

ÉCOLE DOCTORALE : **DES GÉNOMES AUX ORGANISMES**
UNIVERSITÉ D'EVRY VAL D'ESSONNE
Boulevard François Mitterrand
91025 EVRY Cédex

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES

Spécialité : biologie cellulaire et moléculaire

Vectorisation d'acides nucléiques dans le muscle squelettique à des fins thérapeutiques

Présentée et soutenue publiquement par :

Deborah ALIMI – GUEZ

GENETHON - FRE3087 CNRS
Laboratoire Administration-Vectorisation et Physico-Chimie
1bis rue de l'Internationale 91000 EVRY

pour l'obtention du grade de ***Docteur en Sciences***

Thèse soutenue le 23 septembre 2009 devant les membres du jury composé de :

Monsieur le Professeur Francis QUÉTIER
Madame le Docteur Marie-Pierre ROLS
Monsieur le Docteur Patrick MIDOUX
Madame le Docteur Blandine BRISSAULT
Monsieur le Docteur Antoine KICHLER

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse : le Professeur Francis Quétier d'en avoir accepté la présidence, le Docteur Marie Pierre Rols et le Docteur Patrick Midoux pour leur lecture critique de mon manuscrit ainsi que le Docteur Blandine Brissault d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je souhaite exprimer toute ma reconnaissance au Docteur Antoine Kichler qui m'a accueillie au sein de son laboratoire et qui a été un véritable allié pour moi au cours de cette thèse. Antoine, merci de m'avoir encadrée et accompagnée au quotidien dans mes travaux de recherche. Au cours de ces quatre années, j'ai pu apprécier tes qualités humaines et scientifiques, tes conseils et ton aide précieuse. Merci aussi pour tous les bons moments passés autour d'un pot et des incontournables Bretzel pour tes attentions à ne pas raconter de « blagues à la Bigard » devant moi et tant d'autres...

Je tenais aussi à remercier tous les membres de l'équipe Administration-Vectorisation et Physico-chimie. Pour commencer, merci à Christian pour sa patience, ses conseils ainsi que sa pédagogie. Tu m'as montré presque toutes les techniques que j'ai utilisées avec une gentillesse infinie. Cricri, merci beaucoup pour ta sympathie, ta bonne humeur, les pauses thés, les cancans, et tout le reste. Je pense, par exemple, à la fois où tu m'as accompagnée pour faire la queue (d'au moins 2h !!!) afin de retirer les billets pour le concert des Enfoirés. J'espère vraiment que notre amitié ne s'arrêtera pas à la fin de ma thèse.

Merci aussi à Gilles d'avoir supporté ma présence quotidienne, mes CD de Goldman et Céline Dion qu'il affectionne tant. Merci pour tous les services que tu m'as rendu (et ils sont nombreux), pour ta sympathie, merci de m'avoir fait découvrir la musique « de hurleurs » que tu adores, merci de m'avoir accompagnée à la gare lorsque j'étais en béquilles, et merci pour toutes tes qualités humaines que j'ai eu l'occasion d'apprécier durant ces 4 ans.

Merci aussi à Simon, Bérangère, les deux Xavier, Ludivine, Magdalena et David avec qui j'ai partagé aussi de bons moments.

Merci à Karine pour sa bonne humeur, son oreille attentive, ses pas de danse (tu te souviens de la choré de rabbi Jacob ?) et sa gentillesse. Merci aussi à Sylvie pour sa compagnie dans nos trajets Alfortville/Evry. On en a vécu des galères de RER!!! Merci à Christel, Fanny, Diana, Carole, Virginie, Philippe, Samia, David pour leurs discussions le midi à la Sodexho.

Merci aussi à l'équipe bioexpérimentation, en particulier à Laetitia pour les injections, merci à Isabelle, Simon, Emilie et Christophe pour les coupes musculaires et les marquages, merci à l'équipe plasmide pour la production des plasmides.

Merci à toute l'équipe Téléthon avec qui j'ai vécu des moments formidables. Je pense notamment à Valérie, Carine, Guillaume et Jérôme. Merci aussi à David, Françoise et Adrien de la mairie d'Evry pour leur collaboration dans l'organisation des spectacles. On a vécu ensemble pas de mal de rebondissements, de montage de site, de démontage aussi le samedi soir à 2h du mat, de tempêtes de vent, de pluie, d'installation de quelques tonnes de sable, etc... Merci aux différents équipes de la radio Evry'One d'avoir acceptées de co-animer avec moi les 30h du téléthon ces 3 dernières années, parce que tenir seule 30h de micro en direct, c'est vraiment dur !

Je voudrais également adresser un grand merci aux membres du département de Biologie de l'Université d'Evry au sein duquel j'ai réalisé mon monitorat puis mon année d'ATER. Merci à Cécile et Nathalie pour leur confiance et leur soutien, notamment pour l'obtention de mon poste d'ATER. Merci à Christelle, Aurélie, Stéphanie, Madeleine, Clémence, Julien, Maxime et bien d'autres. Merci aussi à Florence Hervy pour son professionnalisme et sa gentillesse.

Merci à Francis Quétier, Florence Hamon et Véronique Fournié pour l'organisation des doctoriales dont je garde un excellent souvenir. Merci aux membres du CIES de Versailles, notamment à Stéphanie pour la qualité de ces stages théâtre et pour les soirées salsa.

Enfin, j'aimerais adresser un énorme merci à ma famille, ma belle famille et mon mari qui m'ont supporté pendant cette phase difficile qu'est l'écriture de thèse. Merci à mes parents de m'avoir toujours soutenue dans tout ce que j'ai pu entreprendre, merci à Sandrine et Michaël, à Jonathan et Esther pour leurs encouragements quotidiens. Merci à Ethan, Eva, Edén, Liron et Victoria, mes neveux et nièces d'amour qui m'ont redonné le courage qui me manquait cruellement quelques fois. Merci à mon papa pour nos longues discussions et débats scientifiques médecin/biologiste. Et pour finir, j'aimerais dire un grand MERCI à Grégory, mon mari, qui m'a soutenu pendant ma thèse, qui m'a encouragé et qui a toujours cru en moi. Merci à toi, Greg, pour tout ça et pour tout le reste...

Abréviations

AAV	Virus associé à l'adénovirus
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine bovine sérique
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
CMC	Concentration micellaire critique
CMV	Cytomégaovirus
CPK	Créatine phosphokinase
DAB	3.3' Diaminobenzidine
DAPC	Dystrophin Associated Protein Complex
db	Double brin
DMB	Dystrophie musculaire de Becker
DMD	Dystrophie musculaire de Duchenne
DMEM	Dubelcco's Mod Eagle Medium
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité optique
DOC ou DCA	Acide déoxycholique (ou déoxycholate)
DOPE	Dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOTAP	dioléoyloxypropyltriméthylammonium propane
DOTMA	chlorure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium
DPH	diphénylhydantoïne
DTT	Dithiothréitol
Dys	Dystrophine
EDTA	Ethylènediamine acide tétraacétate
EF1 α	elongation factor 1 alpha
ET	Electrotransfert
FDA	Food and drug administration
GMP	Bonne pratique de fabrication
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
hMADS	Human Multipotent Adipose Derived Stem Cell
HPS	Héματοxyline-Phloxine-Safran
HS	Sérum de cheval (Horse serum)
IFN γ	Interféron
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IL-12	Interleukine 12
IM	Intramusculaire
IP	Intrapéritonéal
IP	Iodure de propidium
IP	Intrapéritonéal
ITR	Inversed terminal repeat
IV	Intraveineuse
kb	Kilobase
LacZ	Gène de la β -galactosidase
LB	Milieu Luria Bertani

LDH	lactate deshydrogénase
Luc	Luciférase de Photinus Pyralis
MCK	Muscle Creatine Kinase
MLV	Virus de la leucémie murine
MM ou MW	Masse moléculaire
MOPS	acide N-morpholino-3-propane sulfonique
mSeAP	Phosphatase alcaline sécrétée murine
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
NaP	Sodium phosphate
p/v ou w/v	Poids/volume
pb	Paire de base
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PEI	Polyéthylèneimine
PIs	Nombre d'impulsions ou pulses
POE	Oxyde de polyéthylène
PPO	Oxide de polypropylène
PS	Pénicilline/streptomycine
PVP	pyrrolidone de polyvinyle
RLU	Unité relative de lumière
SDS	Sodium dodécyl sulphate
SOC	Super Optimal Catabolite
SVF	Sérum de veau foetal
TA	Tibialis antérieur
TAE	Tris-acétate EDTA
TBE	Tris-borate EDTA
TG	Thérapie génique
UDCA	Acide ursodéoxycholique
UV	Ultra Violet
Vpr	Viral protein R
X-Gal	5-bromo-4-chloro-E-indolyl- β -D-galactoside

Liste des figures

Figure 1 - Représentation schématique de la thérapie génique.....	13
Figure 2 - Principe du saut d'exon.....	15
Figure 3 - Les cibles thérapeutiques de la thérapie génique (Source 2008).....	16
Figure 4 - Comparaison de l'efficacité de la thérapie génique par rapport à la protéothérapie.....	17
Figure 5 - ex vivo et in vivo.....	18
Figure 6 - Les différents obstacles au transfert de gène	19
Figure 7 - Principaux vecteurs utilisés lors de transferts de gènes	21
Figure 8 – Lentivirus.....	23
Figure 9 - AAV.....	24
Figure 10 - Un modèle pour l'assimilation des complexes cationiques par les cellules adhérentes.....	26
Figure 11 - Représentation schématique d'un lipide cationique	27
Figure 12 – Représentation d'un lipide cationique : le DOTAP.....	28
Figure 13 - Formule chimique de la PEI linéaire et branchée	29
Figure 14 - Séquence et structure α -hélicoidale du peptide LAH4.....	30
Figure 15 - Les étapes clés de la transfection par des vecteurs cationiques.....	31
Figure 16 - Vue schématique de l'encombrement du cytosol	32
Figure 17 - Schéma du pore nucléaire.....	33
Figure 18 - Technique de l'injection intra-artérielle sous pression	36
Figure 19 - Expression de la β -Galactosidase dans le muscle après injection d'ADN couplé à l'électrotransfert.	38
Figure 20 - Illustration de l'électrotransfert d'une patte de souris (TA) suite à l'injection d'ADN.....	39
Figure 21 - Etat du muscle à J5 et J21 après ET chez le rat.....	39
Figure 22 - Représentation schématique des poloxamères.....	40
Figure 23 - Solubilisation des membranes cellulaires par des détergents de type poloxamères	41
Figure 24 - Représentation d'un poloxamère de type PEO-PPO-PEO.....	42
Figure 25 - Poloxamères et activation de la voie de signalisation NF- κ B.....	43
Figure 26 - Éléments historiques de la description de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	44
Figure 27 - coupes de muscles sain et dystrophique.....	45
Figure 28 - le gène de la dystrophine	46
Figure 29 - structure de la protéine dystrophine avec ces différents domaines.....	47
Figure 30 - Reconstruction 3D de la localisation de la dystrophine à partir de microscopie confocale de fibres musculaires isolées	48
Figure 31 - Schéma représentant le complexe des protéines associées à la dystrophine (DAPC)	49
Figure 32 - carte du plasmide pSMD2-Luc-delITR	59
Figure 33 - carte du plasmide pCMV_LacZ	60
Figure 34 - carte du plasmide pCMV_mSEAP	61
Figure 35 – Le générateur et les accessoires pour l'électrotransfert.....	63
Figure 36 - Optimisation du mode d'injection avant électrotransfert.....	85
Figure 37 - Optimisation de la concentration de NaCl pour l'électrotransfert	86
Figure 38 - Optimisation du nombre d'impulsions en électrotransfert	87
Figure 39 - Optimisation du voltage en électrotransfert.....	88
Figure 40 - Effet du promoteur sur l'efficacité de transfection par ET.....	89
Figure 41 - Représentation schématique des différentes structures de copolymères tri-blocs	91
Figure 42 - Profil électrophorétique des "complexes" ADN/Poloxamères.....	94
Figure 43 - Evaluation de l'efficacité de transfection in vitro des poloxamères.....	95
Figure 44 - Evaluation de l'efficacité de transfection d'une gamme de P105.....	97
Figure 45 – Comparaison de l'efficacité de 0,1% P105 et 0,5% P105.....	98
Figure 46 - Comparaison de l'efficacité de transfection de P105 en fonction du promoteur	99
Figure 47 - Effet du solvant sur l'efficacité de transfection	100
Figure 48 - Représentation de l'activité β -galactosidase sur des coupes musculaires	102
Figure 49 - Evaluation de l'efficacité de transfection du P105 avec le gène mSeAP.....	103
Figure 50 - Comparaison de l'efficacité de transfections de différents poloxamères	105
Figure 51 - Evaluation de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux.....	107
Figure 52 - Test de perméabilité membranaire sur des cellules HepG2.....	108
Figure 53 - Test de viabilité cellulaire avec les 5 poloxamères.....	109

Figure 54 - Test de perméabilité membranaire sur des myotubes C2C12	110
Figure 55 - Test de viabilité cellulaire MTT sur les myotubes C2C12	111
Figure 56 - Mise en évidence de la perméabilisation membranaire in vivo	112
Figure 57 – Traitement des poloxamères au bleu Evans	113
Figure 58 - Combinaison de l'électrotransfert et de P105	114
Figure 59 - Effet d'une incubation de L64 sur des cellules transfectées	117
Figure 60 - Effet de la vitesse d'injection sur l'efficacité de transfection	119
Figure 61 - Effet de la température sur l'efficacité de transfection	120
Figure 62 - Profil électrophorétique des "complexes" ADN/Polymères	122
Figure 63 - Evaluation de l'efficacité de transfection in vitro d'une série de polymères	124
Figure 64 - Evaluation de l'efficacité de transfection d'une série de polymères préparés dans une solution de NaCl 150mM	125
Figure 65 - Evalutaion de l'efficacité de transfection d'une série de polymères préparés dans une solution de Tyrode	126
Figure 66 - Comparaison de l'efficacité de transfection du 25R2 et du P105	127
Figure 67 - Evaluation de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux.....	128
Figure 68 - Test de perméabilité membranaire sur des myotubes C2C12	129
Figure 69 - Mesure de la viabilité cellulaire d'une série de copolymères via le test MTT.....	130
Figure 70 - Structure de l'acide déoxycholique (DCA) et de l'acide ursodéoxycholique (UDCA)	132
Figure 71 - Comparaison de l'efficacité de transfection des acides biliaires par rapport au poloxamère P105.	133
Figure 72 - Comparaison de l'effet de la concentration saline sur l'efficacité de transfection.....	134
Figure 73 - Test de perméabilité cellulaire LDH sur les cellules HepG2.....	135
Figure 74 - Test de perméabilité membranaire LDH sur des myotubes C2C12	136
Figure 75 - Test de viabilité cellulaire sur les cellules HepG2.....	137
Figure 76 - Test de viabilité cellulaire sur les myotubes C2C12	138
Figure 77 – Test de la perméabilisation in vivo du DOC via le bleu Evans.....	139
Figure 78 - Couplage DOC et électrotransfert	140
Figure 79 - Transfert de gène avec le gène rapporteur mSeAP.....	142
Figure 80 - Efficacité du DOC sur des souris gamma-sarco	143
Figure 81 - Coupes histologiques obtenues suite à l'injectio de microdystrophine	144

Table des matières

I.	Introduction	13
I.1.	La thérapie génique	13
I.1.1.	Généralités	13
I.1.2.	Les cellules cibles	18
I.1.3.	Les obstacles au transfert d'ADN non vectorisé	19
I.1.4.	Les techniques de vectorisation	21
I.4.1.1	Vecteurs viraux	22
a.	Généralités	22
b.	Rétrovirus de type MLV	22
c.	Rétrovirus de type lentivirus	22
d.	Adénovirus	23
e.	AAVs	23
I.4.1.2	Approches non virales	24
a.	Techniques non virales peu efficaces dans le muscle	26
i.	Composés cationiques	26
ii.	Lipides	27
iii.	Polymères	28
iv.	Peptides	29
v.	Mode d'action des vecteurs cationiques	30
b.	Techniques non virales « efficaces » dans le muscle	34
i.	Techniques physiques	34
I1i	Microinjection	34
I2i	Biolistique	34
I3i	Ultra-sons (ou sonoporation)	35
I4i	Injection sous pression	35
I5i	Electrotransfert	36
I15	Principe	36
I25	Brefs rappels historiques	36
I35	L'électrotransfert et le muscle	37
I45	Mode d'action et réalisation pratique	38
ii.	Vecteurs chimiques : les polymères amphiphiles	40
I1ii	Carte d'identité des Poloxamères	40
I2ii	Brefs rappels historiques	40
I3ii	Mode d'action et propriétés chimiques	41
I4ii	Les poloxamères et le transfert de gène dans le muscle	42
I.2.	Applications à la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)	44
I.2.1.	La maladie	44
I.2.2.	Aspects cliniques	45
I.2.3.	Gène et protéine dystrophine	46
I.3.2.1	Gène de la dystrophine	46
I.3.2.2	La protéine dystrophine	47
a.	Structure de la protéine	47
b.	Le complexe des protéines associées à la dystrophine (DAPC)	48
I.3.2.3	Modèles animaux	50
I.2.4.	Les traitements	51
I.4.2.1	Les traitements palliatifs	51
I.4.2.2	Demain, un traitement curatif ?	52
a.	La thérapie génique	52
b.	La thérapie cellulaire	53
c.	Quelques autres pistes thérapeutiques	53
I.3.	Description du projet de thèse	55
II.	Matériels et Méthodes	57
II.1.	Matériels	57

II.1.1.	Les tampons	57
II.1.2.	Les lignées cellulaires	58
II.1.3.	Les plasmides	58
II.3.1.1	Les plasmides codant la luciférase	58
a.	pSMD2-lucΔITR	58
b.	pEF1_luc, pC5-12_luc, pSV40_luc	59
II.3.1.2	Plasmides codant pour d'autres gènes rapporteurs	60
a.	pCMV_LacZ	60
b.	pCMV_mSeAP	61
II.3.1.3	Plasmide codant pour le gène fonctionnel : dystrophine	62
II.1.4.	Les agents transfectants cationiques	62
II.1.5.	L'électroporateur BTX	62
II.1.6.	Les animaux	63
II.6.1.1	Les souris Balb/C	63
II.6.1.2	Les souris mdx	63
II.2.	Les Méthodes	64
II.2.1.	Les méthodes des expériences <i>in vivo</i>	64
II.1.2.1	Les plasmides	64
a.	Transformation de bactéries compétentes avec le plasmide d'intérêt	64
b.	Production et purification de l'ADN	65
i.	Préparation d'ADN plasmidique en vue de transfections <i>in vitro</i>	65
ii.	Préparation d'ADN plasmidique « endotoxin free » en vue d'injections <i>in vivo</i>	66
II.1.2.2	Gels retard	68
II.1.2.3	Transfections	68
a.	Les conditions de culture des lignées cellulaires	68
i.	Conditions de culture	68
ii.	Conditions de transfection <i>in vitro</i>	69
b.	Préparations des complexes transfectants	70
II.1.2.4	Test Luciférase	70
a.	Dosage de la luciférase	70
b.	Dosage protéique Bradford	71
II.1.2.5	Suivi de la perméabilisation membranaire par l'iodure de propidium (IP)	71
II.1.2.6	Le test d'intégrité membranaire LDH (Lactate Deshydrogenase)	72
II.1.2.7	Le test de viabilité cellulaire MTT	73
II.2.2.	Concentration Micellaire Critique (CMC)	73
II.2.3.	Les expériences <i>in vivo</i>	74
II.3.2.1	Injection d'ADN nu	74
II.3.2.2	Préparation des mélanges ADN/copolymères	74
II.3.2.3	Injections	74
a.	Injections par voie intramusculaire (IM)	74
b.	Injections par voie intrapéritonéale (IP)	75
II.3.2.4	Sacrifices et prélèvements	75
a.	Prélèvements pour analyses biochimiques	75
b.	Prélèvements pour analyses histologiques	75
II.3.2.5	Mesure du niveau d'expression <i>in vivo</i> des gènes rapporteurs	76
a.	Test luciférase sur les échantillons musculaires	76
b.	Détection de la phosphatase alcaline sécrétée	76
II.3.2.6	Histologie	77
a.	Coupes sur cryostat	77
b.	Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS)	77
c.	Coloration mSeAP sur les coupes musculaires	77
d.	Mise en évidence de la bêta-galactosidase sur des coupes musculaires	78
e.	Observation du marquage au bleu Evans	79
II.3.2.7	Immunomarquage	79
a.	Marquage anti-laminine	79
b.	Marquage de la dystrophine	80
III.	Résultats	82

