viraux	**% total du nombre d'essais cliniques**	**Principales applications**	**Intérêt de l'amélioration des gènes**	**Effets indésirables**
Rétrovirus recombinant	23,10%	- Maladie hématopoïétique (DICS-X, maladie chronique granulomateuse) - Maladie d'Alzheimer - Cancer, SIDA	- EPO : traitement de l'anémie et de l'insuffisance rénale terminale - VEGF : traitement des maladies artérielles périphériques	Développement de leucémies chez 3 patients avec DICS-X
Lentivirus	0,60%	- SIDA	/	/
Adénovirus	24,90%	- Fibrose kystique - Maladie de Parkinson - Hémophilie de type A, cancer	- VEGF, FGF-1 : traitement des maladies coronariennes et artérielles - EPO : traitement de l'anémie	Mort d'un patient avec déficit en ornithine carbamyl transférase à la suite de une forte dose de virus administré
AAV	3,70%	- Fibrose kystique -Hémophilie de type B, emphysème - Arthrite - SIDA	/	Variations asymptomatiques des transaminases à la suite de une forte dose de virus injecté dans l'artère hépatique de patients hémophile B
HSV	3,40%	- Cancer	- Proenképhalines : traitement des douleurs osseuses de cancer métastasé	/
Vecteur non viral : ADN nu plasmidique	18,10%	- Fibrose kystique, maladie des yeux - Arthrite rhumatoïde - Hémophilie de type A - Cancer, SIDA	- VEGF, FGF : traitement des maladies artérielles périphériques - GHRH : traitement de la cachexie associée au cancer	/

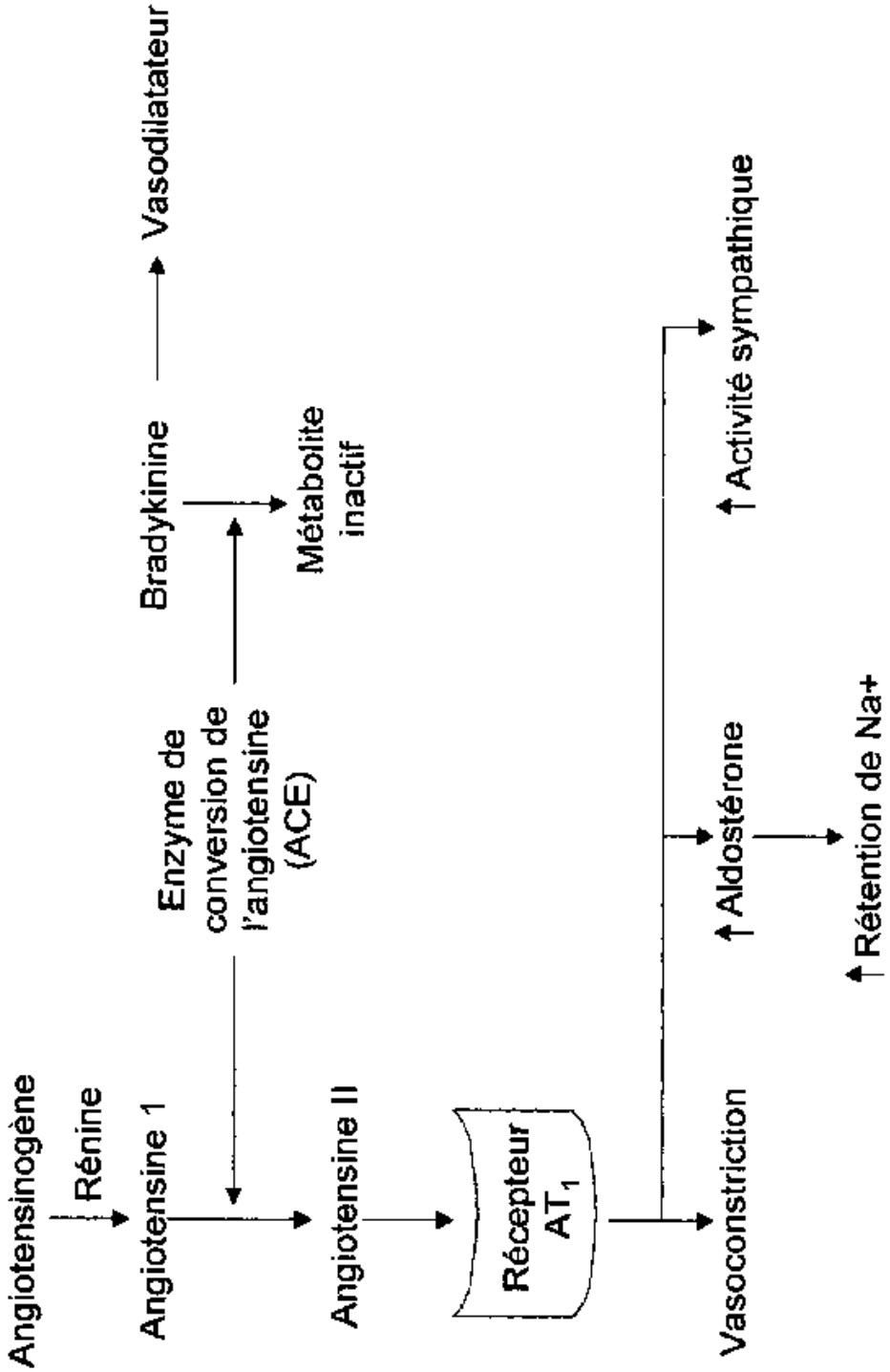
Annexe 2 : Schéma récapitulatif des domaines de la thérapie génique.