III.1. Optimisation des conditions d'études de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert	82
III.1.1. Introduction	82
III.1.2. Contexte	82
III.1.3. Technique de l'électrotransfert	82
III.1.4. Optimisation des conditions d'électrotransfert	83
III.1.5. Optimisation du mode d'injection	84
III.5.1.1 Effet de la concentration du solvant	86
III.5.1.2 Nombre d'impulsions	87
III.5.1.3 Voltage	88
III.5.1.4 Action des promoteurs sur l'efficacité de transfection par la technique d'électrotransfert	89
III.1.6. Conclusions	90
III.2. Etude de l'efficacité de transfection de poloxamères	90
III.2.1. Introduction	90
III.2.2. Contexte	91
III.2.3. Etude de l'efficacité de transfection de 5 poloxamères	93
III.3.2.1 Evaluation de l'efficacité des poloxamères à « complexer » l'ADN plasmidique	93
III.3.2.2 Evaluation de l'efficacité de transfection	94
III.3.2.3 Le transfert de gène <i>in vivo</i> avec P105	96
III.3.2.4 Evaluation de P105 avec différents promoteurs	98
III.3.2.5 Effet de la composition de la solution saline sur l'efficacité de transfection	100
III.3.2.6 Transfert de gènes avec les gènes rapporteurs LacZ et mSeAP	101
III.3.2.7 Evaluation <i>in vivo</i> de 4 autres poloxamères	104
III.3.2.8 Evaluation de la perméabilité membranaire	106
III.3.2.9 Effet de l'électrotransfert couplé au poloxamère P105	113
III.3.2.10 Relation entre CMC et activité de transfection	115
III.3.2.11 Transactivation du promoteur CMV	116
III.3.2.12 Efficacité de transfection et vitesse d'injection	118
III.3.2.13 Effet de la température sur l'efficacité de transfection	120
III.2.4. Etude de l'efficacité de transfert de gène des copolymères Pluronic reverse et Tetronic	121
III.4.2.1 Evaluation de l'efficacité d'une nouvelle série de copolymères à « complexer » l'ADN plasmidique	121
III.4.2.2 Evaluation de l'efficacité de transfection	122
III.4.2.3 Le transfert de gène <i>in vivo</i>	124
III.4.2.4 Evaluation de la perméabilité membranaire	127
III.2.5. Conclusion sur l'ensemble des copolymères testés	131
III.3. Injection des complexes ADN plasmidiques / Acides Biliaires	132
III.3.1. Introduction	132
III.3.2. Etude de l'efficacité de transfection des acides biliaires	133
III.2.3.1 Evaluation de l'efficacité de transfection	133
III.2.3.2 Effet de la composition de la solution saline sur l'efficacité de transfection	134
III.2.3.3 Evaluation de la perméabilité membranaire	135
a. Perméabilité membranaire sur les cellules	135
b. Perméabilité membranaire <i>in vivo</i>	139
III.2.3.4 Effet de l'électrotransfert couplé à l'acide déoxycholique DOC	140
III.2.3.5 Transfert de gène chez des souris dystrophiques mdx CV4 avec le gène rapporteur mSeAP	141
III.2.3.6 Transfert de gènes sur des souris gamma-sarcoglycan -/-.	142
III.2.3.7 Transfert de gène <i>in vivo</i> avec un gène fonctionnel	144
IV. Discussion et perspectives	147
V. Conclusion	152
VI. Bibliographie	154
VII. Communications scientifiques	166
VIII. Publication	168

INTRODUCTION

I. Introduction

I.1. La thérapie génique

I.1.1. Généralités

Débutée il y a une trentaine d'années, la thérapie génique repose sur l'introduction de matériel génétique (ADN ou ARN) dans des cellules cibles d'un patient dans le but d'obtenir un effet thérapeutique. Le concept initial de la thérapie génique consistait à la compensation de gènes dont l'altération était responsable de maladies génétiques (Figure 1, ci-dessous).

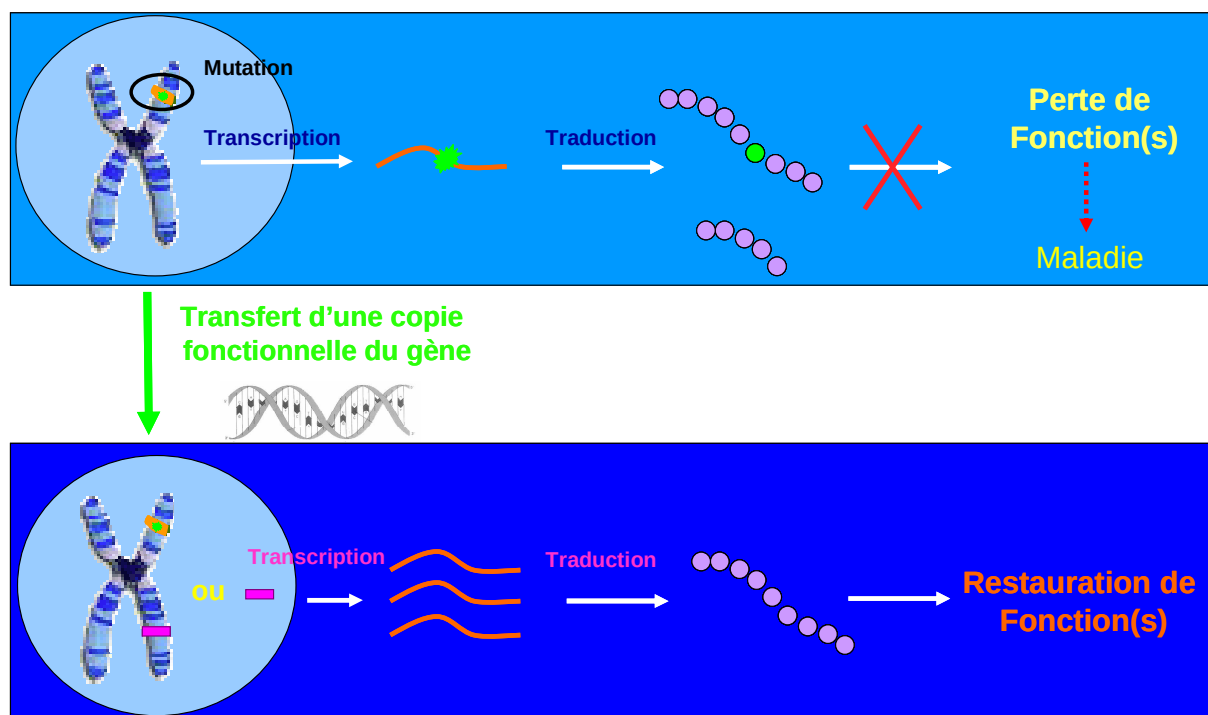


Figure 1 - Représentation schématique de la thérapie génique

Puis, ce concept a naturellement évolué vers l'utilisation du gène comme nouveau type de médicament. En effet, je voudrais citer un passage d'un des livres d'Axel Kahn, qui je le pense, résume bien toute l'envergure de la thérapie génique :

« Avec la thérapie génique, le gène devient un possible médicament. La thérapie génique pourra s'appliquer, évidemment, à des maladies génétiques, et, plus généralement, à toutes les affections, héréditaires ou acquises, qui peuvent bénéficier du traitement par une protéine thérapeutique. En effet, il est, en principe, toujours possible de remplacer un médicament protéique par le gène qui va en commander la synthèse dans les propres cellules du malade qu'il faut soigner. En ce sens, la thérapie génique constitue la troisième étape de l'utilisation des protéines médicamenteuses. La première est celle de la purification à partir de tissus ou de fluides animaux ou humains ; la seconde est le génie génétique, où l'on asservit des micro-organismes à produire le médicament protéique en leur transférant le gène correspondant ; la thérapie génique, enfin, transfère directement l'ADN dans l'organisme qu'il faut soigner, des cellules de celui-ci devenant des microfabriques du médicament et des microsystèmes de sa délivrance au malade. » (D'après *La Thérapie Génique : thérapie du gène et gène-médicament*, Axel Kahn, Editions TEC & DOC, Paris, février 2001)

A cet effet, de nombreuses approches peuvent être envisagées en fonction de l'effet désiré. Nous en citerons quelques unes :

- **Le transfert d'une copie fonctionnelle du gène muté :**

Dans les cas où le gène déficient conduit à la formation d'une protéine non fonctionnelle, à l'origine de la maladie, la stratégie additive permet de restaurer la fonction de la protéine conduisant ainsi le patient à retrouver un phénotype sain. Les maladies monogéniques comme la mucoviscidose ou les myopathies (notamment, la Myopathie de Duchenne sur laquelle nous nous pencherons plus particulièrement dans ce manuscrit) sont concernées par cette approche.

- **La correction génique :**

Cette approche consiste à corriger *in situ* le gène muté. L'objectif de cette stratégie est de corriger des mutations ponctuelles dans la cellule en utilisant par exemple des oligonucléotides simple-brins, des grands fragments d'ADN simple ou double-brins et des vecteurs dérivés du virus associé à l'adénovirus (rAAV).(1, 2)

- **Introduction d'un gène apoptotique :**

Cette stratégie repose sur l'introduction d'un gène conduisant à la mort d'une cellule malade (apoptose)(3). Ceci peut être particulièrement intéressant pour le traitement de tumeurs.

- **Inactivation d'ARN messagers par des approches ARN interférence :**

Il existe différentes stratégies ciblant les ARN et visant une diminution de la traduction. Parmi elles, on peut citer la destruction des ARNm par l'approche de l'ARN interférence. (4-6)

- **Modification de l'épissage :**

Nous pouvons citer ici un exemple bien connu au sein du laboratoire GENETHON, à savoir le saut d'exon (7).

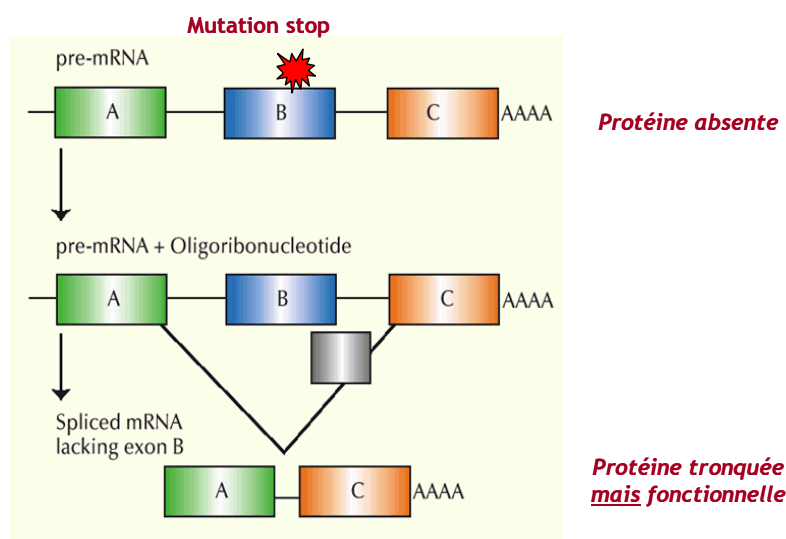


Figure 2 - Principe du saut d'exon

La mutation stop sur l'ARN messager conduit à l'absence de production de la protéine. Le saut d'exon permet, à l'aide d'oligonucléotides spécifiques, de « sauter » l'exon portant la mutation et de traduire l'ARNm en une protéine certes tronquée, mais fonctionnelle.

Cette approche permet d'interagir avec la machinerie d'épissage des ARN messagers (via des ARN antisens) et de restaurer la protéine manquante chez les malades, sous une forme tronquée mais cependant fonctionnelle.

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 :

traitement de maladies acquises ou encore développement de vaccins à ADN. Ainsi, depuis 1989, date du premier essai clinique, 1400 essais cliniques ont depuis vu le jour au niveau international. (Figure 3, ci-dessous)

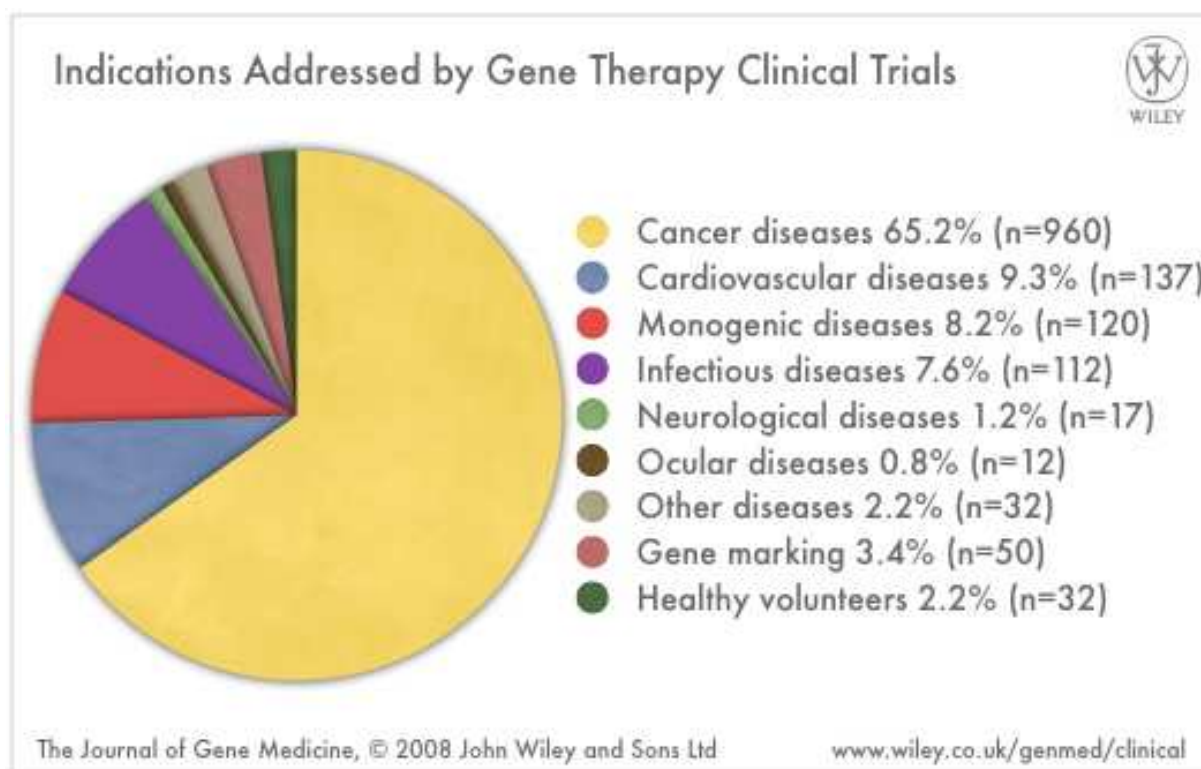


Figure 3 - Les cibles thérapeutiques de la thérapie génique (Source 2008)

A noter qu'environ 70% des essais se sont focalisés sur le traitement du cancer, contre 20% sur le traitement de maladies héréditaires et 10% sur les affections diverses comme les infections virales.

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 du fait d'une rapide élimination dans la circulation sanguine. De plus, les traitements utilisant ces protéines recombinantes nécessitent des injections à forte dose, et qui doivent être répétées dans le temps, ce qui entraîne fréquemment des effets indésirables, voire une certaine toxicité. En revanche, la thérapie génique permet quant à elle, une

production à long terme et potentiellement régulée de protéine thérapeutique. Elle peut aussi permettre une expression localisée du transgène, évitant ainsi tout risque lié à la présence systémique de protéine (Figure 4, ci-dessous)

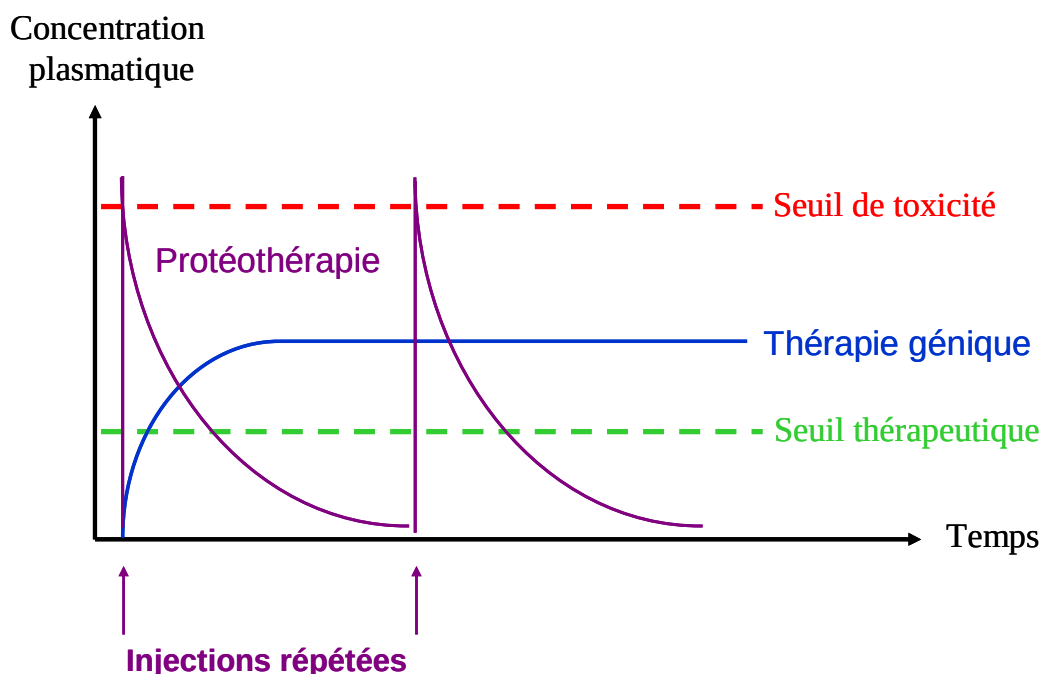


Figure 4 - Comparaison de l'efficacité de la thérapie génique par rapport à la protéothérapie

La thérapie génique (TG) présente donc de nombreux atouts. Cependant, cette nouvelle approche en est encore à un stade expérimental, puisqu'il existe aujourd'hui un seul médicament de thérapie génique. En effet, SiBiono Genetech est le premier au monde à commercialiser une thérapie génique. Son médicament, la Gendicine, lutte contre le cancer du nasopharynx en injectant un adénovirus porteur d'un gène (le p53) directement dans la tumeur, empêchant la reproduction des cellules cancéreuses. La Gendicine a obtenu en 2004 l'approbation de l'autorité de régulation chinoise, la SFDA. Une des limitations importantes reste posée par les outils permettant le transfert du gène au sein des cellules. Aucun d'eux ne possède encore l'efficacité et la sécurité requises pour une utilisation courante chez l'homme. Par conséquent, un travail fondamental est encore à accomplir dans ce domaine.

I.1.2. Les cellules cibles

A partir d'une cellule œuf, on obtient 2 types de lignées cellulaires : les cellules germinales (à l'origine de la formation des gamètes) et les cellules somatiques (toutes les autres cellules). Pour des raisons éthiques, les manipulations génétiques sont autorisées, à ce jour uniquement sur les cellules somatiques (8). En fonction de l'indication, le transfert de gène peut se faire par deux approches communément appelées : *ex vivo* et *in vivo*.

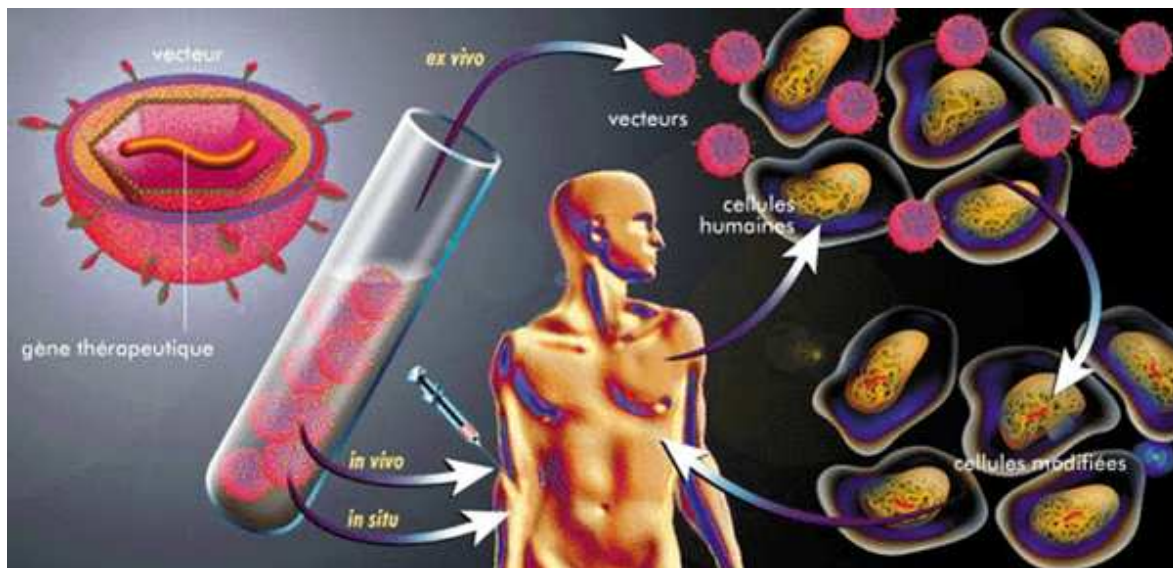


Figure 5 - ex vivo et in vivo

Le traitement *ex vivo* consiste à prélever les cellules du patient, à les modifier génétiquement *in vitro* puis à les lui réimplanter. Cette approche, bien que lourde techniquement, est intéressante car il est possible de maîtriser l'étape du transfert de gènes. Cependant, elle présente ses limites car elle n'est applicable qu'à un nombre limité de maladies. Ce dernier point pourrait cependant être revu le jour où l'on saura manipuler et amplifier à volonté les cellules souches. L'approche *ex vivo* a tout de même connu de grands succès thérapeutiques avec notamment le traitement des « bébés bulles », par l'équipe d'Alain Fischer à l'hôpital Necker (9).

Le traitement *in vivo* consiste à injecter directement le gène thérapeutique au patient. L'injection peut se faire par voie locale (l'injection se fait au sein même du tissu à traiter) ou bien par voie systémique (l'injection se fait via la circulation sanguine).

L'administration locale – lorsqu'elle est suffisante pour être thérapeutique et réalisable techniquement - présente l'avantage de concentrer l'ADN thérapeutique dans le tissu cible (muscle, tumeur, poumon, peau par exemple) et d'éviter ainsi une trop grande diffusion dans des organes non ciblés tels que le foie ou les reins, ce qui peut être source de toxicité (10).

I.1.3. Les obstacles au transfert d'ADN non vectorisé

L'ADN qui porte l'information nécessaire à l'expression d'un gène thérapeutique est un polymère anionique de haut poids moléculaire (typiquement entre 2 et 5 millions). Il doit franchir de nombreuses barrières biologiques (extracellulaires et intracellulaires) pour atteindre le noyau des cellules cibles. Sa taille conséquente est un facteur limitant pour son entrée dans la cellule. (Figure 6, ci-dessous)

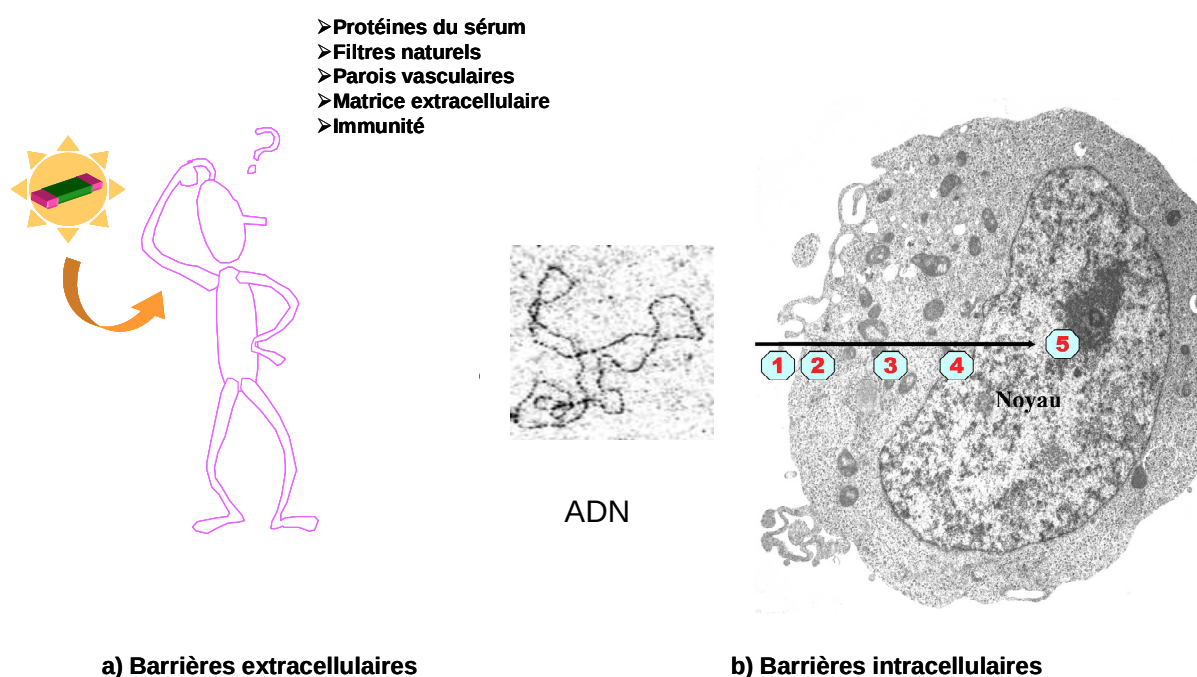


Figure 6 - Les différents obstacles au transfert de gène

L'acide nucléique doit d'abord arriver jusqu'au tissu cible, éventuellement passer la barrière vasculaire et le tissu conjonctif pour enfin arriver aux cellules cibles où il subit une répulsion électrostatique. En effet, l'ADN étant une molécule polyanionique,

il va se voir repoussé par les glycoprotéines membranaires qui elles aussi sont chargées négativement. Il doit passer la membrane plasmique délimitant la cellule (étapes 1 à 2), puis traverser le cytosol (étape 3, en évitant les nucléases (11)). L'ADN doit ensuite être importé dans le noyau (étapes 4 à 5). Cette entrée dans le noyau peut avoir lieu de façon passive lors de la mitose (l'enveloppe nucléaire est rompue) ou bien via un pore nucléaire (si l'enveloppe nucléaire est intacte). Notons toutefois que seules les molécules ayant une masse moléculaire $MM < 40\text{kDa}$ peuvent diffuser de manière passive à travers le pore pour des molécules plus grosses, le transport actif sera requis (ainsi que des signaux spécifiques permettant ce transport).

C'est donc un parcours semé d'embûches. Pour y parvenir il est par conséquent indispensable de disposer de moyens permettant de surmonter ces multiples barrières, d'où la nécessité de vectoriser l'ADN afin de franchir plus facilement l'ensemble de ces obstacles.

De nombreuses équipes se sont penchées sur l'étude du vecteur idéal pour le transfert de gène. De fait, un seul vecteur ne pourra pas répondre à l'ensemble des applications. En effet, pour certaines pathologies, une certaine immunogénicité du vecteur peut-être bénéfique (adénovirus en cancérologie par exemple) alors que pour d'autres maladies, un système de vectorisation exempt d'immunogénicité sera requis. En tenant compte de la pathologie à traiter, de la nature du gène à transférer, de ses mécanismes d'action, de la durée d'expression recherchée, et enfin des cellules cibles à atteindre, il faudra donc trouver le vecteur qui satisfera au mieux toutes ses conditions.

Ceci étant, certaines caractéristiques devront – idéalement - être partagées par tous les vecteurs, à savoir (12):

- interagir avec l'ADN de manière à favoriser son entrée dans la cellule
 - être spécifique vis-à-vis des cellules cibles
 - résister aux dégradations enzymatiques (notamment lysosomales)
- et/ou aux attaques par le système immunitaire
- ne pas engendrer – ou de manière minime – d'effets indésirables

- pouvoir être produit avec une grande reproductibilité en quantité suffisante pour une application chez l'homme.

I.1.4. Les techniques de vectorisation

Comme nous venons de le voir, le transfert d'acides nucléiques jusqu'au noyau des cellules nécessite un transporteur - ou vecteur. Les techniques de vectorisation qui ont été développées au cours de ces deux dernières décennies peuvent être divisées en deux grandes catégories, à savoir les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Nous allons détailler les principaux vecteurs utilisés (Figure 7, ci-dessous)

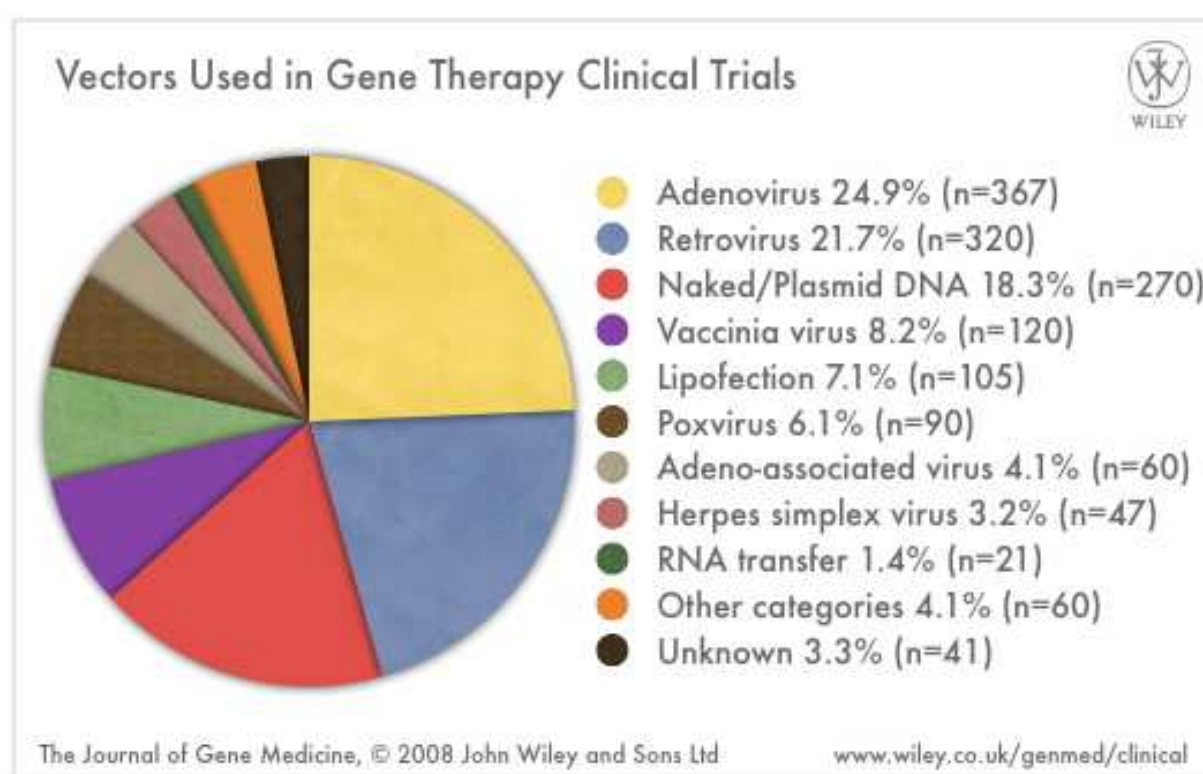


Figure 7 - Principaux vecteurs utilisés lors de transferts de gènes

L'adénovirus est le vecteur le plus utilisé en clinique (environ 25%), ensuite vient le rétrovirus. L'injection d'ADN nu représente environ 18% des essais cliniques. A noter que l'AAV ne représente que 4% des essais.

I.4.1.1 Vecteurs viraux

a. Généralités

Parmi les différentes techniques de transfert de gène dans les cellules cibles, une première technique, développée à partir du milieu des années 1980, consiste à transporter l'acide nucléique d'intérêt grâce à des vecteurs viraux (13). Le principe est simple : on utilise la capacité des virus à pénétrer dans les cellules hôtes pour y transférer le gène d'intérêt (14-16).

Brièvement, le transfert de gène par des vecteurs viraux repose sur l'utilisation du virus pour transporter l'ADN au sein de la cellule cible, mais le génome du virus est modifié afin de supprimer les séquences permettant sa réplication ainsi que les séquences responsables de sa virulence, dans le but d'y incorporer les séquences d'intérêt thérapeutique. Le virus modifié conserve ainsi sa capacité de pénétration dans les cellules. Il permet la production de la protéine d'intérêt thérapeutique, mais sans production de particules virales.

b. Rétrovirus de type MLV

Les rétrovirus de type MLV (rétrovirus de la leucémie murine) (virus enveloppés à ARN, capacité d'insert $\leq 8\text{kb}$) ont été les premiers virus à être utilisés (17). 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 (18). Les gènes transférés sont ainsi transmis aux générations successives de cellules filles, permettant ainsi une expression à long terme. Cependant leur emploi reste 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*.

c. Rétrovirus de type lentivirus

Actuellement, des équipes de recherche travaillent sur le développement d'autres rétrovirus, et en particulier les lentivirus.

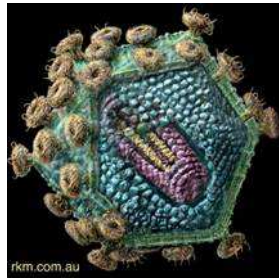


Figure 8 – Lentivirus

Les virions sont enveloppés dans une sphère et mesurent 80 à 100 nm de diamètre.

Les lentivirus pénètrent activement dans le noyau et peuvent transduire efficacement des cellules en prolifération mais également des cellules quiescentes. Les premiers vecteurs inactivés pour la réplication dérivent de HIV-1. Mais depuis quelques années, d'autres lentivirus (simiens, félins...) sont en développement dans des laboratoires. Des résultats encourageants de transfert de gène *in vivo* ont pu être obtenus (19, 20).

d. Adénovirus

Les adénovirus qui sont des virus à ADN double brin, sont largement utilisés dans le domaine de la thérapie génique. Ils sont capables d'infecter de nombreux types de cellules quiescentes ou en prolifération (21). Ils ne s'intègrent pas au génome mais restent sous forme épisomale dans la cellule hôte. Ils ont un tropisme naturel pour les voies aériennes supérieures. La première génération de vecteurs était très immunogène ce qui contribuait à la disparition de l'expression du transgène. Les adénovirus de deuxième et troisième génération ont été dépourvus de leurs gènes viraux excepté les ITR (Inversed Terminal Repeat), permettant ainsi de réduire leur immunogénicité (22). Différents essais cliniques de phase II et III pour des applications angiogéniques et pour le cancer font appel à des adénovirus (23).

e. AAVs

Les vecteurs AAVs (virus associés aux adénovirus, capacité d'insert ≤ 8 kb) sont des parvovirus de petite taille, non enveloppés, et possédant une molécule d'ADN monocaténaire.

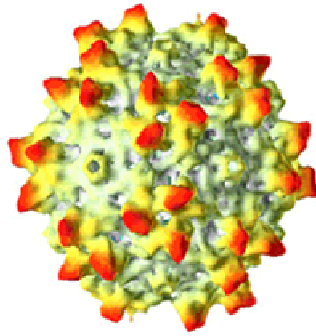


Figure 9 - AAV

Petite particule d'AAV non enveloppée de 18 à 25 nm de diamètre. Non pathogène chez l'homme.

Ils tirent leur nom du fait qu'ils ont besoin de l'aide d'un autre virus (adénovirus ou virus Herpes) pour accomplir leur cycle complet de réplication. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules cibles quiescentes ou en prolifération. Les vecteurs AAV semblent conjuguer les avantages des rétrovirus et des adénovirus. A noter que le virus sauvage ne présente aucune toxicité pour l'homme. A ce jour, 12 sérotypes ont été identifiés chez les primates. Le sérotype le mieux caractérisé et donc le plus utilisé en thérapie génique est le sérotype 2. Malgré les problèmes des anticorps neutralisants (préexistants ou générés suite à une première administration), les vecteurs AAV semblent très prometteurs de part leur efficacité de transfection *in vivo* (24). En effet, les essais *in vivo* ont montré une expression stable pendant plusieurs années chez la souris (25) et chez les gros animaux (26) après injection et même après administration orale (27).

I.4.1.2 Approches non virales

L'utilisation des vecteurs non viraux comme vecteurs de thérapie génique est intéressante à plus d'un niveau. En effet, du fait de l'absence d'enveloppe ou de capside, la taille du gène n'est pas conditionnée par une quelconque limite d'emballage comme c'est le cas pour les vecteurs viraux. De plus, ce sont le plus souvent des molécules synthétiques de structure simple donc peu immunogènes, ce qui permet des administrations répétées. Enfin, les vecteurs non viraux offrent des facilités de production, de contrôle, et de validation à grande échelle pour un éventuel développement clinique.

Mais avant de traiter des différentes méthodes non virales, faisons une brève rétrospective sur l'utilisation d'ADN nu (c'est-à-dire non vectorisé) (28). Cette technique relativement efficace dans le muscle squelettique et dans la peau (29) a vu le jour grâce à l'équipe de Jon Wolff en 1990. En effet, Wolff et al. ont obtenu des résultats surprenants en injectant en intramusculaire de l'ADN plasmidique sans aucun système de vectorisation : des niveaux détectables d'expression du transgène ont alors été observés dans le muscle (30). De plus, l'expression du transgène semblait durer dans le temps puisqu'elle a été observée plusieurs mois après l'injection initiale (31).

On ne connaît toujours pas à ce jour le mécanisme d'entrée de l'ADN nu dans les cellules de l'organe injecté *in vivo*. Cependant, cette découverte a été une promesse d'espoir pour le traitement de maladies génétiques. Effectivement, l'ADN nu est un candidat très intéressant puisqu'il rassemble nombre de critères essentiels au développement industriel : sa production à grande échelle est simple, il n'est pas ou peu toxique et il est facile d'utilisation.

Cette technique peut être aussi étendue au domaine de la production de protéines sécrétées (32) et de la vaccination. Il a été montré que l'injection directe d'ADN plasmidique dans le muscle ou la peau permet la production d'antigènes protéiques *in situ* et l'induction de réponses immunitaires protectrices, sans l'aide d'adjuvants (33). Ainsi, la vaccination constitue une des applications majeures de l'injection d'ADN nu. Toutefois, la présence sur les plasmides de séquences bactériennes riches en îlots CpG non méthylés favorise *in vivo* les réponses inflammatoires et immunitaires (34, 35). Ceci représente un avantage pour les applications de vaccination mais un inconvénient pour les traitements de maladies par thérapie génique.

Alors que l'injection d'ADN nu est une approche très prometteuse de transfert de gène dans le muscle (36), elle est plus difficilement envisageable pour des approches en administration par voie intraveineuse. En effet, l'ADN plasmidique nu, subit une dégradation très rapide par les protéines du sérum (les nucléases) et possède une demi-vie plasmatique très courte (37, 38). Ceci étant dit, l'injection hydrodynamique d'ADN par voie IV a prouvé une bonne efficacité chez les animaux pour transfecter le foie.

Bien que l'injection d'ADN nu dans le muscle donne des résultats positifs, les niveaux d'expression obtenus sont encore insuffisants pour envisager une application autre que vaccinale (39). C'est pourquoi, dans le but d'améliorer l'efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo*, l'ADN a été associé à des vecteurs chimiques ou bien avec des techniques physiques.

a. Techniques non virales peu efficaces dans le muscle

i. Composés cationiques

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux vecteurs cationiques ont été développés. Ces molécules se lient à l'ADN et forment alors des complexes chargés positivement qui favorisent ainsi le transfert de l'ADN dans les cellules (40-42).