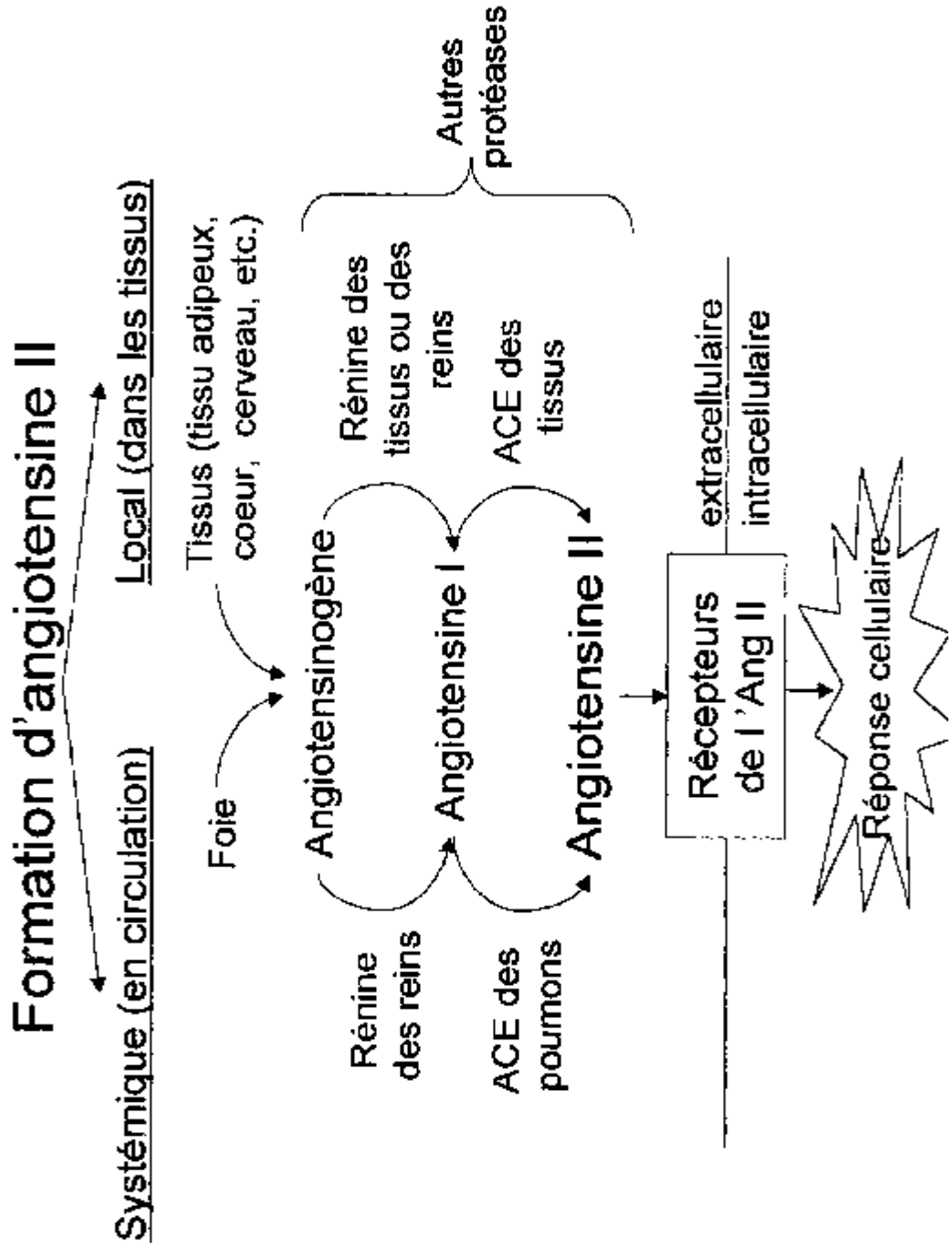
Annexe 3 : Caractéristiques des principaux vecteurs.

Famille de virus	**Rétrovirus**	**Adénovirus**	**HSV**	**Lentivirus**	**AAV**
Type de virus	ARN simple brin	ADN double brin	ADN double brin	ARN simple brin	ADN simple brin
Infection des cellules ne se divisant pas	Non	Oui	Oui	Oui	Oui
Production à haut titre	+	++++	+++	++	+
Intégration dans le génome de la cellule	Oui	Non	Non	Oui	Oui
Longueurs des séquences insérées	≤8Kb	≤8Kb	≤40Kb	≤8Kb	≤5Kb
Stabilité	++	+	++	++	++
Caractéristiques	- utilisation préférentielle *ex-vivo* - faible immunogénicité - expression à long terme	- efficacité de transfection - tropisme naturel pour les voies aériennes - expression à court terme *in vivo*	- large capacité d'insert - fort tropisme pour les neurones	- infection des cellules ne se divisant pas. - expression à long terme	- non pathogène, non inflammatoire - réplication dépendante d'un virus assistant -activité oncolytique
Limites de leur emploi	- risque de modification des propriétés cellulaires lors du traitement mitogène - faible efficacité de transfection *in vivo* - insertion aléatoire dans le génome	- stabilité moyenne (car extra-chromosomique) - immunogénicité potentielle et inflammatoire - risque de recombinaison avec un virus sauvage	- toxicité cellulaire et inflammation - difficulté de régulation de l'expression du gène thérapeutique - expression transitoire dans les cellules (autres que neurones)	- pathogène - risques d'effets liés à l'insertion dans le génome	- faible capacité d'insert - effet cytopathique

Annexe 4 : Le système rénine-angiotensine.



Annexe 5 : Formation de l'angiotensine II.



Annexe 6 : Effets du polymorphisme I/D du gène de l'enzyme de conversion de l'angiotensine sur les paramètres d'entraînements et de performance.

Auteurs	Année	Types d'études	Nombre de sujets	Résultats	Effet I/D
Montgomery H.-E.	1998	Association	25 Alpinistes	Excès de génotype II et déficience de génotype DD parmi les alpinistes.	+/-
Hagberg J.-M.	1998	Association	47 Femmes ménopausées	La valeur de la VO_2max est supérieure chez les II, intermédiaire chez les ID et inférieure chez les DD.	+/-
Alvarez R.-I.	2000	Association	60 Athlètes professionnels	La fréquence de l'allèle I est plus élevé chez les athlètes.	+/-
Montgomery H.-E.	1998	Expérimentale	78 Militaires	Amélioration 11 fois plus élevée chez les II contre les DD sur un test d'endurance musculaire.	+/-
Rankinen	2000	Expérimentale	476 Sédentaires normotendus	Changements de tension artérielle au repos et à l'exercice similaire entre génotype, sauf chez les sujets DD (hommes) où la tension artérielle était d'avantage réduit lors d'un effort de 50 watts.	-/- ou -/+

Annexe 7 : Gènes ayant un potentiel d'amélioration des performances.