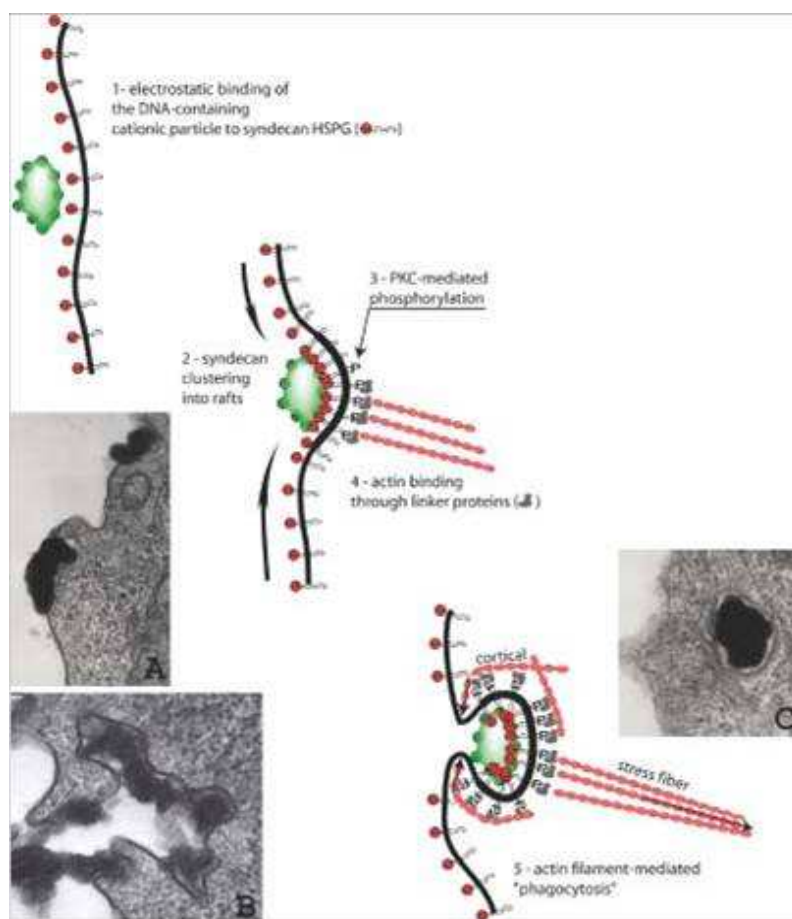


Figure 10 - Un modèle pour l'assimilation des complexes cationiques par les cellules adhérentes (d'après Kopatz I, Remy JS, Behr JP: A model for non-viral gene delivery: through syndecan adhesion molecules and powered by actin, J Gene Med. 2004 Jul;6(7):769-76.)

Parmi les plus utilisés, on retrouve les lipides cationiques (tel que le « DOTAP » pour (dioléoyloxypropyltriméthylammonium propane) et les polymères cationiques (en particulier les polyéthylènimines ou PEIs)

ii. Lipides

Les lipides cationiques sont constitués de trois domaines : une tête hydrophile cationique (comportant une ou plusieurs charges positives (43)), un bras espaceur et une ou plusieurs chaînes hydrophobes.

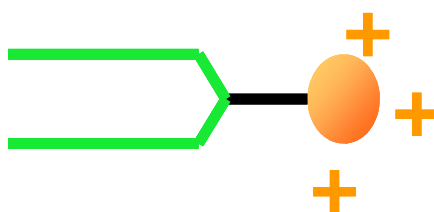


Figure 11 - Représentation schématique d'un lipide cationique

C'est la tête cationique qui permet la liaison avec l'ADN. En effet, en s'associant à l'ADN, les lipoplexes (nom donné aux complexes formés par l'association ADN/lipide) forment des structures lamellaires. L'efficacité de la transfection est dépendante du lipide cationique utilisé, du rapport de charge lipide/ADN, du type de cellules/tissus transfectés. Afin d'améliorer la stabilité des complexes ou de faciliter la sortie de l'ADN des endosomes, des lipides neutres tels que la DOPE ou le cholestérol peuvent être ajoutés lors de la formulation des complexes (44). De plus, en jouant sur le rapport de charge + (lipides) / - (ADN), on peut influencer sur l'état de compaction du complexe, favorisant ainsi son adsorption sur la membrane cellulaire (rapport en général supérieur à 1)(45, 46).

Le DOTMA (chlorure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium) est le premier lipide cationique qui a été développé pour faire du transfert de gène (publication de 1987). Depuis, des centaines de lipides ont été synthétisés avec le souci (i) d'augmenter l'efficacité de transfert de gène, (ii) de diminuer la cytotoxicité, (iii) d'augmenter la stabilité des complexes en milieu biologique et (iv) d'ajouter éventuellement des

éléments de ciblage cellulaire (47). Parmi les lipides les plus fréquemment utilisés figure le DOTAP, illustré ci-dessous. (Figure 12, ci-dessous). Bien que l'efficacité de transfection *in vivo* obtenue par ces vecteurs soit « relativement » faible, ils ont été utilisés dans des essais cliniques pour le traitement de la mucoviscidose et de différents cancers (48).

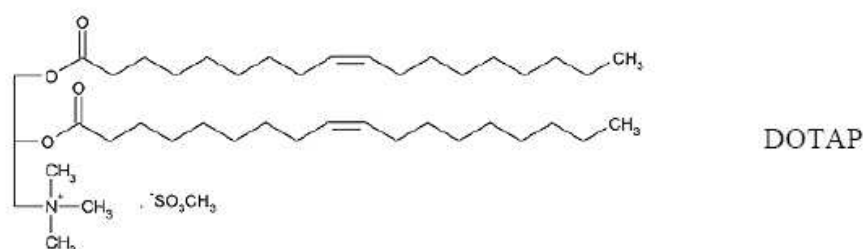


Figure 12 – Représentation d'un lipide cationique : le DOTAP

iii. Polymères

La poly-L-Lysine est le polymère qui a été le plus utilisé au début des années 1990. Ce polymère cationique est capable de compacter efficacement l'ADN. En fonction des ratios utilisés, les polyplexes (nom donné aux complexes formés par l'association ADN/polymère) peuvent présenter un excès de charges positives – ce qui permet une interaction efficace avec les membranes cellulaires (49).

L'inconvénient majeur de la polylysine est que ce polymère ne possède pas les fonctions nécessaires à la sortie des endosomes. C'est pourquoi il faut lui associer un agent endosomolytique de type chloroquine ou peptide fusogène. Depuis, il a été montré que d'autres polymères avaient des propriétés bien supérieures à celles de la polylysine. C'est notamment le cas des polyéthylènimines (PEIs) qui sont très efficaces pour le transfert de gènes *in vitro* de nombreux types cellulaires et *in vivo* par voie systémique (50).

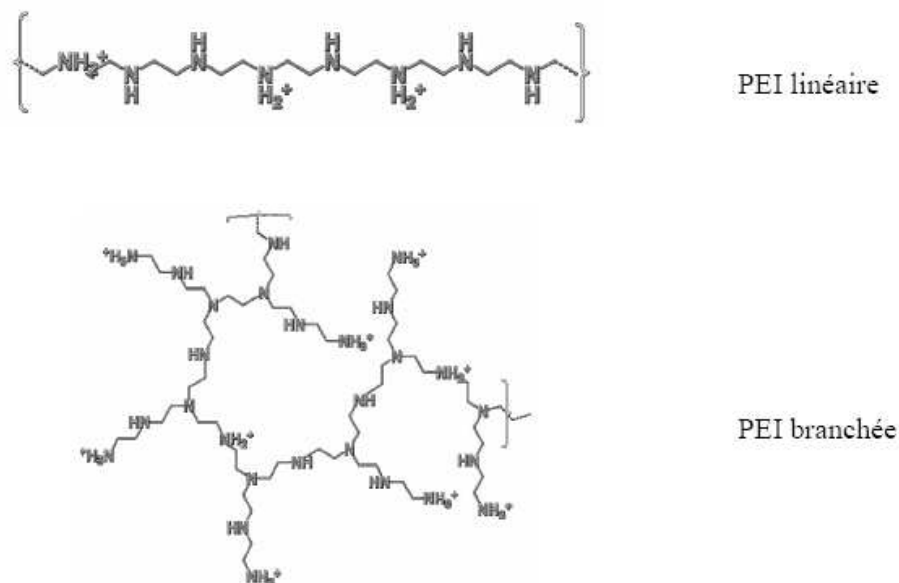


Figure 13 - Formule chimique de la PEI linéaire et branchée

L'efficacité du PEI semble être liée à sa structure chimique (Figure 13, ci-dessus) : riche en groupements amines, il fonctionnerait dans les endosomes comme une éponge à protons ce qui entraînerait, une augmentation de la pression osmotique, favorisant ainsi la rupture de l'endosome et la libération de l'ADN dans le cytosol (51).

A noter que le PEI a été évalué *in vivo* dans différents tissus : administré par voie intra-artérielle dans les reins de rat (52), par injection directe dans le cerveau de souris (50, 53) ou bien par instillation intra-trachéale dans les poumons de lapin.

iv. Peptides

Les vecteurs peptidiques sont parmi les moins explorés, bien qu'ils aient un potentiel élevé. La synthèse peptidique permet en effet d'obtenir des produits bien caractérisés et peut être effectuée à grande échelle. Jusqu'à récemment, les peptides ont été principalement utilisés comme agents auxiliaires pour d'autres systèmes de vectorisation, en particulier des polymères cationiques tels que la polylysine, auxquels ils peuvent apporter une fonction de ciblage cellulaire, une activité de type membranolytique ou encore un signal de localisation nucléaire (54). Une stratégie émergente consiste à développer des peptides multifonctionnels, capables de délivrer sans adjuvant de l'ADN dans des cellules. Ainsi, le groupe d'A. Kichler a montré que le fragment carboxy-terminal de la petite protéine Viral protein

R (Vpr) du VIH-1 possédait une activité de transfection comparable à celle d'agents cationiques lipidiques et polymériques (55).

La même équipe a montré que le peptide cationique LAH4 avait une activité transfectrice considérable. (Figure 14, ci-dessous).

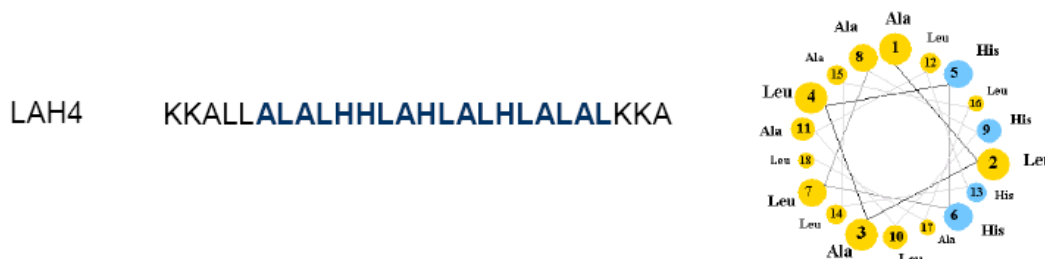


Figure 14 - Séquence et structure α -hélicoidale du peptide LAH4

La représentation d'Edmundson de l'hélice ne tient compte que des résidus 6 à 23 en bleu et gras dans la séquence. L'angle hydrophile formé par les histidines (acides aminés en bleu) est de 100° .

Outre la présence à chaque extrémité de 2 lysines qui apportent les charges positives, ce peptide présente 4 résidus histidine qui peuvent se protoner à pH acide. La petite taille de ces peptides permet leur accessibilité à la synthèse et a contribué à l'obtention de nombreuses informations sur la relation structure/activité de ces peptides (56).

v. Mode d'action des vecteurs cationiques

Le mode d'entrée des complexes ADN/composés cationiques dans la cellule a été bien étudié même s'il reste encore des inconnus. Le mécanisme d'entrée majeure se fait par endocytose (57-59). La fusion directe, en particulier de lipoplexes, avec la membrane plasmique des cellules a été proposée par différents auteurs mais n'a jamais été démontrée (47).

L'entrée des complexes transfectants cationiques peut être décomposée schématiquement en plusieurs étapes (Figure 15, ci-dessous) :

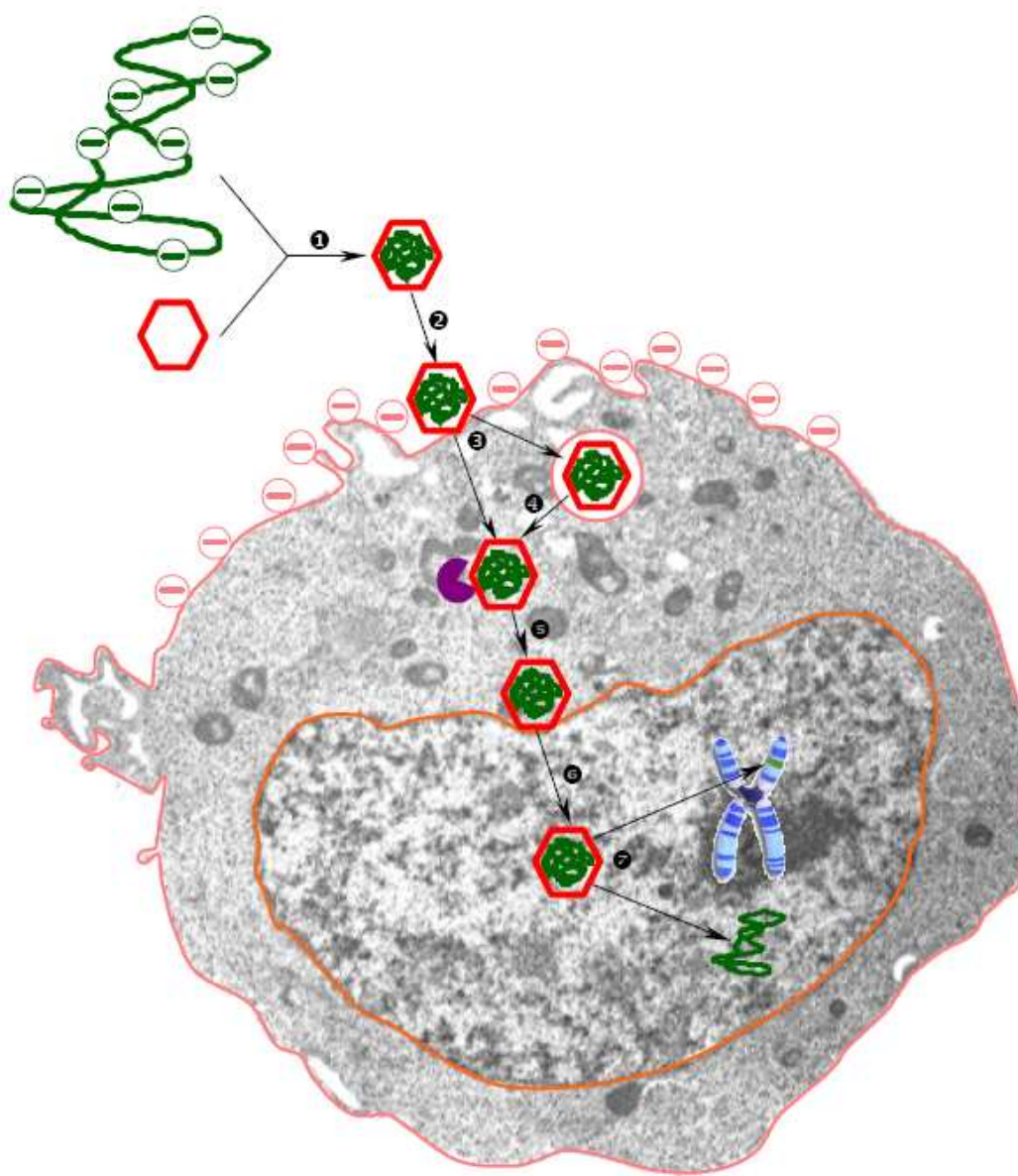


Figure 15 - Les étapes clés de la transfection par des vecteurs cationiques

adsorption sur la membrane cellulaire : l'étape d'adsorption des complexes présentant un excès de charges positives sur la membrane des cellules met en jeu des interactions non spécifiques de type électrostatique. A noter que ces dernières peuvent être remplacées par des interactions plus spécifiques en greffant sur les vecteurs des ligands reconnus par des récepteurs membranaires.

internalisation du complexe et formation de l'endosome : la principale voie d'internalisation est l'endocytose clathrine dépendante (60) mais la phagocytose (61) ou encore d'autres voies (via les caveolae) peuvent aussi intervenir. En fait, des

études récentes montrent qu'il n'y a pas une seule voie d'entrée mais plusieurs qui s'effectuent en même temps. 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.

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. En effet, ces derniers contiennent des enzymes qui vont pouvoir dégrader l'ADN.

transport cytosolique : une fois relargué dans le cytosol, l'ADN doit encore faire face à 2 problèmes majeurs : 1) résister à la dégradation soit par les nucléases (dont il a été montré qu'il y en avait dans le cytosol) soit par d'autres systèmes de dégradation, et 2) pouvoir atteindre le noyau. Ce dernier point est loin d'être mineur car l'ADN est une macromolécule ayant un poids moléculaire de plusieurs millions.

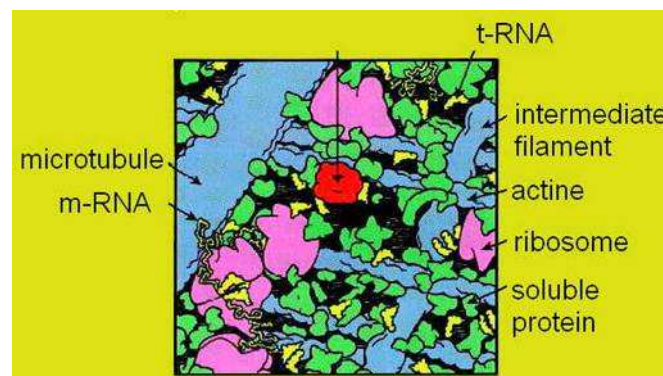


Figure 16 - Vue schématique de l'encombrement du cytosol

Or le cytosol (Figure 16) ne permet pas facilement à de telles molécules de se déplacer (62)

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 (la membrane nucléaire est disloquée) soit à travers le pore nucléaire. Le pore (Figure 17) permet un passage libre de petites molécules et il régule le passage des macromolécules. Le diamètre du pore est d'environ 120 nm (63).

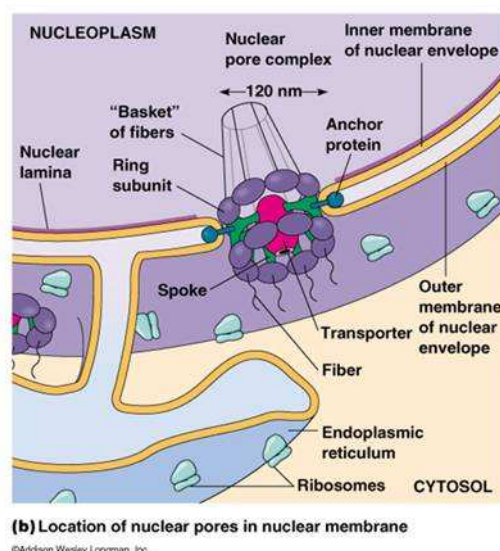


Figure 17 - Schéma du pore nucléaire

L'import nucléaire est certainement l'étape la plus limitante (58). En effet, l'ADN plasmidique lorsqu'il est injecté directement dans le cytosol, ne pénètre dans le noyau qu'avec une faible efficacité lorsque la cellule ne se divise pas (64). Les lipides cationiques n'améliorent pas cette étape d'import nucléaire (65), tandis que certains polymères cationiques semblent avoir un effet positif (66).

transcription : une fois dans le noyau, le plasmide pourra soit resté sous forme épisomale soit s'intégrer dans le génome. Ce dernier événement reste rare comme en atteste le fait qu'après transfection, seule une minorité de cellules exprime stablement le gène. Des études de micro-injection ont cependant montré que la présence de l'agent transfectant dans le noyau pouvait inhiber la transcription (65). Donc la décomplexation de l'ADN afin qu'il puisse y avoir transcription pourrait aussi être une étape limitante.

Transfert de gènes dans le muscle squelettique :

Bien que la synthèse de plusieurs centaines de composés ait permis de développer de bons outils pour la recherche fondamentale, voire même pour certaines applications cliniques (en effet, le PEI par exemple est en essai en clinique pour un traitement de cancers), l'efficacité de transfection de ces vecteurs cationiques *in vivo* dans le muscle est encore trop faible pour des applications à visées thérapeutiques.

Le développement de nouvelles molécules et d'autres techniques de transfection reste donc nécessaire pour atteindre cet objectif.

b. Techniques non virales « efficaces » dans le muscle

i. Techniques physiques

Une autre approche consiste à utiliser des méthodes physiques ou mécaniques pour des applications en transfert de gènes (67).