Gènes	**Augmentation potentielle de la performance**	**Fonction de la protéine exprimée**	**Thérapie génique en cours**	**Modèles/Exemples de caractéristiques et/ou de performance améliorée**	**Usage clinique thérapeutique**
EPO	Endurance augmentée	- stimule l'érythropoïèse, augmente l'oxygénation du sang - apport d'oxygène aux tissus	Essais précliniques : *EX vivo* : cellules encapsulées de différents types *In vivo* : ADN plasmidique avec ou sans électroporation, AAV, lentivirus Essais cliniques : *Ex vivo* : adénovirus- ou rétrovirus recombinant-cellules transduites	EPO/EPOR voie de signalisation : la mutation hétérozygote du gène du EPOR abouti à la stimulation de l'érythropoïèse et l'augmentation de l'endurance chez un athlète	Traitement : - l'anémie sévère associée à une insuffisance rénale - SIDA - chimiothérapie de cancer
PPAR-δ	Endurance augmentée	- récepteurs nucléaires d'hormones - régulateur de la transcription du catabolisme des acides gras dans les tissus adipeux et dans le muscle squelettique	/	Souris marathoniennes transgéniques avec un régime riche en graisses et qui surexpriment le PPAR-δ, ont leur endurance d'augmentée ainsi qu'une faible accumulation de graisse	Traitement potentiel : - activité musculaire - incapacité à l'exercice - dyslipidémie - obésité, diabète - maladies coronariennes
VEGF, FGF, HGF, HIF-1α	Endurance augmentée	- augmentation de la production de nouveaux vaisseaux sanguins, la perfusion tissulaire et la fourniture d'oxygène et nutriments	Essais précliniques : *Ex vivo* : « muscle bioartificiel » implantable contenant myofibres de virus recombinant, et de VEGF transduit *In vivo* : ADN plasmidique, adénovirus, AAV (VEGF, FGF, HIF-1α) Essais cliniques : In vivo : adénovirus (VEGF, FGF, HIF-1α), ADN nu plasmidique	/	Traitement : - maladies vasculaires (artère coronaire ou artérielle périphérique)

Annexe 7 (suite)

Transcription de l'IGF-1 (pour le mIGF-1 et le MGF)	Effets anaboliques : augmentation de la force et de la masse musculaire	- stimule la régénération et la réparation musculaire en déclenchant la prolifération et la différenciation des cellules satellites - permet leur intégration dans les fibres musculaires existantes - augmente le contenu nucléaires promouvoit une régulation positive de la synthèse protéique	Essais précliniques : *In vivo* : ADN plasmidique, AAV	- des souris transgéniques pour le mIGF-1 montre une hypertrophie musculaire avec un petit corps et une augmentation de la force - chez les rongeurs l'expression du mGF-1 ou du MGF conduit à une hypertrophie musculaire et une amélioration de la résistance - chez la souris, l'expression du mIGF-1 favorise la régénération du muscle après une blessure	- blessures provoquées par une hypotrophie musculaire, dystrophie musculaire - la cachexie cancéreuse, faiblesse musculaire liée à l'âge
Gènes inhibiteurs de la myostatine	stimule la croissance et la régénération musculaire	- renforce l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules progénitrices musculaires en fibres musculaires maures - régénère le muscle lésé	/	- les bovins et les souris sans myostatine ont un phénotype « culard » avec une diminution du taux de graisse corporelle - un bébé, avec une mutation provoquant la perte de la fonction du gène de la myostatine, a presque doublé sa masse musculaire.La mère du bébé était une athlète professionnelle porteuse hétérozygote de la mutation	Traitement : - dystrophie musculaire - myopathies inflammatoires - cachexie, sarcopénie
Suppression de l'expression de la myostatine par l'ARN ribosomal ou des oligonucleotides antisens	/	- à la suite de une blessure musculaire, peut accélérer les réponses des cellules inflammatoires, la migration des myoblastes et la réduction de la fibrose - améliore la guérison	/	Les souris surexprimant le propeptide de la myostatine montrent une augmentation musculaire alors qu'elles ont un régime riche en graisses	/
Gènes codant la follistatine	/	- croissance musculaire positive régulière, par un effet inhibiteur sur la myostatine	/	Des souris transgéniques surexprimant la follistatine dans les muscles squelettiques ont connu une augmentation spectaculaire de leur croissance musculaire	/

Annexe 7 (fin)

GH, GHRH	Effets anaboliques : augmentation de la force et de la masse musculaire	- essentiel pour la croissance, de glucides, protéines et lipides - stimule l'axe GH-IGF-1 conduisant à des effets anabolisants	Essais précliniques : *Ex vivo* : GH *In vivo* : adénovirus, AAV (GH), ADN plasmidique (GHRH) Essais cliniques : ADN plasmidique (GHRH)	/	Traitement : troubles associés à une diminution de la croissance - cancer et cachexie associée - insuffisance rénale chronique
Gènes codant la préproenképhaline	Soulage la douleur	- bloque la transmission des signaux de la douleur des nerfs endommagés du cerveau en stimulant la production de puissants neurotransmetteurs inhibiteurs (GABA) ou de peptides opioïdes endogènes (enképhalines ou endorphines)	Essais précliniques : *In vivo* : HSV Essais cliniques : *In vivo* : HSV (preproenképhaline)	/	Traitement : douleur chronique (inflammatoire ou due à des lésions nerveuses)

Annexe 8 : Etudes cliniques sur les thérapies géniques : les possibilités de dopage et leurs risques.

Nom du gène	Abréviation	Usage thérapeutique	Usage dopant	Disciplines sportives	Effets secondaires éventuels
Erythropoïétine	EPO	Anémie, insuffisance rénale chronique	Amélioration de l'endurance	Sports d'endurance	Cancer, arrêt cardiaque, maladie dégénérative du foie et des reins
Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire	VEGF	Sténose, ischémie des membres inférieurs, coronaropathie	Amélioration de la circulation sanguine, endurance	Sports d'endurance	Cancer, angiogénèse
Facteur de croissance analogue à l'insuline	IGF-1	Syndrome du canal cubital	Croissance musculaire	Sports de force	Dérèglements anaboliques, cancer
Hormone de croissance	GH	Cachexie, carcinomes de la peau	Croissance et régénération musculaire	Sports d'endurance, sports de force	Dysfonctionnement métabolique
Facteur 1α inductible par l'hypoxie	HIF- 1α	Vasculopathies périphériques	Amélioration de la circulation sanguine	Sports d'endurance, sprint	Activation de cellules cancéreuses latentes
Anticorps anti-IGF	Anti-IGF	Tumeurs cérébrales, carcinome, gliome	Régulation de la croissance musculaire	Sport de force	Intéractions du vecteur viral avec le génome
Myostatine	/	Pas encore d'usage clinique	Croissance musculaire	Sports de force, sauts	Dérèglements anaboliques

Annexe 9 : Projets de recherche sur le dopage génétique financés par l'AMA – Situation en janvier 2005.

Chercheur	Titre du projet	Lieu	Lancé en	Résumé du projet
Dr Goeffrey GOLDSPINK	Manipulation de la masse musculaire via l'homone de croissance (GH) et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF-1)	Royal Free and University College Medical School University College Londres, Royaume-Uni	2002	L'hormone de croissance et l'IGF-1 sont des peptides humains agissant sur la croissance musculaire. La distinction entre GH endogène et GH administré de façon exogène est difficile. Il a été démontré que la prise de GH modifie l'expression d'une variante de l'IGF-1 spécifique aux muscles. Cette propriété sera utilisée pour mettre en place un test permettant de distinguer les substances produites de façon endogène des substances introduites.
Dr Gunter GMEINER	Appication de la technologie par biopuces pour la détection de changements de l'expression de gènes après dopage à l'hormone de croissance recombinante	ARC Seibersdorf Research Seiberdorf, Autriche	2004	La technologie par biopuces sera utilisée pour mettre en évidence des changements dans l'expression de gènes dans les globules blancs à la suite de l'application d'hormone de croissance. Les profils d'expression des gènes des cellules traitées et non traitées seront comparés, afin de définir un ensemble de gènes modulés par traitement à l'hormone de croissance.
Dr Theodore FRIEDMANN	Méthodes de détection par biopuces de l'hormone de croissance et de l'IGF-1	Université de Californie San Diego, Etats-Unis	2004	L'administration d'hormone de croissance et d'IGF-1 ou des gènes les exprimant sera associée à des changements secondaires reproductibles et détectables de l'expression de gènes dans de nombreux tissus, y compris le sang. De nouvelles méthodes de criblage de l'expression des gènes, telles que des techniques globales par biopuces, seront utilisées pour détecter ces changements dans des cellules du sang périphérique de souris exposées à l'hormone de croissance, à l'IGF-1 et aux vecteurs de transfert de gène les exprimant.
Dr Jordi SEGURA	Imagerie moléculaire de l'expression de gènes utile pour le contrôle du dopage : étude pilote sur des animaux après transfert du gène de l'EPO	Unité de recherche en pharmacologie, Institut municipal de recherche médicale (IMAS-IMIM) Barcelone, Espagne	2005	L'imagerie sera utilisée pour détecter la formation d'ARN dans les tissus inhabituels à la suite de un transfert de gène. Cette approche sera applicable à tout gène transféré dans des tissus n'exprimant pas habituellement la protéine dopante. L'imagerie de l'ARN sera réalisée en utilisant des sondes d'acides nucléiques peptidiques pour la détection par tomographie. Un projet pilote sera réalisé pour illustrer la présence de gènes d'EPO transférés dans des muscles de souris.
Dr Jane ROBERTS	Application de la chimie cellulaire et des approches protéomiques à la détection du dopage génétique	Laboratoire HFL Fordham Cambridgeshire Royaume-Uni	2005	Suite au dopage génétique, l'expression d'un gène ou d'un ensemble de gènes et/ou de protéines sera altérée dans plusieurs tissus. Ces modifications seront détectées par l'application de techniques transcriptomiques ou protéomiques. Cela permettra l'identification de profils anormaux d'ARN/protéines associées à l'utilisation de substances dopantes (IGF-1 ou hormone de croissance).

Annexe 10 : Liste des Interdictions 2011 du Code mondial anti-dopage.

AGENCE MONDIALE ANTIDOPAGE

LISTE DES INTERDICTIONS 2011

Entrée en vigueur le 1er janvier 2011

Toutes les *substances interdites* doivent être considérées comme des «substances spécifiées» sauf les substances dans les classes S1, S2.1 à S2.5, S4.4 et S6.a, et les m*éthodes interdites* M1, M2 et M3.

MÉTHODES INTERDITES

M1. AMÉLIORATION DU TRANSFERT D'OXYGÈNE

Ce qui suit est interdit:

1. Le dopage sanguin, y compris l'utilisation de produits sanguins autologues, homologues ou hétérologues, ou de globules rouges de toute origine.
2. L'amélioration artificielle de la consommation, du transport ou de la libération de l'oxygène incluant, sans s'y limiter, les produits chimiques perfluorés, l'éfaproxiral (RSR13) et les produits d'hémoglobine modifiée (par ex. les substituts de sang à base d'hémoglobine, les produits à base d'hémoglobines réticulées), mais excluant la supplémentation en oxygène.

M2. MANIPULATION CHIMIQUE ET PHYSIQUE

Ce qui suit est interdit:

1. La *falsification*, ou la tentative de *falsification*, dans le but d'altérer l'intégrité et la validité des *échantillons* recueillis lors du *contrôle du dopage,* est interdite. Cette catégorie comprend, sans s'y limiter, la cathétérisation, la substitution et/ou l'altération de l'urine (par ex. protéases).
2. Les perfusions intraveineuses sont interdites, sauf celles reçues légitimement dans le cadre d'admissions hospitalières ou lors d'examens cliniques.
3. Le fait de successivement prélever, manipuler et ré-infuser du sang total dans le système circulatoire est interdit.

M3. DOPAGE GÉNÉTIQUE

Ce qui suit, ayant la capacité potentielle d'améliorer la performance sportive, est interdit:

1. Le transfert d'acides nucléiques ou de séquences d'acides nucléiques;
2. L'utilisation de cellules normales ou génétiquement modifiées;
3. L'utilisation d'agents affectant directement ou indirectement des fonctions connues pour influencer la performance sportive par altération de l'expression génique. Par exemple, les agonistes du récepteur activé par les proliférateurs des péroxysomes δ (PPARδ) (par ex. GW 1516) et les agonistes de l'axe PPARδ-protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) (par ex. AICAR) sont interdits.

BIBLIOGRAPHIE

1- LEDERBERG J., TATUM E. Reflexions on Research and the Future of Medecine. *Columbia University*, 1966, vol. 95, p. 1367-1379.

2- GALIBERT F. *Maladies génétiques du chien : informations et questions* [en ligne]. Belgique : Université de Liège, [s.d.].
Disponible sur : <http://www.ulg.ac.be/fmv/quant/chien/>. (consulté le 16.07.2009)

3- HEARD JM. Réflexion sur l'avenir de la thérapie génique. *Médecine Sciences*, 2000, vol. 16, p. 1305-1309.

4- AIUTI A. Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*, 2002, vol. 96, p. 2410-2413.

5- COHEN-HAGUENAUER O. *La thérapie génique*. [s.l.] : Editions TEC and DOC, 2001, p. 709.

6- CAVAZZANA-CALVO M. Gene therapy for human severe combined immunodeficiency (SCID)-X disease. *Science*, 2000, vol. 288, p. 627-629.

7- HACEIN-BEY-ABINA S. LMO2-Associated Clonal T Cell Proliferation in Two Patients after Gene Therapy for SCID-X. *Science*, 2003, vol. 302, p. 415-419.