I1i Microinjection

La microinjection est une technique utilisée pour introduire des molécules étrangères dans des organismes vivants. Quand il s'agit de matériel génétique, l'injection a lieu directement dans le noyau de la cellule. Les microinjections sont réalisées à l'aide d'un appareillage composé d'une aiguille (capillaire de verre ultra fin, de diamètre 0,7 à 1 μm), d'un micro-manipulateur qui assure le déplacement motorisé de l'aiguille, d'un micro-injecteur et enfin d'un microscope. Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1980 (68) sur des cellules en culture. La production d'animaux transgéniques se fait par ce biais (69, 70). Cette technique offre beaucoup d'avantages comme la capacité d'injecter de façon reproductible une quantité définie de solution dans ces cibles. Les applications incluent des expériences de transfection et d'analyse, la transduction de signal, des essais de cytotoxicité, l'étude du développement de territoires embryonnaires mais cette technique ne trouve une application qu'*in vitro*.

I2i Biolistique

Cette technique consiste à bombarder un tissu ou des cellules cibles avec des billes de métal enrobée d'ADN (billes d'or ou de tungstène de 1 μm de diamètre) (71). Ces billes projetées à grande vitesse vont traverser les différentes membranes des cellules cibles. Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1987 pour améliorer le transfert de gène dans les cellules de plantes (72). Puis, cette technique a été étendue aux cellules de mammifères et aux tissus vivants. Aujourd'hui, cette

technique, applicable aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, est principalement utilisée pour l'immunisation génétique dans la peau ainsi que pour transformer des cellules végétales (73).

I3i Ultra-sons (ou sonoporation)

Cette technique consiste à appliquer des ultrasons pour perméabiliser les membranes des cellules et ainsi augmenter la pénétration de molécules. L'ADN plasmidique est en général co-injecté avec des microbulles (1 à 3 μm) constituées de protéines, lipides ou polymères et remplies d'air ou d'un gaz inerte.

Le mécanisme de la sonoporation n'est pas totalement élucidé mais pourrait être expliqué par la cavitation acoustique. La propagation d'ultrasons dans un liquide crée des phases de compression et de dépression, qui sont à l'origine de bulles qui vont se percer et ainsi libérer de l'énergie. Cette libération d'énergie pourrait perméabiliser les membranes cellulaires alentours (74). Le premier résultat de transfert de gène par sonoporation a été décrit au milieu des années 1990. Cette méthode, non invasive, permet d'envisager une utilisation dans de nombreux tissus, y compris le muscle ou le cœur (75, 76).

I4i Injection sous pression

Cette technique consiste à injecter très rapidement en injection systémique (voie intraveineuse ou intra-artérielle) un grand volume de liquide contenant l'ADN d'intérêt. La pression qui en résulte permet la pénétration de l'ADN dans les tissus cibles. Une injection par voie intraveineuse dans la veine de la queue chez la souris permet un ciblage du foie, tandis qu'une injection intra artérielle (avec garrot) permet de cibler les muscles.



Figure 18 - Technique de l'injection intra-artérielle sous pression

Cette technique initialement développée chez les petits animaux (rat et souris, (77)) a été étendue aux gros animaux (singe et chien, (67)). Actuellement, elle est utilisée pour le transfert du gène de la dystrophine chez le chien GRMD, modèle canin de la dystrophie musculaire de Duchenne (78).

I5i Electrotransfert

I15 Principe

Cette technique consiste à appliquer un courant électrique sur les cellules ou le tissu cibles après administration de l'ADN. Il en résulte 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. La migration de l'ADN est renforcée par les propriétés électrophorétiques de cette technique.

I25 Brefs rappels historiques

Historiquement, cette technique a vu le jour en 1982 grâce à l'équipe de Neumann qui a démontré la possibilité de transfecter des cellules *in vitro* à l'aide d'impulsions électriques (79). Depuis, cette technique d'électroporation (ou électrotransfert) est utilisée afin de transférer des acides nucléiques *in vitro*, dans des cellules bactériennes, des levures, des cellules végétales et animales.

Au début des années 1990, l'électroporation a été étendue au transfert de molécules chimiques *in vivo*. En effet, l'équipe de Luis Mir (80, 81) à l'Institut Gustave-Roussy a lancé le 1^{er} essai clinique utilisant l'électrochimiothérapie sur une cohorte de 8 patients. Quelques minutes après l'injection de bléomycine en intraveineuse dans les tumeurs, des impulsions électriques sont appliquées. Il en résulte une meilleure pénétration de la bléomycine, agent anticancéreux très toxique pour les tumeurs. Devant l'absence de toxicité, la bonne tolérance par les patients et les effets antitumoraux observés, l'électrochimiothérapie a été adoptée parmi les traitements anti-tumoraux.

Les premiers travaux d'électrotransfert d'ADN *in vivo* ont été réalisés en 1991 sur les cellules de la peau de souriceaux nouveau-nés suite à l'application d'impulsions électriques exponentielles (82). Ensuite, différentes conditions d'application des pulses électriques ont été testées, notamment des trains d'impulsions de courtes durées (100 μ s) dans le foie en 1996 (83) ainsi que des impulsions de longue durée (5-50 ms) dans le muscle squelettique (84, 85), dans les tumeurs (86) et dans le foie (87).

I35 L'électrotransfert et le muscle

Parmi les tissus cibles, le muscle squelettique s'est rapidement révélé être un tissu de choix. En effet, le muscle est un territoire facilement accessible qui se transfecte bien (cellule multi-nucléée) (36). 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 (88). De plus, de part la propriété de ses fibres musculaires (cellules post-mitotiques), son électroporation permet une expression du transgène à long terme (89-91).

L'efficacité de 10 à 1 000 fois supérieure par rapport à l'injection d'ADN nu permet d'envisager des applications cliniques, surtout dans le domaine de la vaccination génétique et pour la production locale de facteurs sécrétés (utilisation du muscle comme bioréacteur). Par contre, de véritables preuves de principe pour une application dans le domaine des maladies neuromusculaires manquent encore.

I45 Mode d'action et réalisation pratique

Deux phénomènes fondamentaux semblent intervenir lors de l'électrotransfert :

- la perméabilisation de la cellule permettant l'entrée de molécules
- le transport de l'ADN par électrophorèse

L'exposition des cellules à des impulsions électriques courtes et intenses provoque des changements de la différence de potentiel transmembranaire. C'est pourquoi, les conditions électriques doivent être adaptées aux cellules ciblées.

Une fois les paramètres établis *in vitro* sur la cellule, des équipes ont expérimenté de nouveaux paramètres afin de travailler *in vivo* sur des fibres musculaires (Figure 19). Ainsi, il a été constaté que des impulsions répétées (8 à 10) à la fréquence de 1 ou 2 Hz, de longue durée (4-50 ms/impulsion) et peu intenses (100-500 V/cm) permettent d'atteindre de bons niveaux d'expression *in vivo* (86, 89, 92).

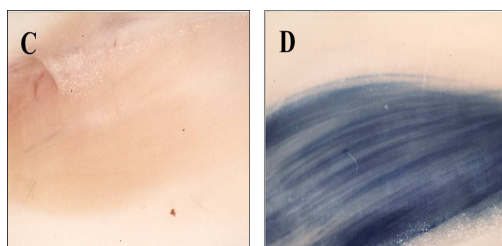


Figure 19 - Expression de la β -Galactosidase dans le muscle après injection d'ADN couplé à l'électrotransfert.

Expression de la β -Galactosidase (C) sans ET et (D) avec ET sur muscle de souris

(D'après Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D., High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Apr 13;96(8):4262-7.(89)

De plus, l'orientation du champ électrique par rapport à la cellule joue aussi un rôle primordial (93). En effet, en fonction des différentes orientations du champ, la perméabilisation et par conséquent la transfection ont pu être optimisées chez la souris dans le muscle *tibialis* antérieur (94-96) et au niveau du genou chez le rat (97). (Figure 20, ci-dessous)

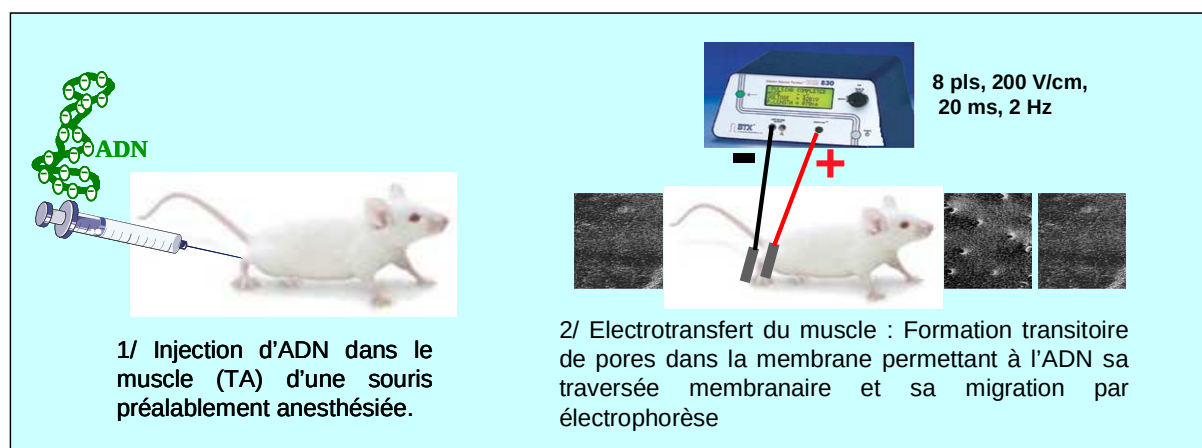


Figure 20 - Illustration de l'électrotransfert d'une patte de souris (TA) suite à l'injection d'ADN

Les paramètres retenus dans toutes nos expériences d'électrotransfert chez la souris au niveau des tibialis antérieurs droit et gauche (TAD et TAG) sont les suivants :

- Nombre d'impulsions : 8
- Période : T=20ms
- Intensité du champ électrique : E=200 V/cm
- Fréquence : 2 Hz
- Orientation des électrodes : Cathode (pôle -) au point d'injection

Ces conditions optimales permettent d'après la littérature d'obtenir une bonne expression du transgène, à long terme tout en minimisant les dommages tissulaires. Toutefois, l'application des impulsions électriques entraîne une inflammation dans le muscle (**Figure 21**) qui disparaît au bout de deux semaines (98, 99).

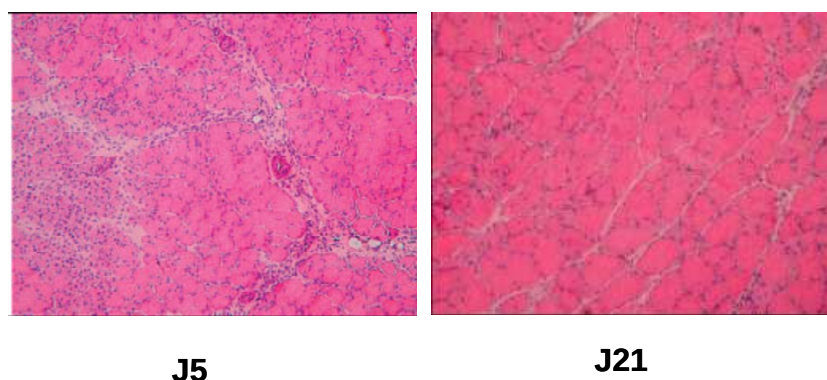


Figure 21 - Etat du muscle à J5 et J21 après ET chez le rat

Injection dans le TA d'un rat de 100 µg ADN suivi d'un électrotransfert de 8 pulses de 20 ms. D'après Durieux et al. JGM 2004, (99)

On peut donc conclure en disant que l'électrotransfert présente un certain nombre d'atouts : c'est une méthode techniquement réalisable sur différents tissus et elle semble assez reproductible, au moins sur des muscles murins. Cette méthode permet de s'affranchir de vecteurs biologiques comme les virus et ne fait appel qu'à de l'ADN plasmidique qu'on sait produire aujourd'hui à large échelle en qualité GMP.

ii. Vecteurs chimiques : les polymères amphiphiles

I1ii Carte d'identité des Poloxamères

Les poloxamères sont des molécules amphiphiles formées de l'assemblage de motifs d'oxyde de polyéthylène (POE) et d'oxyde de polypropylène (PPO). Une des structures possible de ces composées est représentée dans la figure ci-dessous (Figure 22, ci-dessous).

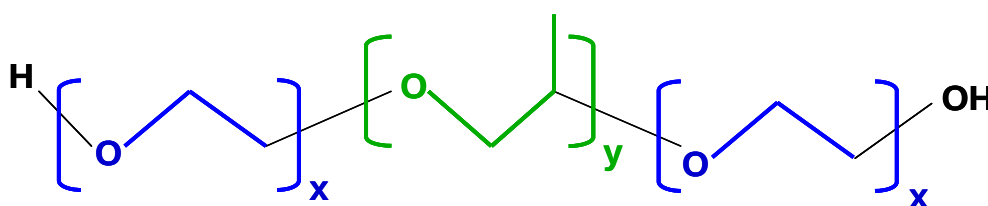


Figure 22 - Représentation schématique des poloxamères

Il existe une large variété de copolymères tri-blocs POE-PPO-POE (encore appelés Poloxamères, Pluronic ou Synperonic) qui sont commercialement disponibles et qui varient entre eux par leur poids moléculaire et/ou par la taille des blocs POE ou PPO.

I2ii Brefs rappels historiques

Le premier polymère augmentant le transfert de gène dans le muscle, le pyrrolidone de polyvinyle (PVP), a été décrit en 1996 par Rolland et al. (100). Ensuite, d'autres polymères ont été évalués, et notamment les copolymères amphiphiles tri-blocs déposés sous la marque Pluronic (par la société BASF) et connus sous le nom générique poloxamères. L'association des blocs sous la forme PEO-PPO-PEO a montré des efficacités de transfection supérieures au PVP (101, 102). Il est aussi important de noter que certains poloxamères sont inscrits sur la liste des excipients

autorisés aux Etats Unis et qu'ils sont largement utilisés par l'industrie comme détergents, et agents émulsionnants.

I3ii Mode d'action et propriétés chimiques

Nous ne parlerons ici que des polymères neutres tri-blocs POE-PPO-PEO. Ces copolymères ont un caractère amphipathique puisqu'ils présentent 2 segments hydrophiles (POE) et un segment hydrophobe (PPO). A faible concentration, les poloxamères existent sous forme de monomères. Ils se lient à la membrane en s'incorporant à la bicouche lipidique. Quand la concentration en poloxamères augmente jusqu'à atteindre la Concentration Micellaire Critique (CMC), les polymères s'assemblent en micelles, qui peuvent désagréger une membrane (Figure 23, ci-dessous).

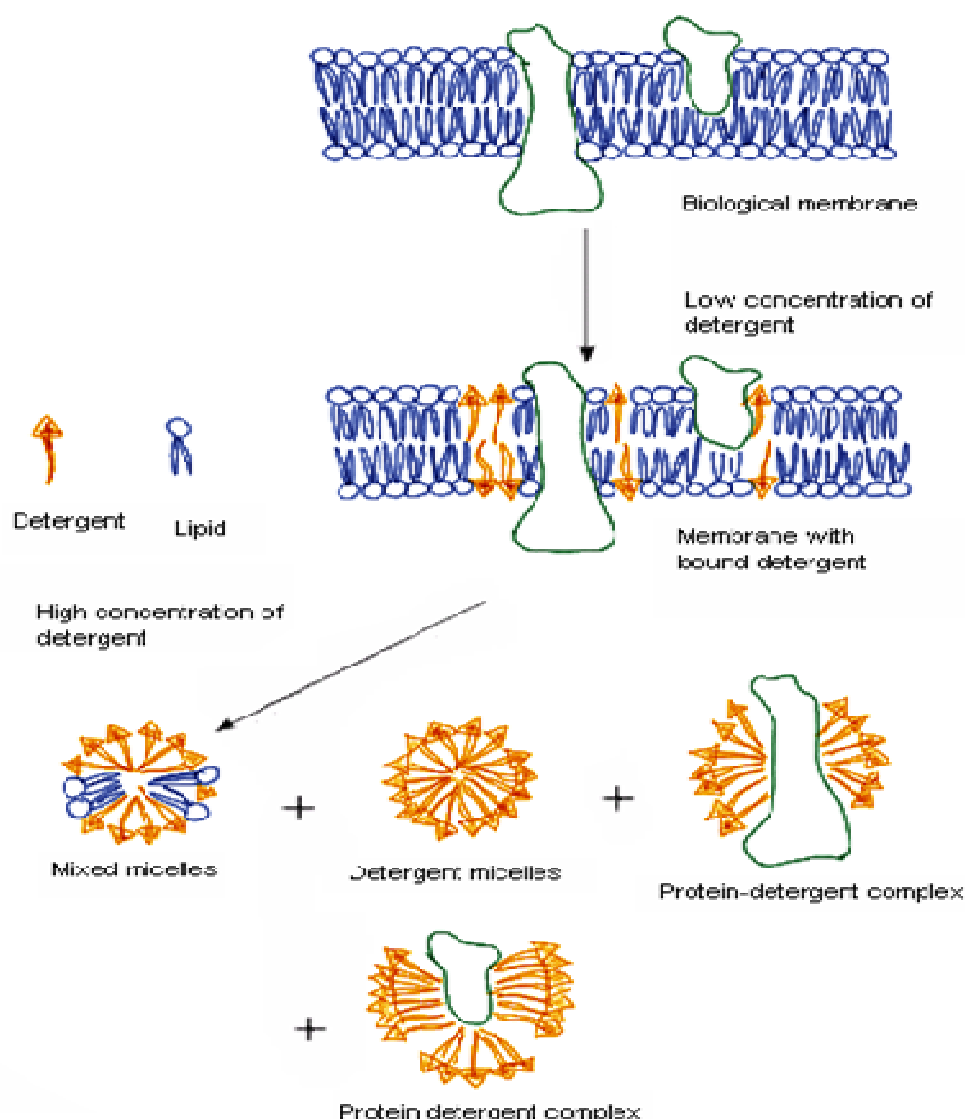


Figure 23 - Solubilisation des membranes cellulaires par des détergents de type poloxamères
(d'après Calbiochem Novabiochem Corporation)

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à plusieurs poloxamères qui diffèrent par leur poids moléculaire et par leur balance hydrophile/hydrophobe. Nous avons regroupé ces informations dans un tableau que nous commenterons plus tard dans notre argumentation (voir résultats).

I4ii Les poloxamères et le transfert de gène dans le muscle

Il a été montré récemment que l'addition de poloxamères (**Figure 24**) à de l'ADN permettait d'améliorer de manière significative - au moins d'un facteur 10 - l'efficacité du transfert de gènes dans le muscle squelettique de souris (101, 102).

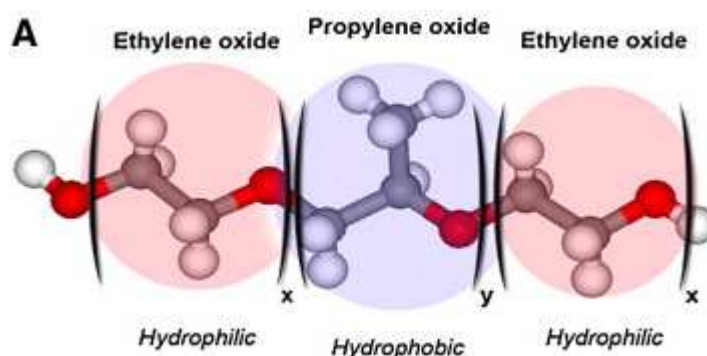


Figure 24 - Représentation d'un poloxamère de type PEO-PPO-PEO

On ne connaît toujours pas exactement le mode d'action des poloxamères. L'équipe de A. Kabanov a proposé – et dans une certaine mesure démontré - une hypothèse qui pourrait expliquer l'augmentation de l'efficacité de transfection suite à l'injection par voie intramusculaire d'ADN complexé à des poloxamères. Selon ces auteurs, les copolymères tri-blocs seraient capables d'augmenter la transcription des gènes transfectés en activant la voie de signalisation NF- κ B (**Figure 25**) (103, 104).

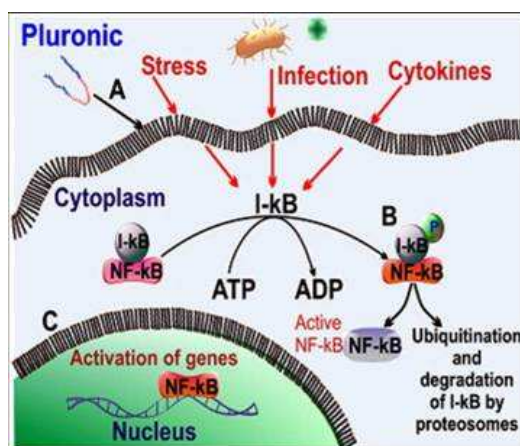


Figure 25 - Poloxamères et activation de la voie de signalisation *NF-κB*

A) Les Pluronic affecteraient la voie de signalisation *NF-κB* en interagissant avec la membrane plasmique de la cellule; B) Cela conduirait à la phosphorylation d'I-κB qui libérerait alors *NF-κB*; C) *NF-κB* devenu actif, serait transloqué jusqu'au noyau et pourrait alors activer la transcription des gènes correspondants D'après Batrakova EV, Kabanov AV, J Control Release. 2008. (105)

Ceci évidemment n'est possible que si le plasmide présente un promoteur contenant des sites de liaison de *NF-κB*. Et, effectivement, en utilisant un promoteur ne contenant aucun site de liaison, cette équipe n'a pas pu mettre en évidence d'augmentation de transfection *in vivo* (106). De plus, il a été démontré par plusieurs équipes que des plasmides contenant des sites de liaison de *NF-κB* étaient importés plus efficacement dans le noyau – sans doute du fait de l'utilisation du plasmide du système de transport nucléaire de *NF-κB* (107-109). De plus, *NF-κB* activé permettrait une meilleure translocation vers le noyau étant donné que celui-ci est connu pour activer l'import nucléaire. En tant que molécules synthétiques, les copolymères tri-blocs (commercialisés chez BASF Corporation) sont peu immunogènes. Ainsi, pour toutes ces raisons, les poloxamères sont un outil de choix dans le transfert de gène intramusculaire. Notons aussi, que certains de ces composés ont déjà reçu l'approbation de la FDA (de part leur faible toxicité) et sont utilisés comme excipients dans l'industrie pharmaceutique. Ils sont très utilisés en clinique pour le nettoyage de la peau et des muqueuses.

1.2. Applications à la Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

1.2.1. La maladie

Décrite en 1860 par le docteur Duchenne de Boulogne, la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est la plus répandue des myopathies de l'enfant : elle concerne 1 garçon sur 3500 à la naissance, ce qui représente une centaine de nouveaux cas par an en France (Figure 26, ci-dessous).

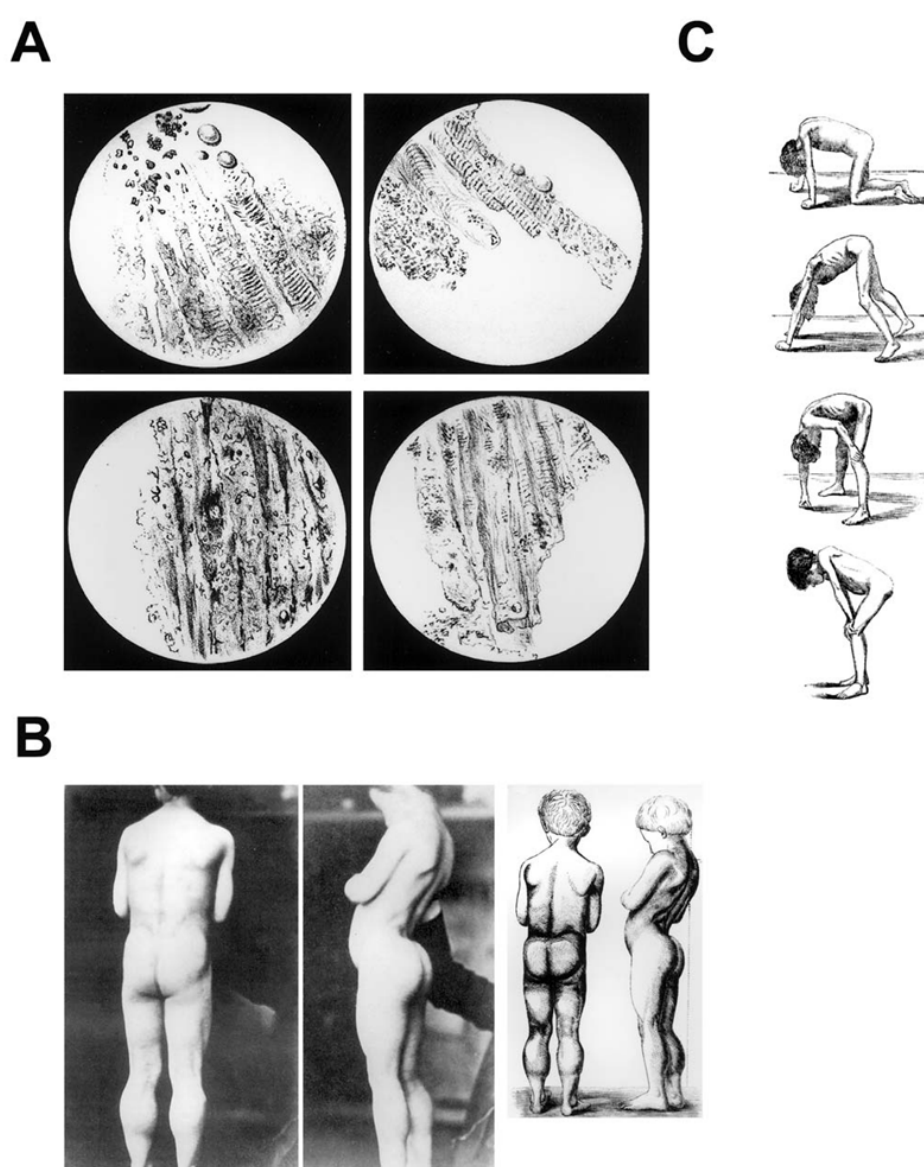


Figure 26 - Éléments historiques de la description de la dystrophie musculaire de Duchenne

Gravures publiées par Edward Meyron pour exposer la structure du tissu musculaire de patients **(A)**. Photos et représentations que Duchenne de Boulogne fit de patients dystrophiques **(B)**. Représentation de la manœuvre de Gowers **(C)**. Tiré de Tyler et al (110)
C'est une maladie génétique neuromusculaire à transmission récessive liée au chromosome X : la maladie est transmise par les mères et seuls les garçons sont atteints. Cette myopathie est due à des mutations dans le gène de la dystrophine (X p21.2). Ce gène code pour la dystrophine, protéine qui joue un rôle majeur dans la fonction et l'intégrité de la fibre musculaire et qui est absente chez les patients DMD.

I.2.2. Aspects cliniques

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie dégénérative évolutive qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme (muscles squelettiques, muscle cardiaque et muscles lisses)(111). Le territoire musculaire disparaît progressivement au profit de cellules adipeuses (graisse) (Figure 27, ci-dessous)

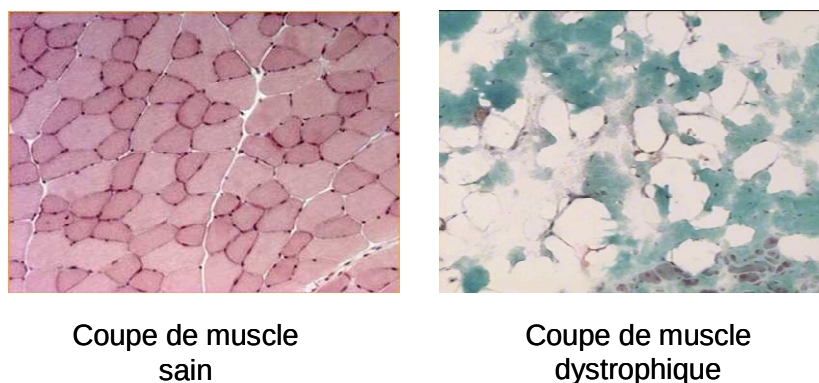


Figure 27 - coupes de muscles sain et dystrophique

Les premiers signes cliniques apparaissent en général vers l'âge de 2-3 ans. L'enfant atteint marche tard, tombe souvent et se relève difficilement. Au fil des années, apparaît une faiblesse musculaire progressive des membres et du tronc. Vers l'âge de 10-12 ans, l'enfant perd l'usage de la marche et développe une scoliose. L'atteinte des muscles respiratoires rend l'enfant particulièrement sensible aux infections broncho-pulmonaires et vers l'adolescence, l'assistance respiratoire devient nécessaire. Même si l'atteinte du muscle cardiaque ne se manifeste que tardivement, elle doit être recherchée précocement dès l'âge de 6-7 ans. Le recours

au fauteuil roulant permet à l'enfant atteint de conserver une autonomie de déplacement. Un tiers des patients environ présente un retard mental, objectivé par un quotient intellectuel parfois inférieur à 70 (112, 113) mais contrairement à l'atteinte musculaire, ce défaut n'est pas progressif.

Le diagnostic clinique est confirmé par plusieurs méthodes. Le taux de créatine-phosphokinase (CPK) est 50 à 200 fois supérieur à la normale (DMD). La biopsie musculaire montre un aspect de dystrophie (fibres nécrotiques, régénératives). L'étude immunohistochimique révèle une absence totale de dystrophine dans la DMD, et une quantité et/ ou qualité anormale dans la DMB (dystrophie musculaire de Becker). L'analyse moléculaire montre le plus fréquemment des délétions du gène de la dystrophine.

Depuis les progrès réalisés dans la prise en charge, l'espérance de vie des patients s'est légèrement allongée, et l'âge du décès varie entre 10 et 29 ans en moyenne.

I.2.3. Gène et protéine dystrophine

I.3.2.1 Gène de la dystrophine

Le gène de la dystrophine a été identifié en 1986 par Monaco et al. (114) et le séquençage complet du gène a été effectué en 1987 par Koenig et al. (115). Le gène de la dystrophine est le plus grand des gènes connus chez l'homme, avec 2,6 millions de paires de base (ADNc de 14 kb). Il est localisé sur le bras court du chromosome X (Xp21) et contient 79 exons au total (116, 117).

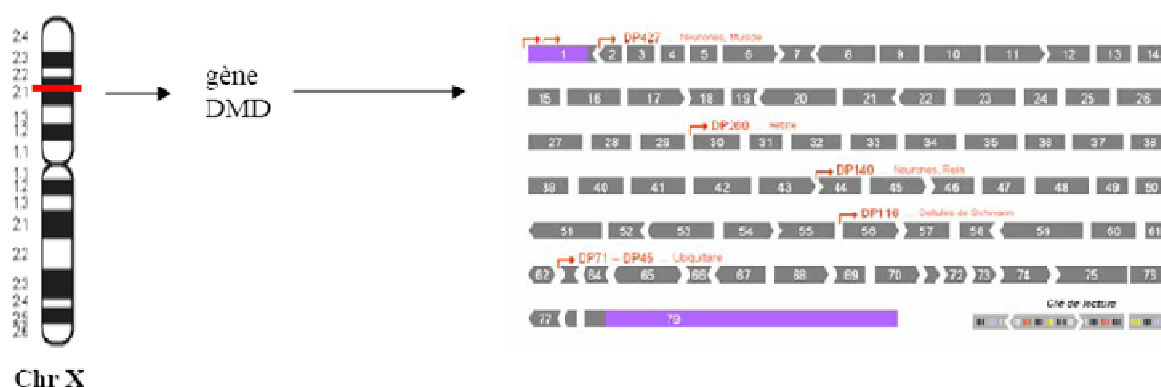


Figure 28 - le gène de la dystrophine

Le schéma à gauche représente la position du gène DMD sur le bras court du chromosome X. Le schéma à droite représente l'ADNc du gène DMD. Les rectangles gris représentent les

exons du gène. Les flèches rouges représentent les cadres de lecture codant pour les différentes isoformes de la dystrophine

Le gène de la dystrophine est sous le contrôle de cinq promoteurs connus (Figure 28, ci-dessus), ce qui le conduit à la production de plusieurs isoformes de la protéine. Le gène code pour 3 isoformes longues : DP427 (M pour musculaire), (B pour cerveau), (P pour les cellules de Purkinje) et 5 isoformes courtes actuellement connues: DP260 (R pour rétine), DP140 (B3 pour cerveau), DP 116 (S pour cellules de Schwann) et DP 71 et DP 45 qui sont exprimées de façon ubiquitaire dans de nombreux tissus non musculaires et suggèrent un rôle basique dans l'intégrité structurale ou la fonction normale des tissus.

Chez les patients DMD, le gène de la dystrophine est muté, ce qui conduit à la transcription puis éventuellement à la traduction d'une protéine non fonctionnelle.

I.3.2.2 La protéine dystrophine

a. Structure de la protéine

La protéine dystrophine est composée de 3685 acides aminés et présente une masse moléculaire de 427 kDa (118, 119). C'est une protéine hydrophile qui ne présente pas d'enchaînement d'acides aminés hydrophobes, suggérant qu'il ne s'agit pas d'une protéine transmembranaire.

Elle est composée de quatre domaines distincts et de 4 régions charnières riches en proline qui la rendent flexible (Figure 29, ci-dessous):



Figure 29 - structure de la protéine dystrophine avec ces différents domaines

✓ le domaine N-terminal est composé d'environ 240 acides aminés. Il contient deux sites de fixation à l'actine.

✓ le domaine central (ou « rod domain ») est composé de 2840 acides aminés répartis en 24 unités répétées chacune longue de 88 à 126 acides aminés. Ce domaine contient également les quatre zones charnières qui sont des séquences non répétées, riches en résidus proline, conférant à la dystrophine sa flexibilité.

✓ le domaine riche en cystéine s'étend des acides aminés 3361 à 3685. Il possède deux sites potentiels de fixation au calcium et un site de fixation au zinc. Ce domaine est capable de se lier au β -dystroglycane du sarcolemme.

✓ Le domaine C-terminal se compose des 325 derniers acides aminés et contient le site de liaison à la dystrobrevine et aux syntrophines (voir Figure 31, ci-dessous)

b. Le complexe des protéines associées à la dystrophine (DAPC)

La protéine dystrophine est localisée sous la membrane cellulaire de la fibre musculaire (Figure 30).

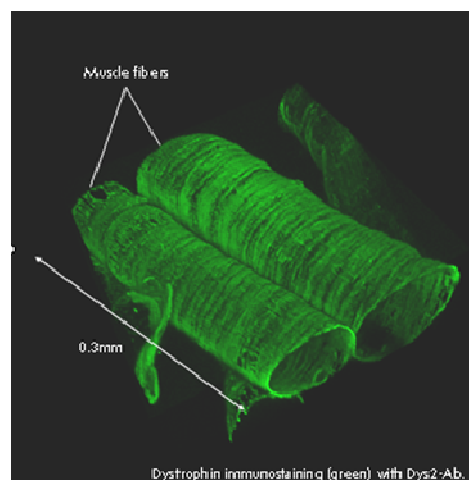


Figure 30 - Reconstruction 3D de la localisation de la dystrophine à partir de microscopie confocale de fibres musculaires isolées

Elle est associée à des protéines qui forment un complexe à travers la membrane cellulaire permettant de relier l'extérieur (matrice extracellulaire) et l'intérieur (cytosquelette) de la fibre musculaire.

Ce complexe protéique (=DAPC pour Dystrophin Associated Protein Complex) est composé d'au moins 10 protéines différentes (Figure 31, ci-dessous). La dystrophine interagit via son domaine riche en cystéines et sa partie C-terminale avec ce complexe DAPC, pouvant être divisé en trois sous-groupes de protéines :

- ✓ le complexe des dystroglycanes : il permet de faire le lien entre la laminine 2 et la dystrophine.
- ✓ le complexe des sarcoglycanes : il interagit avec la dystrophine mais aussi avec les dystroglycanes.
- ✓ le complexe cytoplasmique comprenant la dystrophine, les syntrophines, l' α -dystrobrevine et la monoxyde d'azote synthétase neuronale (nNOS) qui assure la liaison du complexe avec le cytosquelette (120, 121).

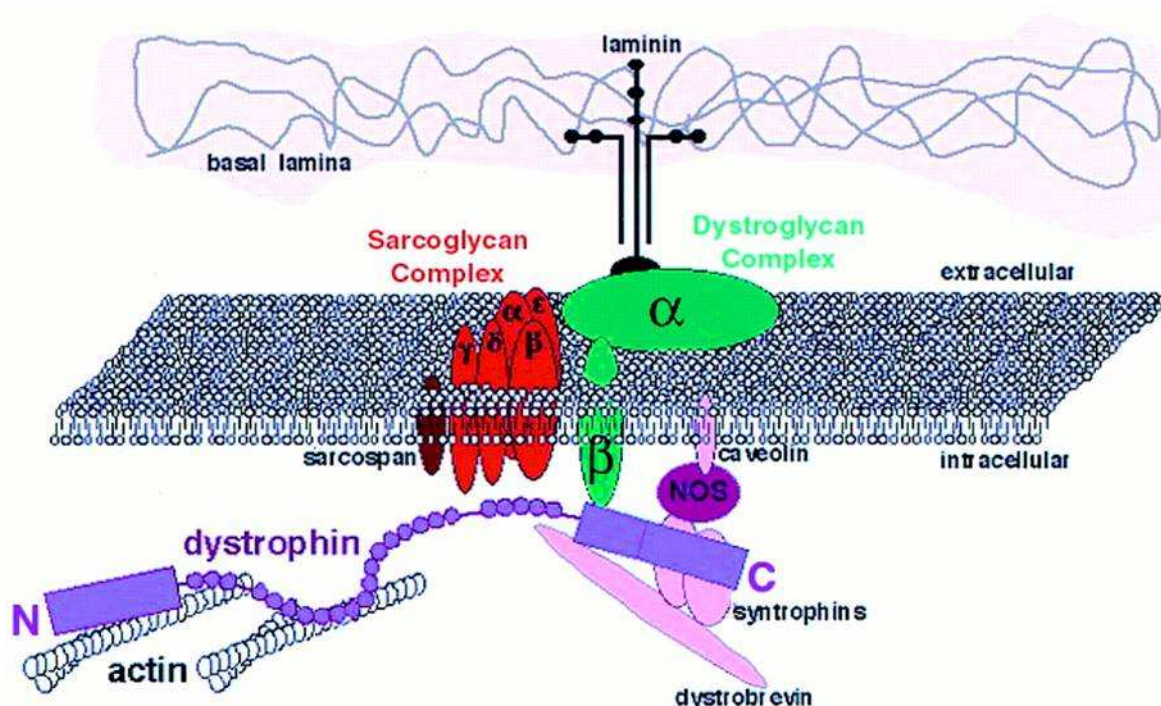


Figure 31 - Schéma représentant le complexe des protéines associées à la dystrophine (DAPC)

L'absence de dystrophine chez les patients DMD provoque une perte du complexe et une fragilisation de la membrane de la cellule musculaire. La membrane musculaire, fragilisée, ne résiste plus aux contraintes imposées lors de la contraction (121), et la fibre musculaire est détruite, en libérant les enzymes musculaires (CPK) dans le sang (122). L'ensemble de ces phénomènes induit donc une nécrose des fibres musculaires et attire alors les cellules inflammatoires telles que les cellules dendritiques, les cellules T et les monocytes/macrophages (123).

Dans environ 65% des cas de DMD, la mutation induit un décalage du cadre de lecture, entraînant la formation d'une dystrophine non fonctionnelle.

I.3.2.3 Modèles animaux

La souris *mdx* est le principal modèle utilisé pour l'étude de la maladie de Duchenne. Elle est dérivée d'une colonie de la lignée murine C57Bl/10 dans laquelle est apparue une mutation et qui présentait un taux élevé de créatine kinase (124). Tout comme chez l'humain, le mode de transmission est récessif lié au chromosome X. Cette souris possède une mutation dans l'exon 23 du gène de la dystrophine (125, 126) qui cause l'apparition d'un codon stop prématuré qui provoque l'arrêt de la traduction. Il s'ensuit alors la production d'une protéine tronquée qui représente 27% de la protéine normale. La protéine n'est pas fonctionnelle.

La *mdx* reproduit en partie des symptômes observés chez l'humain. Par exemple, l'absence de dystrophine dans le cerveau des souris semble causer des déficits cognitifs (127), tout comme chez les humains. Cependant, malgré un génotype très proche de celui de l'homme, il faut quand même souligner que le phénotype est beaucoup moins sévère chez la souris.