8- COHEN-HAGUENAUER, O. Regulator issues and international approaches to regulation. *In Gene Therapy : current opinion in biotechnology.* [s.l.] : [s.n.], 1997. p. 361-362.

9- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. *National Human Genome Research of Institute* [en ligne]. USA : National Institutes of Health, [s.d.].
Disponible sur : <http://www.genome.gov>. (consulté le 26.06.2009)

10- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001, vol. 409, p. 860-921.

11- WILEY. *Gene therapy Trials* [en ligne]. [s.l.] : Wiley, 2000.
Disponible sur : <http://www.search.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>.
(consulté le 19.02.2010)

12- ROTH DA., TAWA NE., O'BRIEN JM., [*et al.*]. Non viral transfer of the gene encoding factor VIII in patients with severe hemophilia A. *New Engl. J. Med.*, 2001, vol. 344, p. 1735-1742.

13- BRANELLEC D., DUVERGER N. Thérapie génique des maladies cardio-vasculaires. *In La thérapie génique* : [s.l.] : Paris, 2001, p. 465-474.

14- LEDLEY FD. Pharmaceutical approach to somatic gene therapy. *Pharm. Res.*, 1996, vol. 13, p. 1595-1614.

15- MARTIN SG., MURRAY JC. Gene transfert systems for human endothelial cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2000, vol. 41, p. 223-233.

16- IMAZU S., NAKAGAWA S., NAKANISHI T., [*et al.*]. A novel nonviral vector based on vesicular stomatitis virus. *J. Control Release*, 2000, vol. 68, p. 187-194.

17- NIIDOME T., HUANG L. Gene therapy progress and prospects : nonviral vectors. *Gene Ther*, 2002, vol. 9, p. 1647-1652.

18- WHITTAKER GR. Virus nuclear import. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2003, vol. 55, p. 733-747.

19- KAY MA., GLORIOSO JC., NALDINI L. Viral vectors for gene therapy : the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat. Med*, 2001, vol. 7, p. 33-40.

20- ATHANASOPOULOS T., GRAHAM IR, FOSTER H, [*et al.*]. Recombiant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther*, 2004, vol. 11, n°1, p. 109.

21- DONAHUE BA., McARTHUR JC., SPRATT SK., [*et al.*]. Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J. Gene Med*, 1999, vol. 1, p. 31.

22- LINDEN RM., WOO SL. AAVant-garde gene therapy. *Nat Med*, [s.d.], vol. 5, p. 21.

23- DURING MJ., XU R., YOUNG D., [*et al.*]. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med*, 1998, vol. 4, p. 1131.

24- BUCHSCHACHER GL. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Cell Mol. Genet*, 2001, vol. 26, p. 915-936.

25- FASSATI A., WELLS DJ. WALSH FS., [*et al.*]. Genetic correction of dystrophin deficiency and skeletal muscle remodeling in adult MDX mouse via transplantation of retroviral producer cells. *J. Clin Invest*, [s.d.], vol. 100, p. 620.

26- CERIMES. *Science.gouv.fr* [en ligne]. Clamart : CERIMES, 2004. Disponible sur: <http://www.science.gouv.fr>. (consulté le 18.03.2011)

27- StGEORGE JA. Gene therapy progress and prospects : adenoviral vectors. *Cell Moll. Genet*, 2001, vol. 26, p. 1-11.

28- GREEN NK., SEYMOUR LM. Adenoviral vectors : systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther*, 2002, vol. 9, p. 1036.

29- LOKENSGARD JR., BLOOM DC., DOLSON AT., [*et al.*]. Long term promoter activitu during herpes simplex virus latency. *J. Virol*, 1994, vol. 68, p. 7148-7158.

30- CHAMBERS R., GILLESPIE GY., SOROCEANU L., [*et al.*]. Comparison of genetically engineered herpes simplex viruses for the treatment of brain tumors in a SCID mouse model of human maligant gliomas. *Proc Nath Acad Sci USA*, 1995, vol. 92, p. 1411-1415.

31- BURTON EA., FINK DJ., GLORIOSO JC. Gene delivery using herpes simplex virus vectors. *DNA Cell Biol*, 2002, vol. 21, p. 915-936.

32- SHERMAN DM., BESSODES B., CAMERON J., [*et al.*]. Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol*, 1998, vol. 9, p. 480-485.

33- FELGNER PL., RINGOLD GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, 1989, vol. 337, p. 387-388.

34- FARHOOD H., SERBINA N., HUANG L. The rôle of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta*, [s.d.], vol. 1235, p. 289.

35- KREISS P., CAMERON B., RANGARA R., [*et al.*]. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res*, 1999, vol. 27, p. 3792.

36- PITARD B., OUDRHIRI N., VIGNERON JP., [*et al.*]. Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, vol. 84, p. 7413.

37- FELGNER PL., GADEK M., HOLM R., [*et al.*]. Lipofection : a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, vol. 84, p. 7414-7417.

38- VOINEA M., SIMIONESCU M. Designing of intelligent liposomes for efficicient delivery of drugs. *J. Cell Mol Med*, 1987, vol. 6, p. 465.

39- BOUSSIF O., DELAIR T., BRUA C., [*et al.*]. Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro. *Bioconjug Chem*, 1999, vol. 10, p. 877.

40- BOUSSIF O., LEZOUALC'H F., ZANTA M., [*et al.*]. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo : polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, vol. 92, p. 7297.

41- ABDALLAH B., HASSAN A., BENOIST C., [*et al.*]. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain : polyethylenimine. *Hum Gene Ther*, 1996, vol. 7, p. 1947.

42- GODBEY WT., WU KK., MIKOS AG. Traking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 9, p. 5177-5181.

43- KUKOWSKA-LATALLO JF., BIELINSKA AU., SPINDLER DA., [*et al.*]. Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 10, p. 4897-4902.

44- LU QL., BOU-GHARIOS G., PARTRIDGE TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle : a protein factory. *Gene Ther*, 2003, vol. 10, p. 131-142.

45- CAPECCHI MR. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell*, [s.d.], vol. 22, p. 479.

46- BIEWENGA JE., DESTREE OH., SCHRAMA LH. Plasmid-mediated gene transfer in neurons using the biolistics technique. *J. Neurosci. Methods*, 1997, vol. 71, p. 67-75.

47- ZELENIN AV., KOLESNIKOV VA., TARASENKO O., [*et al.*]. Batacterial [beta]-galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection. *FEBS Letters*, 1997, vol. 414, p. 319-322.

48- NEUMANN E., SCHAEFER-RIDDER M., WANG Y., [*et al.*]. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J*, 1982, vol. 1, p. 841-845.