Les fibres musculaires subissent des nécroses, notamment pendant les 3-4 semaines post-natales, qui entraînent une forte réponse régénératrice. Les macrophages envahissent les zones nécrotiques et une inflammation se développe. Il y a alors régénération des fibres musculaires, phénomène observable par l'apparition de fibres avec de nombreux noyaux centraux.

Un autre modèle est le modèle du chien dystrophique (128). Parmi différentes races de chiens dystrophiques identifiées, le Golden Retriever est le mieux caractérisé et

présente un phénotype très proche de l'enfant DMD (129, 130). La dystrophie est héréditaire, transmise sur un mode récessif lié au chromosome X. L'absence de dystrophine est liée à la présence d'une mutation ponctuelle au niveau de l'exon 7, entraînant un décalage du cadre de lecture et l'arrêt de la traduction. Ces diverses souches possèdent une histologie semblable au patient DMD avec infiltrations de gras et de tissu conjonctif. La sévérité de la pathologie est très variable d'un chien à l'autre. L'expérimentation sur ces animaux est de plus en plus répandue, à cause de la forte ressemblance avec la pathologie humaine mais leur utilisation demeure limitée de part l'infrastructure nécessaire pour maintenir de tels animaux.

I.2.4. Les traitements

I.4.2.1 Les traitements palliatifs

Faute d'un traitement curatif, la prise en charge est avant tout palliative. Elle consiste à ralentir la progression de la maladie et repose sur une approche pluridisciplinaire : orthopédie, kinésithérapie, prévention cardiovasculaire, nutritionnelle...

La rééducation repose sur la kinésithérapie, les massages ou la kinébalnéothérapie... La chirurgie peut également venir en complément pour corriger certaines déformations (notamment du rachis).

La ventilation permet d'entretenir une certaine souplesse de la cage thoracique et ventiler correctement l'organisme. Elle est complétée par une kinésithérapie respiratoire pour désencombrer les bronches en cas de surinfection pulmonaire.

D'un point de vue nutritionnel, la prise en charge vise à faciliter la déglutition rendue difficile par la maladie.

Peu de médicaments sont efficaces pour cette maladie. Les glucocorticoïdes sont toutefois utilisés avec des résultats « encourageants ». En effet, la prednisone, un anti-inflammatoire stéroïdien, semble permettre de significativement prolonger la durée de marche des patients (131, 132). Dernièrement, le Deflazacort a aussi été utilisé dans le même but que la prednisone, et il aurait moins d'effets adverses (133). On ne sait pas exactement quel est le mode d'action des glucocorticoïdes. Pendant longtemps, on a considéré qu'en ralentissant le processus inflammatoire, les anti-

inflammatoires préviennent partiellement l'infiltration du tissu cicatriciel. Mais des développements récents indiquent qu'ils influeraient - aussi - sur l'expression et l'activation de certains autres gènes (134, 135). Ces traitements ont démontré une certaine capacité à améliorer la qualité de vie des patients, mais leur action est très limitée. Enfin, d'autres médicaments peuvent freiner les anomalies cardiaques. Une étude française conduite par le Pr. Duboc de l'hôpital Cochin (136) a ainsi démontré l'effet préventif du périndopril sur l'insuffisance cardiaque chez des enfants atteints de myopathie de Duchenne.

I.4.2.2 Demain, un traitement curatif ?

Dans le cas de DMD, différentes approches curatives sont envisagées parmi lesquelles la thérapie génique et la thérapie cellulaire.

a. La thérapie génique

L'approche la plus « évidente » consiste à délivrer une copie fonctionnelle du gène de la dystrophine. Cependant, la taille de l'ADNc, qui est supérieure à 10 kb, empêche l'utilisation du système le plus efficace dans le muscle, à savoir les vecteurs AAVs. Une des voies pour contourner ce problème consiste à générer des versions plus courtes qui conservent plus ou moins les propriétés de la dystrophine sauvage. Et, de fait, différentes mini et micro-dystrophines ont été créées et celles-ci semblent avoir des propriétés suffisantes pour avoir un effet thérapeutique chez la souris mdx (137-139).

Une autre piste qui semble très prometteuse consiste à faire du saut d'exon. Comme mentionné précédemment, cette approche agit, via de petits ARN antisens, sur le messenger du gène DMD. Chez la souris mdx par exemple, le saut d'exon va avoir pour objectif de « sauter » l'exon 23 (qui est l'exon porteur de la mutation chez les souris mdx) afin de rétablir le cadre de lecture et ainsi permettre à la cellule de fabriquer de la dystrophine tronquée, mais qui reste fonctionnelle. Cette technique, associée à l'utilisation de vecteurs AAVs, a donné d'excellents résultats chez mdx (7).

b. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à délivrer au patient des cellules ayant un potentiel myogénique (cellules issues soit d'un donneur sain soit du patient mais traitées par thérapie génique avant ré-administration). L'objectif étant que les cellules infusées permettent, après fusion, de générer des fibres musculaires exprimant la dystrophine. Des transplantations de myoblastes (ou cellules satellites) ont par exemple été entreprises. Toutefois, les essais cliniques ne donnent pas les résultats espérés (140-142). De fait, un certain nombre de problèmes persistent avec cette approche : i- une faible survie des cellules transplantées, ii- une migration limitée, iii- la nécessité de faire de multiples injections – ne serait-ce que pour traiter un seul muscle, etc...

Mais ce domaine connaît un nouvel essor grâce aux cellules souches. La transplantation d'une population de cellules souches a permis d'induire l'expression de la dystrophine dans un grand nombre de fibres, et ce, dès 10 jours après la greffe. La restauration de dystrophine fut dix fois plus élevée avec ces cellules qu'avec des cellules satellites, indiquant que ces cellules à caractère souche permettent d'améliorer l'efficacité de la régénération musculaire (143). De plus, des travaux récents ont montré que les cellules souches hématopoïétiques pouvaient contribuer à la régénération du muscle squelettique chez la souris *mdx*. Ces cellules seraient capables dans des conditions spécifiques de se différencier en cellules musculaires. En 2005, une équipe de l'Inserm (144) a réussi à obtenir, à partir de tissu adipeux de jeunes donneurs, des cellules souches multipotentes dénommées hMADS («*Human Multipotent Adipose Derived Stem Cell*»).

La cellule souche hMADS est capable de donner naissance *in vitro* à une cellule musculaire, osseuse, adipeuse ou de cartilage, en fonction de son environnement. Transplantées en faible quantité chez la souris *mdx*, ces cellules ont entraîné une expression importante et à long terme de la dystrophine humaine.

c. Quelques autres pistes thérapeutiques

✓ IGF-I

La sur-expression du facteur de croissance IGF-I (*Insulin-like growth factor-1*) dans les muscles de souris *mdx* est capable de réduire la pathologie dystrophique (145). En

effet, l'injection couplée d'AAV-IGF-I et AAV-dystrophine entraîne une augmentation de la force et de la masse musculaires et protège les fibres contre des lésions induites par la contraction musculaire. Cependant, une utilisation chez l'homme d'IGF-I n'est pas évidente en raison d'importants effets secondaires en cas de surexpression.

✓ La Myostatine

La myostatine est un inhibiteur endogène de la croissance musculaire. Et il a été montré qu'une inhibition ou inactivation de la myostatine permet d'augmenter de manière très impressionnante la masse musculaire (146). Un essai clinique avec des patients DMD utilisant des anticorps contre la myostatine (laboratoire pharmaceutique Wyeth, USA) a été réalisé.

✓ L'héréguline

Des publications ont rapporté l'amélioration du phénotype dystrophique des souris *mdx* par l'héréguline, et la restauration de la fonction et de la densité vasculaires chez les souris *mdx* par la gentamycine. Dans une étude publiée en décembre 2005, une équipe franco-américaine a administré, par voie intrapéritonéale, de la L-arginine chez des souris *mdx*. Les capacités régénératrices et les propriétés contractiles des muscles, ainsi que certains paramètres histologiques ont été améliorés.

1.3. Description du projet de thèse

L'état actuel des connaissances sur les vecteurs de thérapie génique permet de dire qu'il y a trois points fondamentaux sur lesquels des progrès doivent encore être faits :

- améliorer les techniques de transfert de gène pour les rendre plus efficaces
- contrôler la durée et le niveau d'expression du gène d'intérêt
- maîtriser l'inflammation et la réponse immune

L'objectif de mon travail de thèse a consisté à évaluer si la vectorologie non virale était une approche possible pour la thérapie génique dans le muscle et pour DMD en particulier.

Pour cela, je me suis penchée plus particulièrement sur l'étude des techniques de vectorisation afin de les optimiser.

Dans un premier temps, j'ai étudié une technique physique de transfert de gène : l'électrotransfert. Ayant rencontré un certain nombre de difficultés (qui seront détaillées par la suite), nous avons décidé qu'au lieu de nous focaliser sur des approches thérapeutiques sur la souris mdx en utilisant l'électrotransfert, nous nous consacrerons à l'étude de nouveaux systèmes de vectorisation sur des muscles sains.

C'est ainsi que dans un deuxième temps, j'ai étudié les copolymères amphiphiles comme vecteurs de transfert de gène. Différentes structures de polymères multi-blocs existant, nous avons testé un échantillon de plusieurs poloxamères (Pluronic) et poloxamines (Tetronic)

Et enfin, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de dérivés d'acides biliaires comme outils de vectorisation. En effet, les dérivés d'acides sont des composés possédant une activité détergente et nous avons donc pensé qu'ils étaient de bons candidats pour améliorer le transfert de gènes dans le muscle.

Matériels

et

Méthodes

II. Matériels et Méthodes

II.1. Matériels

II.1.1. Les tampons

PBS (Phosphate Buffered Saline)	137 Mm NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,4 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,3
Tampon de Lyse	25 mM Tris-Phosphate 8 mM MgCl ₂ 1 mM DTT (Dithiothreitol) 1 mM EDTA 15% Glycérol 1% Triton X-100
Tampon d'Essai	25 mM Tris-Phosphate 8 mM MgCl ₂ 1 mM DTT (Dithiothreitol) 1 mM EDTA 15% Glycérol 2 mM ATP ajouté extemporanément
Tampon de charge	0,25% Xylène cyanol 0,25% Bleu de bromophénol 30% Glycérol
TBE (Tris-borate EDTA)	89 mM Tris 89 mM Acide borique 2 mM EDTA pH 8,3
TAE (Tris-borate EDTA)	40 mM Tris-acétate 1 mM EDTA
Milieu cryoprotecteur	DMEM 1 % PS 20 % SVF 5 % DMSO
Réactif de Bradford	Bleu de Coomassie Acide phosphorique Méthanol
SOC medium (Super Optimal Catabolite, Invitrogen,)	2 % tryptone 0,5 % extraits de levure 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM glucose

Tyrode 2X	280 mM NaCl pH 7,4 12 mM KCl 6 mM CaCl ₂ 4 mM MgCl ₂ 20 mM Hepes 20 mM Glucose
-----------	--

Tableau 1 - Composition des différents solvants utilisés

II.1.2. Les lignées cellulaires

HepG2	Hépatocarcinome humain
C2C12	Myoblaste murin
NIH 3T3	Fibroblaste embryonnaire murin

Tableau 2 - Les différentes lignées cellulaires utilisées

II.1.3. Les plasmides

II.3.1.1 Les plasmides codant la luciférase

a. *pSMD2-lucΔITR*

Le plasmide pSMD2-Luc Δ ITR qui a été généré au Généthon (Figure 32, ci-dessous) est un vecteur d'expression eucaryote de 7644 pb codant pour le gène rapporteur de la *firefly luciférase* sous le contrôle du promoteur-enhancer précoce du cytomegalovirus (CMV). Il possède une origine de réplication bactérienne permettant sa réplication ainsi qu'un gène de résistance à l'*ampicilline* (β -lactamase) permettant la sélection de bactéries transformées. Un signal de polyadenylation (β -globine humaine) suit le gène rapporteur pour permettre une meilleure expression dans les cellules eucaryotes.

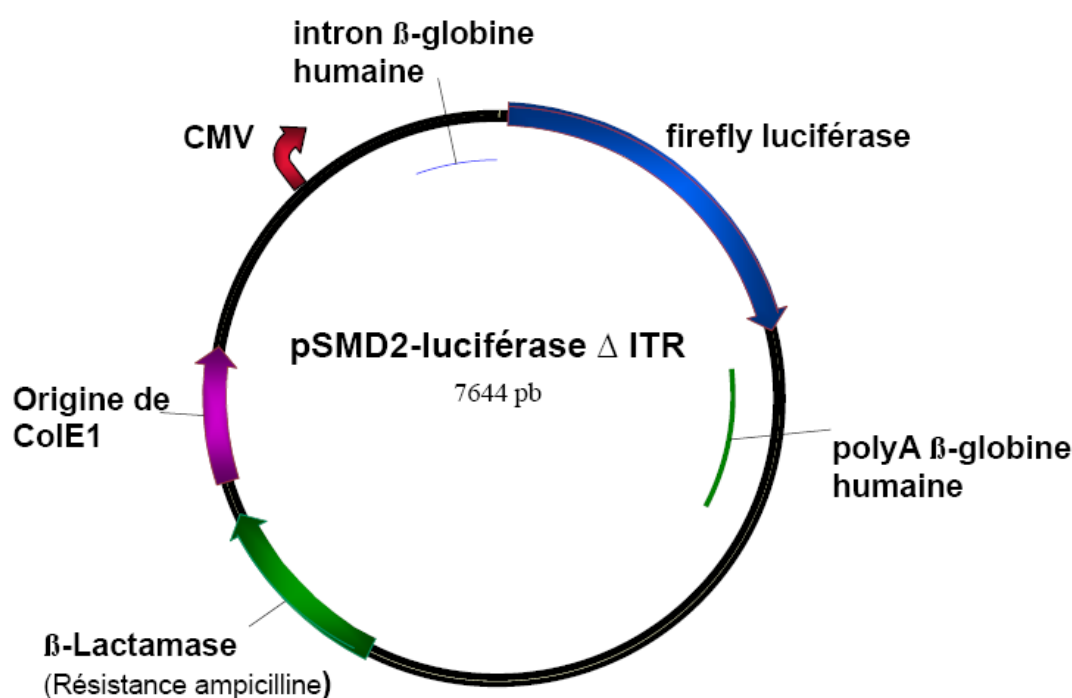


Figure 32 - carte du plasmide pSMD2-Luc-delITR

b. *pEF1_luc*, *pC5-12_luc*, *pSV40_luc*

Les 3 plasmides EF1_Luc, pC5-12_Luc et pSV40_Luc codant pour le gène de la *luciférase* ont été générés au Généthron. pEF1_luc est un vecteur d'expression eucaryote de 6007 pb codant pour la *firefly luciférase* sous le contrôle du promoteur *elongation factor 1 alpha humain* (EF1 α). Le plasmide pC5-12_luc est un vecteur de 6927 pb codant pour la *firefly luciférase* sous le contrôle du promoteur synthétique muscle spécifique C5-12 (147). pSV40_luc a une taille de 5009 pb et code pour la *luciférase* sous le contrôle du promoteur viral SV40.

Les 3 plasmides possèdent une origine de réplication bactérienne ainsi qu'un gène de résistance à l'*ampicilline* (β -lactamase) permettant la réplication ainsi que la sélection des bactéries transformées. Un signal de polyadénylation du virus SV40 en 3' du gène assure une stabilité accrue de l'ARNm et une meilleure expression du transgène dans les cellules eucaryotes.

b. pCMV_mSeAP

Le plasmide pCMV_mSeAP (généré au Généthon, Figure 34, ci-dessous) est un vecteur d'expression eucaryote de 7781 pb codant pour le gène rapporteur de la phosphatase alcaline murine sécrétée sous le contrôle du promoteur humain du cytomégalo virus (CMV). Il possède une origine de réplication bactérienne, un gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase) et un signal de polyadénylation (hémoglobine HBB2) suit le gène.

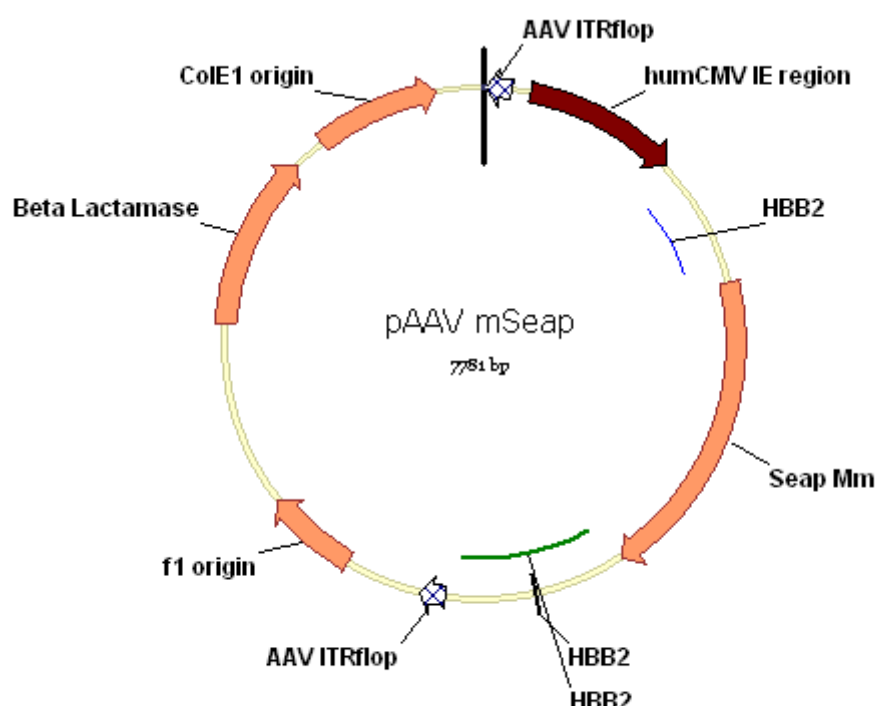


Figure 34 - carte du plasmide pCMV_mSEAP

Les 3 plasmides pMCK_mSeAp, pC512_mSeAP et pDesmine_mSeAP codant pour le gène de la *phosphatase alcaline* ont été générés au Généthon. pMCK_mSeAp est un vecteur d'expression eucaryote de 7573 pb codant pour la *phosphatase alcaline murine sécrétée* sous le contrôle du promoteur *muscle creatine kinase* (MCK). Le plasmide pC5-12_mSeAP est un vecteur de 7304 pb codant pour la *phosphatase alcaline murine sécrétée* sous le contrôle du promoteur synthétique muscle spécifique C5-12. Et pDesmine_mSeAP a une taille de 8083 pb et code pour la

phosphatase alcaline murine sécrétée sous le contrôle du promoteur humain de la desmine.

Les 3 plasmides possèdent une origine de répllication bactérienne ainsi qu'un gène de résistance à l'*ampicilline* (β -lactamase) permettant la répllication ainsi que la sélection des bactéries transformées. Un signal de polyadénylation de l'hémoglobine HBB2 en 3' du gène assure une stabilité accrue de l'ARNm et une meilleure expression du transgène dans les cellules eucaryotes.

II.3.1.3 Plasmide codant pour le gène fonctionnel : dystrophine

Le plasmide utilisé a été généré au sein du de G. Dickson. Il code pour une microdystrophine (décrite par Chamberlain et al. (148)) obtenue en délétant l'extrémité C-terminale de la dystrophine. La microdystrophine obtenue contient donc le domaine N-terminal de liaison à l'actine, les 3 premières et les dernières unités répétées du domaine central, les zones charnières 1, 2 et 4 et enfin le domaine riche en cystéine. Le gène est sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique dérivé du MCK et possède un signal de polyadénylation de la β -globine humaine.

II.1.4. Les agents transfectants cationiques

Les agents transfectants DOTAP (un lipide monocationique, Roche Applied Science) et la PEI branchée de 25 kDa (polymère cationique, Sigma-Aldrich) ont été utilisés comme témoins positifs dans nos expériences de transfection *in vitro* avec les différents poloxamères.

II.1.5. L'électroporateur BTX

Les expériences d'électrotransfert ont été réalisées grâce à un *électropulsateur ECM-830* (BTX, Figure 35A) relié à des électrodes (Figure 35B) contenant une vis en téflon afin d'ajuster l'écart entre les électrodes par rapport à la taille de la patte de l'animal. L'envoi des impulsions électriques est déclenché en actionnant une pédale (Figure 35C) afin d'aider l'expérimentateur (Figure 35, ci-dessous). Les paramètres retenus pour

l'ensemble de nos expériences sont les suivants : 8 pulses de 20 ms délivrés à un voltage de 200 V/cm à une fréquence de 2 Hz.