49- BELEHRADEK J., ORLOWSKI S., RAMIREZ LH., [*et al.*]. Electropermeabilization of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochim Biophys Acta*, 1994, vol. 1190, p. 155.

50- BELEHRADEK M., DOMENGE C., LUBOINSKI S., [*et al.*]. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. *Firts clinical phase I-II trial. Cancer*, 1993, vol. 72, p. 3694.

51- TITOMIROV AV., SUKHAREV S., KISTANOVA E., [*et al.*]. In vivo emectroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta*, 1991, vol. 1088, p. 131.

52- HELLER R., JAROSZESKI M., ATKIN A., [*et al.*]. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett Nicolau, C*, 1996, vol. 389, p. 225.

53- PLANK C., ANTON M., RUDOLPH C., [*et al.*]. Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force. *Expert. Opin. Biol. Ther*, 2003, vol. 3, p. 745-758.

54- HUBER PE., MANN MJ., MELO LG., [*et al.*]. Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery. *Gene Ther*, 2003, vol. 10, p. 1600.

55- LU QL., LIANG HD., PARTRIDGE T., [*et al.*]. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther*, 2003, vol. 10, p. 396.

56- BETTAN M., EMMANUEL F., DARTEIL R., [*et al.*]. High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Molecular therapy*, 2000, vol. 2, p. 204-210.

57- WOLFF JA., MALONE RW., WILLIAMS P., [*et al.*]. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 1990, vol. 247, p. 1465.

58- WOLFF JA., LUDTKE JJ., ACSADI G., [*et al.*]. Long-term persistence of plasmid DNA and foreing gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet*, 1992, vol. 1, p. 363.

59- SELMAJ K., KOWAL C., WALCZAK A., [*et al.*]. Naked DNA vaccination differentially modulates autoimmune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol*, 2000, vol. 111, p. 34.

60- HARTIKKA J., SUKHU L., BUCHNER C., [*et al.*]. Electroporation-facilited delivery of plasmid DNA in skeletal muscle : plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther*, 2001, vol. 4, p. 407.

61- DURIEUX AC., BONNEFOY R., BUSSO T., [*et al.*]. In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle : effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J. Gene Med*, 2004, vol. 6, p. 809.

62- LIPPI G., GUIDI G. New scenarios in antidoping research. *Clin Chem*, 2003, vol. 49, p. 2106-2107.

63- MacARTHUR DG., NORTH KN. Genes and human elite athletic performance. *Hum Genet*, 2005, vol. 116, p. 331-339.

64- RANKINEN T., BRAY MS., HAGBERG JM., [*et al.*]. The human gene map for performance and health-related fitness phenotypes : the 2005 update. *Med Sci Sports Exerc*, 2006, vol. 38, p. 1863-1688.

65- HE Z., HU Y., FENF L., [*et al.*]. Polymorphisms in the HBB gene relate to individual cardiorespiratory adaptation in response to endurance training. *Br J. Sports Med*, 2006, vol. 40, p. 998-1002.

66- PRIOR SJ., HADBERG JM., PATON CM., [*et al.*]. DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. *Am J. Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, vol. 290, p. 848-855.

67- WALSH S., METTER EJ., FERRUCCI L., [*et al.*]. Activin-type II receptor B (ACVR2B) and follistatin haplotype associations with muscle mass and strengh in humans. *J. Appl Physiol*, 2007, vol. 102, p. 2142-2148.

68- WOLFARTH B., RANKINEN T., MUHLBAUER S., [*et al.*]. Association between a beta2-adrenergic receptor polymorphism and elite endurance performance. *Metabolism*, 2007, vol. 56, p. 1649-1651.

69- McCRORY P. Super athletes or gene cheats ? *Br J. Sports Med*, 2003, vol. 37, p. 192-193.

70- SHARP NC. The human genome and sport, including epigenetics and athleticogenomics : A brief look at a rapidly changing field. *J. Sports Sci*, 2008, vol. 10, p. 1-7.

71- ALHENC-GELAS F., RICHARD J., COURBON D., [*et al.*]. Distribution of plasma angiotensin converting enzyme levels in healthy men : relationship to environmental and hormonal parameters. *J. Lab Clin Med*, 1991, vol. 17, p. 33-39.

72- SOUBRIER F., ALHENC-GELAS F., HUBERT C., [*et al.*]. Two putative active centers in human angiotensin 1-converting enzyme releaved by molecular cloning. *Proc Nat1 Acad Sci USA*, 1988, vol. 859, p. 386-390.

73- RIGAT BI., HUNERT C., ALHENC-GELAS F., [*et al.*]. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin 1-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme fevels. *J. Clin Invest*, 1990, vol. 86, p. 134-136.

74- MONTGOMERY HE., MARSHALL R., HEMINGWAY H., [*et al.*]. Human gene for physical performance. *Nature*, 1998, vol. 393, p. 221-222.

75- HAGBERG JM., FERRELL RE., McCOLE SD., [*et al.*]. VO_2 max is associated with ACE genotype in postmenopausal women. *J. Appl Physiol*, 1998, vol. 85, p. 184-186.

76- ALVAREZ R., TERRADOS N., ORTOLANO R., [*et al.*]. Genetic variation in the reninangiotensin system and athletic performance. *Eur J. Appl Physio*, 2000, vol. 82, p. 117-120.

77- NIEMI AK., MAJAMAA K. Mitochondrial DNA and ACTN3 genotypes in Finnish elite endurance and sprint athletes. *Eur J. Hum Genet*, 2005, vol. 13, p. 965-969.

78- FRIEDMANN T. Dopage génétique un vue d'ensemble. *Franc Jeu*, 2007, vol. 2, p. 13.

79- WORLD ANTI-DOPING AGENCY. *The world anti-doping code* [en ligne]. [s.l.] : WADA, 2010. Disponible sur : <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2010/>. (consulté le 12.06.2010)

80- SCHNEIDER AJ., FRIEDMANN T. Gene doping in sports : the science and ethics of genetically modified athletes. *Adv Genet*, 2006, vol. 51, p. 1-110.

81- WAGNER KR. Muscle regeneration through myostatin inhibition. *Curr Opin Rheumatol*, 2005, vol. 17, p. 720-724.

82- LEE SJ. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, vol. 20, p. 61-86.

83- LEE SJ., McPHERRON AC. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, vol. 98, p. 9306-9311.

84- LEZZI S., DI PADOVA M., SERRA C., [*et al.*]. Deacetylase inhibitors increase muscle cell size by promoting myoblast recruitment and fusion through induction of follistatin. *Dev Cell*, 2004, vol. 6, p. 175-179.

85- DUCHENNE PARENT PROJECT FRANCE. *Un 1er essai d'inhibition de la myostatine permet d'envisager de plus larges études cliniques* [en ligne]. [s.l.] : Duchenne Parent Project, 2008. Disponible sur : <http://www.duchennefr.com/fr/autres-nouvelles/>.
(consulté le 27.08.2010)

86- GARFIELD GROUP. *Acceleron Pharma Inc* [en ligne]. [s.l.] : Garfield Group, 2009. Disponible sur : <http://www.acceleronpharma.com/content/products/>.
(consulté le 07.09.2010)

87- KHAN AS., BROWN PA., DRAGHIA-AKLI R. Plasmid-based growth hormone-releasing hormone supplementation and its applications. *Curr Opin Mol Ther*, 2005, vol. 7, p. 306-316.

88- PERONI CN., GOUT PW., BARTOLINI P. Animal models for growth hormone gene therapy. *Curr Gene Therapy*, 2005, vol. 5, p. 493-509.

89- GRIMBERG A., COHEN P. Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, vol. 183, p. 1-9.

90- SEALE P., ISHIBASHI J., SCIME A., [*et al.*]. Pax7 is necessary and sufficient for the myogenic specification of CD45+ : Sca1+ stem cells from injured muscle. *PLOS Biology*, 2004, vol. 5, p. 664-672.

91- OLGUIN HC., OLWIN BB. Pax7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells : a potential mechanism for sel-renewal. *Develop-mental Biology*, 2004, vol. 275, p. 375-388.

92- USTANINA S. Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells, but not their specification [en ligne]. [s.l.] : Martin Luther University, 2005.
Disponible sur : <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/05H098/>.
(consulté le 02.02.2011)

93- CHIN-EPSTEIN JA. Getting your Pax straigh : Pax proteins in development and disease. *Trends Genet*, 2002, vol. 18, p. 41-47.

94- RELAIX F. Visions et reflections-Skeletal muscle progenitor cells : from embryo to adult. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2006, vol. 63, p. 1221-1225.

95- RELAIX F., ROCANCOURT D., MANSOURI A., [*et al.*]. A Pax3/Pax7-dependent population of skeletal muscle progenitor cells. *Nature*, 2005, vol. 435, p. 948-953.

96- KAYANO T., BURANT CF., FUKUMOTO H., [*et al.*]. Human facilitative glucose transporters. Isolation, functional characterization, and gene localization of cDNAs encoding an isoform (GLUT5) expressed in small intestine, kidney, muscle, and adipose tissue and an unusual glucose transporter pseudogene-like sequence (GLUT6). *Journal of Biological Chemistry*, 1990, vol. 265, p. 13276-13282.

97- FRIEDMAN JE., DUDEK RW., WHITEHEAD DS., [*et al.*]. Immunolocalization of glucose transporter GLUT4 within human skeletal muscle. *Diabetes*, 1991, vol. 40, p. 150-154.

98- REN JM., MARSHALL BA., MUECKLER MM., [*et al.*]. Overexpression of GLUT4 protein in muscle increases basal and insulin-stimulated whole body glucose disposal in conscious mice. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, vol. 95, p. 429-432.

99- WANG YX., ZHANG CL., YU RT., [*et al.*]. Regulation of muscle fiber type and running endurance by PPAR delta. *Plos Biol*, 2004, vol. 2, p. 294.

100- KRAMER DK., AHLSEN M., NORRBOM J., [*et al.*]. Human skeletal muscle fiber type variations correlate with PPAR alpha, PPAR delta and PGC-1 alpha mRNA. *Acta Physiologica*, 2006, vol. 188, p. 207-216.

101- CHIMIE.DE. *News* [en ligne]. Germany : Chimie.de, 1997.
Disponible sur : <http://www.bionity.com/news/e/61454/>. (consulté le 15.03.2011)

102- DONATI A. *World trafic in doping substances* [en ligne]. [s.l.] : [s.n.], 2007.
Disponible sur : <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/Donati/>.
(consulté le 09.08.2010)

103- HOJMAN P., GISSEL H., GEHL J. Sensitive and precise regulation of haemoglobin after gene transfer of erythropoietin to muscle tissue using electroporation. *Gene Ther*, 2007, vol. 14, p. 950-959.

104- RIVERA VM., GAO GP., GRANT RL., [*et al.*]. Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoiétin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood*, 2005, vol. 105, p. 1424-1430.

105- SIPRASHVILI Z., KHAVARI PA. Lentivectors for regulated and reversible cutaneous gene delivery. *Mol Ther,* 2004, vol. 9, p. 93-100.

106- MORISHITA R., AOKI M., HASHIYA N., [*et al.*]. Safety evaluation of clinical gene therapy using hepatocyte growth factor to treat peripheral arterial disease. *Hypertension*, 2004, vol. 44, p. 203-209.

107- RAJAGOPALAN S., MOLHER ER., LEDERMAN RJ., [*et al.*]. Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease : a phase II randomized, double-blind, controlled study of adenoviral delivery of vascular endothelial growth factor 121 in patients with disabling intermittent claudication. *Circulation*, 2003, vol. 108, p. 1933-1938.

108- KUSUMANTO YH., VAN WELL V., MULDER NH., [*et al.*]. Treatment with intramuscular vascular endothelial growth factor gene compared with placebo for patients with diabetes mellitus and critical limb ischemia : a double-blind randomized trial. *Hum Gene Ther*, 2006, vol. 17, p. 683-691.

109- YEH JL., GIORDANO FJ. Gene-based therapeutic angiogenesis. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, vol. 15, p. 236-249.

110- SAH PB., LOSORDO DW. Non-viral vectors for gene therapy : clinical trials in cardiovascular disease. *Adv Genet*, 2005, vol. 54, p. 339-361.

111- LATTANZI W., POLA E., PECORINI G., [*et al.*]. Gene therapy for *in vivo* bone formation : recent advances. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2005, vol. 9, p. 167-174.

112- EGERMANN M., SCHNEIDER E., EVANS CH., [*et al.*]. The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis. *Osteoporos Int*, 2005, vol. 16, p. 120-128.

113- LIEBERMAN JR., GHIVIZZANI SC., EVANS CH., [*et al.*]. Gene transfer approaches to the healing of bone and cartilage. *Mol Ther*, 2002, vol. 6, p. 141-147.

114- CUCCHIARINI M., MADRY H. Gene therapy for cartilage defects. *J. Gene Med*, 2005, vol. 7, p. 1495-1509.

115- KAUL G., CUCCHIARINI M., ARNTZEN D. [*et al.*]. Local stimulation of articular cartilage repair by transplantation of encapsulated chondrocytes overexpressing human fibroblast growth factor 2 (FGF-2) *in vivo*. *J.Gene Med*, 2006, vol. 8, p. 100-111.

116- MATA M., GLORIOSO J., FINK DJ. Development of HSV-mediated gene transfer for the treatment of chronic pain. *Exp Neurol*, 2003, vol. 184, p. 25-29.

117- HAO S., MATA M., WOLFE D., [*et al.*]. Gene transfer of glutamic acid decarboxylase reduces neuropathic pain. *Ann Neurol*, 2005, vol. 57, p. 914-918.

118- WU CM., LIN MW., CHENG JT., [*et al.*]. Regulated, electroporation-mediated delivery of pro-opiomelanocortin gene suppresses chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Gene Ther*, 2004, vol. 11, p. 933-940.

119- HAO S., MATA M., GLORIOSO JC., [*et al.*]. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. *Mol Pain*, 2006, vol. 2, p. 6.

120- DIEL P., FRIEDEL U. Gendoping : Techniken, potenzielle biologische Ziele und Möglichkeiten des Nachweises. *Deutsche Sportchschule Köln*, 2007, p. 110-118.

121-McMAHON JM., WELLS KE., BAMFO JE., [*et al.*]. Inflammatory responses following direct injection of plasmid DNA into skeletal muscle. *Gene therapy*, 1988, vol. 5, p. 1283-1290.

122- RASCHLE, KRANZ. Une chance pour les malades, un danger pour les personnes saines. *Doping Info*, 2007, p. 4.

123- SPORTWISSENSCHAFT. *The University of Tübingen Germany has a patent pending for the « Detection of transgenic DNA »* [en ligne]. [s.l.] : Sportwissenschaft, 2007. Disponible sur : <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp>. (consulté le 29.08.2010)

124- LASNE F., MARTIN L., DE CEAURRIZ J., [*et al.*]. « Genetic Doping » with erythropoietin cDNA in primate muscle is detectable. *Mol Ther*, 2004, vol. 10, p. 409-410.

125- BAOUTINA A., ALEXANDER IE., RASKO JE., [*et al.*]. Developing strategies for detection of gene doping. *J. Gene Med*, 2008, vol. 10, p. 3-20.

126- RASCHLE, KRANZ. Sur les traces des athlètes dopés génétiquement. *Doping Info*, 2007, p. 2-3.

127- MIAH A. *Le dopage génétique : sport, valeurs, et de bioéthique, dans l'éthique de la génétique humaine : Les défis de la (post) génomique ERA 175* [en ligne]. MIAH A. : GLASA J., 2003. Disponible sur : <http://www.andymiah>. (consulté le 18.03.2011)

128- VIVRE SPORT. *Athlétisme : Thomas Springstein soupçonné de dopage génétique* [en ligne]. Montpellier : Vivre Sport, [s.d.].
Disponible : <http://www.dopage.com/actualité-dopage/athletisme-thomas-springstein/>. (consulté le 27.02.2010)

129- ANGELA J., SCHNEIDER, FRIEDMANN T., Gene Doping in sports. *The science and ethics of genetically modified* athletes, 2006, vol. 37.

130- RABIN O. *Programme de recherche de l'AMA sur le dopage génétique* [en ligne]. [s.l.] : [s.n.], 1999. Disponible sur : <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/>. (consulté le 07.03.2011)

131- WORL ANTI-DOPING AGENCY. *Liste des interdictions 2009* [en ligne]. [s.n.] : [s.l.], 2009.
Disponible sur : <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2009Prohibited_List/>. (consulté le 15.03.2011)

132- AGENCE MONDIALE ANTI-DOPAGE. *Le dopage génétique Symposium Saint Pétersbourg* [en ligne]. Montréal : WADA, [s.d.].
Disponible sur : <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/2008StPersburg_Declaration/>. (consulté le 06.03.2011)

133- AGENCE MONDIALE ANTI-DOPAGE. *Le code mondial anti-dopage.* [s.l.] : WADA, 2003. Disponible sur : <http://www.wada-ama.org/rtecontent/document/code_v3/>. (consulté le 10.03.2011)

134- UNESCO. Universal Declaration on the Human Genome and Human Rights arts. *U.N. Educ., Sci. and Cultural Org*, 1997, vol. 2-6.

135- BEHAR M. Will Genetics Destroy Sports ? *Discover*, 2004, vol. 25, p. 41-45.

136- MIAH A. Genetically modified athletes. *In Biomedical ethics, gene doping, and sport*. London : Routledge, 2004.

137- FUKUYAMA F. Our posthuman future. *Consequences of the biotechnology revolution*. London : Profile Books, 2002.

SERMENT DE GALIEN

« Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque ».

Nom : **NOBLET**

Prénom : **Jean-Baptiste**

Titre de la Thèse : **Thérapie génique et dopage**

Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie, Limoges, 2011

Mots-clés : Thérapie génique, Génothérapie, Transfection de vecteurs, Performance physique, Dopage génétique, Détection, Anti-dopage, Ethique.

RESUME

La thérapie génique repose sur l'introduction de matériel génétique tels que l'ADN ou l'ARN dans des cellules cibles d'un patient dans le but d'obtenir un effet thérapeutique. Selon le type de cibles cellulaires, on distingue la « génothérapie » germinale et la « génothérapie » somatique.

Les progrès issus de la recherche dans les domaines de conception, transfection de vecteurs et de contrôle de l'expression des gènes seront sans aucun doute d'un grand intérêt pour les sportifs et leur entourage afin d'améliorer les performances physiques.

Néanmoins, toute personne qui aura recours au dopage génétique illicite prendra des risques de santé majeurs, sans nécessairement bénéficier des effets escomptés.

A ce jour, de nombreux scientifiques travaillent sur l'élaboration de méthodes de détection novatrices, spécifiques, sensibles et non invasives.

Face aux enjeux éthiques, sociaux et médicaux, les organismes anti-dopage devront approfondir certains de leurs objectifs en maintenant une position plus neutre sur le caractère éthique du dopage génétique, et en établissant des relations avec les organisations internationales médicales et éthiques capables de mesurer les attitudes du public envers la modification génétique.

COMPOSITION DU JURY :

Président:	M. **BENEYTOUT** Jean-Louis	Professeur, Université de Limoges
Membres :	M. **LIAGRE** Bertrand	Maître de Conférences, Université de Limoges
	M. **PICARD** Nicolas	MCU-PH, Université de Limoges
	M. **NOUAILLE** Yves	Praticien hospitalier, CHU Limoges