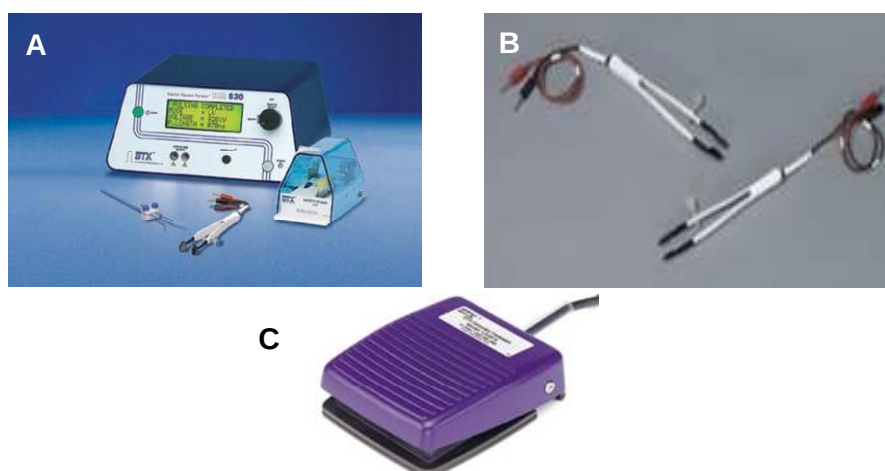


Figure 35 – Le générateur et les accessoires pour l'électrotransfert

II.1.6. Les animaux

Tous les animaux utilisés ont été élevés dans des conditions exemptes de pathogènes spécifiques (ou EOPS pour Exempte d'Organismes Pathogènes Spécifiques) à l'animalerie de GENETHON. Les animaux ont été manipulés après anesthésie en intrapéritonéal (kétamine à 100 mg/kg et xylazine à 1 mg/kg). Toutes les expériences ont été réalisées en conformité avec les règles européennes d'éthique concernant l'utilisation des animaux pour la recherche expérimentale.

II.6.1.1 Les souris Balb/C

Les souris Balb/C proviennent du laboratoire Charles River. Des souris femelles de 6-10 semaines ont été nos souris modèles pour la majorité de nos expériences.

II.6.1.2 Les souris mdx

La souris mdx (S-linked muscular dystrophy) est un modèle spontané de la myopathie de Duchenne. Elle présente une mutation dans l'exon 23 de la dystrophine, ce qui conduit à la production d'une dystrophine tronquée. Cette souris est en élevage dans l'animalerie de Généthon.

II.2. Les Méthodes

II.2.1. Les méthodes des expériences *in vivo*

II.1.2.1 Les plasmides

a. Transformation de bactéries compétentes avec le plasmide d'intérêt

Les bactéries utilisées pour amplifier les plasmides sont des bactéries thermocompétentes One Shot Escherichia Coli TOP10 (Invitrogen). Elles sont cultivées dans un incubateur à 37°C sous légère agitation (200 rpm). Le milieu de culture liquide utilisé est le LB (Luria Bertani) contenant l'antibiotique adéquat (par exemple de l'ampicilline à 50 µg/ml) afin de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide d'intérêt conférant une résistance à l'antibiotique. Le milieu de culture solide utilisé est le LB contenant l'antibiotique de sélection (même concentration que le milieu de culture liquide) et gélifié par de l'agar à 15 g/l. Tous les milieux de culture sont autoclavés en bouteille avant d'être utilisés en cultures liquide ou solide (boîtes de Petri).

Pour réaliser la transformation bactérienne, nous avons procédé de la manière suivante : 1 µl de plasmide (soit 100 ng/µl) est ajouté aux bactéries thermocompétentes puis incubé 30 minutes sur glace. Les bactéries sont ensuite transformées par un choc thermique de 30 secondes à 42 °C suivi d'une incubation de 2 minutes sur glace. Les bactéries ainsi transformées sont incubées en milieu riche, soit 250 µl de milieu SOC (Super Optimal Catabolite, Invitrogen, 2 % de tryptone, 0,5 % d'extraits de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MgSO₄, 20 mM de glucose) additionné de l'antibiotique (ampicilline à 50 µg/ml) (Sigma) et placées 1 heure à 37°C (agitation 200 rpm). Elles sont ensuite étalées sur milieu LB-agar contenant de l'ampicilline (50 µg/ml) et incubées une nuit à 37 °C. Les colonies qui ont poussé sur boîte de Petri en présence d'antibiotique sont sélectionnées et mises en culture liquide en condition stérile afin d'extraire et de purifier les plasmides amplifiés.

Afin de conserver les plasmides générés, les bactéries transformées sont conservées à -80°C dans un volume de 1 ml de culture auquel est ajouté 500 µl de glycérol.

b. Production et purification de l'ADN

i. Préparation d'ADN plasmidique en vue de transfections *in vitro*

Cette expérience est effectuée en utilisant le kit « NucleoSpin Plasmid Quick Pure » (Macherey- Nagel). Quelques clones sont sélectionnés puis repiqués et mis en pré-culture dans 3 ml de milieu LB et 30 µl d'ampicilline (50 µg/ml) et incubé à 37°C pendant la nuit sous agitation (200 rpm). La culture est ensuite culotée par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 6000 rpm. Le culot bactérien est repris dans 250 µl d'une solution de suspension (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A).

Les bactéries sont ensuite lysées (0,2 M NaOH, 1 % SDS) avant d'ajouter une solution contenant des protéases afin d'inactiver les endonucléases. La lyse est par la suite arrêtée par ajout de 300 µl d'une solution de neutralisation (4,09 M guanidine hydrochloride, 0,759 M acétate de potassium, 2,12 M acide acétique glacial, pH 4,2). Les lysats sont centrifugés à 11000 g pendant 5 minutes afin de culoter les débris bactériens, l'ADN génomique et les protéines. Le surnageant obtenu contenant les plasmides est déposé sur une colonne échangeuse d'ions. Les lavages se font avec 450 puis 350 µl de solution de lavages (60 % éthanol, 60 mM acétate de potassium, 8.3 mM Tris-HCl, 0,04 mM EDTA). Une centrifugation est ensuite effectuée afin d'éliminer les traces résiduelles d'éthanol. L'ADN plasmidique est enfin élué dans de l'eau dépourvue de nucléases. Afin de contrôler la qualité des plasmides extraits, on digère une petite quantité de ces derniers par une ou plusieurs enzymes de restriction appropriées. Les produits de digestion sont ensuite déposés sur un gel d'agarose à 1 %. Après électrophorèse, on analyse les profils de migration afin de sélectionner les clones ayant intégré le plasmide voulu.

Une fois la sélection des clones positifs faite, on procède à une maxiprep à l'aide du kit « NucleoBond PC 500 » (Macherey-Nagel) afin d'amplifier le clone contenant le plasmide attendu. Pour cela, 1 ml de la culture liquide du clone sélectionné est resuspendu dans 150 ml de LB + ampicilline (50 µg/ml) et incubé à 37°C pendant la nuit sous agitation (200 rpm).

La culture est ensuite culotée par centrifugation à 4°C pendant 15 minutes à 6000 rpm. Le culot bactérien est repris dans 12 ml d'une solution de suspension (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A).

Les bactéries sont ensuite lysées (0,2 M NaOH, 1 % SDS) avant d'ajouter une solution contenant des protéases afin d'inactiver les endonucléases. La lyse est par la suite arrêtée par ajout de 12 ml d'une solution de neutralisation (2,8 M acétate de potassium, pH 5,1). Les lysats sont centrifugés à 12 000 g pendant 40 minutes afin de culoter les débris bactériens, l'ADN génomique et les protéines. Le surnageant obtenu contenant les plasmides est déposé sur une colonne échangeuse d'ions. Les lavages se font avec 32 ml d'une solution de lavage (15 % éthanol, 100 mM Tris, 1.15 M chlorure de potassium, pH 6.3). Une centrifugation est ensuite effectuée afin d'éliminer les traces résiduelles d'éthanol. L'ADN plasmidique est ensuite élué dans 15 ml d'un tampon de solution faiblement saline (15 % éthanol, 100 mM Tris, 1 M chlorure de potassium, pH 8.5). Les plasmides ainsi élués sont précipités par addition d'isopropanol (11 ml) et centrifugation à 15 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot obtenu est lavé de ses sels par ajout d'éthanol à 70 % puis centrifugé (10 minutes à 15 000g) et enfin séché. Une fois bien sec, le culote est resuspendu dans 1 ml d'eau dépourvue de nucléases. La concentration et la pureté du plasmide sont évaluées par la mesure de l'absorbance (spectrophotomètre Hitachi) d'un échantillon dilué (1/50e) à 260 nm et 280 nm. La concentration ($\mu\text{g/mL}$) est calculée selon la formule suivante : $[\text{conc}^\circ \text{ADN}]_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution (50)} \times \text{facteur de DO (50)}$ et la pureté est déterminée en calculant le rapport de l'Absorbance A_{260}/A_{280} .

ii. Préparation d'ADN plasmidique « endotoxin free » en vue d'injections *in vivo*

Le but de cette préparation d'ADN plasmidique est d'obtenir suffisamment de vecteur d'expression et en qualité « endofree » pour effectuer une série d'injections *in vivo*. La préparation d'ADN plasmidique est effectuée à partir d'un volume de culture bactérienne supérieur à la préparation analytique (500 ml de LB avec antibiotique). Les tampons, les filtres et les colonnes utilisés proviennent du kit «EndoFree Plasmid Mega Kits» (Qiagen). L'endotoxine est un lipopolysaccharide (LPS) qui est contenu dans la paroi bactérienne des bactéries Gram négatif. Elle induit la production d'IFN γ et d'IL12. Or, plus la concentration en endotoxine augmente, plus la dose de lymphocytes T producteurs d'IFN γ augmente.

Les bactéries sont culotées par centrifugation 15 minutes à 6 000 g à 4°C puis resuspendues dans 50 ml de tampon de suspension (Tris-HCl 50 mM, pH 8, 10 mM

EDTA, 100 µg/ml RNase A). La suspension est alors lysée pendant 5 minutes par addition de 50 ml de tampon contenant de la soude (200 mM NaOH) et du détergent SDS (SDS 1 %). Le SDS va alors solubiliser les composants de la membrane (phospholipides et protéines) conduisant à la lyse et au relargage des composants cellulaires. Le lysat est neutralisé par addition de 50 ml de tampon de neutralisation froid (acétate de potassium 3 M ; pH 5,5) qui dénature les protéines, l'ADN génomique ainsi que les débris cellulaires. Le lysat est ensuite purifié par filtration à l'aide des filtres fournis par le kit (QIAfilter Cartridges) pendant 10 minutes à température ambiante. Le filtrat est transféré sur une colonne échangeuse d'anions (Diethylaminoethanol-DEAE) pour purifier l'ADN plasmidique. Cette méthode est basée sur le fait que les charges négatives (les groupements phosphate de l'ADN) vont interagir avec les groupements DEAE (chargés positivement) à la surface de la résine. La colonne est équilibrée avec 35 ml d'un tampon à forte concentration saline (NaCl 750 mM ; MOPS 50 mM, pH 7.0 ; isopropanol 15 % ; Triton 0,15%) puis lavée par 200 ml de tampon de lavage (NaCl 1,0 mM ; MOPS 50 mM, pH 7.0 ; isopropanol 15 %). Les plasmides sont élués dans 35 ml d'un tampon à concentration saline moyenne (NaCl 1,6 mM ; MOPS 50 mM, pH 7,0 ; isopropanol 15 %). Les plasmides ainsi élués sont précipités par addition d'isopropanol (24,5 ml) et centrifugation à 15 000g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot obtenu est lavé de ses sels par ajout d'éthanol à 70 % puis centrifugé (10 minutes à 15 000g) et enfin séché. Une fois bien sec, le culot est resuspendu dans 1 ml d'eau stérile. La concentration et la pureté du plasmide sont évaluées par la mesure de l'absorbance (spectrophotomètre Hitachi) d'un échantillon dilué (1/50e) à 260 nm et 280 nm. La concentration (µg/mL) est calculée selon la formule suivante : $[\text{conc}^{\circ} \text{ADN}]_{260\text{nm}} \times \text{facteur de dilution (50)} \times \text{facteur de DO}^{\square} (50)$ et la pureté est déterminée en calculant le rapport de l'Absorbance A260/A280.

Avant utilisation chez l'animal, le plasmide est testé dans un test de transfection *in vitro*.

[□] A 260 nm, une unité de densité optique (DO) correspond à une solution d'ADN double brin de concentration 50µg/mL.

II.1.2.2 Gels retard

Le but de cette expérience est de vérifier la capacité d'un vecteur à complexer ou non l'ADN. En effet, l'ADN libre possède une charge globale négative (groupements phosphate). Lorsqu'il est compacté par un produit, l'ADN subit un changement de charge et de taille. Ces changements se traduisent par un retard de migration de l'ADN sur le gel d'électrophorèse.

Pour réaliser les gels retards, on utilise le protocole suivant : l'ADN plasmidique (1 µg) et une quantité croissante de poloxamères sont dilués séparément dans 25 µL d'une solution de NaCl 150 mM et mélangés dans un volume final de 50 µL. On laisse les « complexes » se former pendant 15 minutes à température ambiante. Après l'incubation, les « complexes » (20 µL) sont déposés sur gel d'agarose 1% contenant 0,5 µg/ml de SYBR Safe (Invitrogen) en vue d'une électrophorèse. Afin de visualiser les produits de migration, du tampon de charge est ajouté à nos échantillons. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon TBE 1X à 100 V pendant 40 minutes. La révélation se fait en chambre noire à l'aide d'une table à UV (Ultraviolet)

PS : Tous les polymères ont été testés suivant une gamme de concentration allant de 0,01% à 1%.

II.1.2.3 Transfections

a. Les conditions de culture des lignées cellulaires

i. Conditions de culture

La lignée cellulaire HepG2 (hépatocarcinome humain) a été obtenue auprès de l'American Type Culture Collection (Rockville, Md.) et cultivée dans un milieu contenant du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (CAMBREX) additionné de 1% (v/v) de pénicilline/streptomycine (5 mg/mL) et de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal (SVF) (HyClone).

Les myoblastes murins C2C12 ont été obtenus auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md.) et cultivés dans un milieu contenant du DMEM additionné de 10 µg/mL de gentamicine et de 20 % (v/v) de SVF. Les myotubes ont été obtenus par remplacement du milieu de culture des myoblastes par un milieu de différenciation contenant du DMEM, de la gentamicine et 5 % (v/v) de sérum de

cheval (Horse Serum Donor Herd, Gibco INVITROGEN). Les cellules musculaires différenciées ont été maintenues dans ce milieu entre 4 et 10 jours après la mise en différenciation.

La lignée cellulaire NIH3T3 a été obtenue auprès de l'ATCC (Rockville, Md.) et cultivée dans un milieu contenant du Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (CAMBREX) additionné de gentamicine (10 µg/mL) (Gibco INVITROGEN) et de 10 % (v/v) de SVF (HyClone).

Les différentes lignées cellulaires sont entretenues en culture en flasques de 75 cm² ventilées et incubées dans une enceinte thermostatée à 37°C, dans une atmosphère saturée en humidité et contenant 5% de CO₂. Le passage des cellules est réalisé tous les 3 jours sous atmosphère ventilée (hotte à flux laminaire) comme décrit ci-après : les cellules sont lavées au PBS (Phosphate buffered saline sans Ca²⁺ et Mg²⁺) puis décollées à l'aide d'une solution de trypsine (0,5 g/l) contenant de l'EDTA (acide éthylènediaminotétraacétique sel disodique à 0,2 g/l) et ré-ensemencées dans une nouvelle flasque de 75cm² contenant du milieu de culture frais.

La quantité de cellules à ensemercer est calculée pour assurer une reprise rapide de la croissance ainsi que pour éviter l'obtention d'une culture à confluence avant le passage suivant, assurant ainsi le maintien en permanence de toute la population cellulaire en phase exponentielle de croissance

ii. Conditions de transfection *in vitro*

Les cellules à transfecter sont ensemencées dans une plaque de culture de 24 puits (NUNC). La quantité de cellules ensemencées est calculée de manière à avoir une confluence de l'ordre de 80% le lendemain, jour de la transfection. Les cellules sont alors transfectées par ajout de 500 µl de complexes transfectants (dans du milieu de culture dépourvu de sérum, voir paragraphe suivant) sur les cellules préalablement rincées avec du PBS. Les transfections sont effectuées avec 2 µg d'ADN par puits. Après une incubation de 3 heures environ, le milieu de transfection est remplacé par 1 ml de milieu de culture complet (DMEM 10 % SVF, 1 % pénicilline/streptomycine PS) et la plaque est remise à l'étuve. 30 heures d'incubation plus tard, les cellules sont lysées par addition de 250 µL de tampon de lyse (voir Tableau 1, p58). Les extraits sont conservés à -80°C en attendant l'analyse de l'expression luciférase et le dosage protéique, afin de normaliser l'activité enzymatique par rapport à la quantité de

protéines. Chaque condition de transfection est effectuée en duplicat, et chaque expérience a été réalisée au moins deux fois.

b. Préparations des complexes transfectants

Les agents transfectants utilisés comme témoins positifs de l'expérience sont le PEI branché (25 kDa) et/ou le DOTAP (utilisé à 3 équivalents de charges positives, c'est-à-dire un ratio +/- de 3.). 4 µg de plasmide et une quantité croissante de poloxamère (en % w/v) sont chacun dilués dans 100 µL de NaCl 150 mM ou de Tyrode 1X. Les complexes transfectants sont alors formés par le mélange volume à volume des deux solutions préparées. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante, les solutions sont diluées dans du milieu DMEM sans sérum dans un volume final de 1 mL. 500 µL de milieu de transfection sont alors déposés en duplicat dans chaque puits de culture cellulaire.

II.1.2.4 Test Luciférase

a. Dosage de la luciférase

La mesure de l'activité luciférase des échantillons est réalisée par la mesure de la luminescence produite lorsque l'enzyme luciférase est mise en présence de son substrat la luciférine. Après la lyse des cellules (avec le tampon de lyse décrit dans le Tableau 1), le lysat est centrifugé pendant 10 minutes à 4°C à la vitesse de 14 000 rpm afin d'éliminer les débris cellulaires. 10 µl de lysat ainsi obtenu sont utilisés pour la mesure de l'activité luciférase. Celle-ci est réalisée, après injection automatique de 50 µl de tampon Assay (composition : voir tableau des tampons plus haut) et de 50 µl d'une solution de luciférine (Molecular Probes) à 167 µM. La mesure de la luminescence produite sur une période de 10 secondes est alors mesurée grâce au luminomètre Victor2 (Wallac, Perkin Elmer). Les résultats obtenus sont ensuite normalisés en fonction de la quantité de protéines cellulaires présente au sein de l'échantillon (qui est déterminée par un dosage de Bradford réalisé à l'aide du kit Biorad protein assay de Biorad). Les résultats sont exprimés en unités de lumière relative pour 10 secondes et par milligramme de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

b. Dosage protéique Bradford

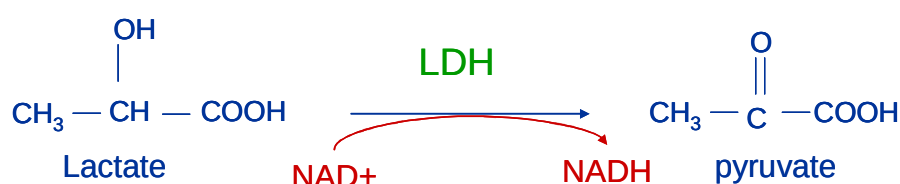
Le dosage des protéines est réalisé grâce au test colorimétrique de Bradford. Le réactif du dosage (Biorad Protein Assay) forme un complexe stable de coloration bleue en présence de protéines qui peut être mesuré par spectrophotométrie à 595 nm. Le réactif du dosage est préalablement dilué au cinquième dans de l'eau. La réaction est réalisée en plaque transparente de 96 puits, dans 200 µl de réactif auxquels sont ajoutés 2 µl de lysat cellulaire. En parallèle, une gamme de BSA (Bovine Serum Albumine) allant de 0 à 20 µg/ml est réalisée, ainsi qu'un contrôle avec 2 µl de tampon de lyse. La DO (densité optique) obtenue avec les 2 µl de tampon de lyse est retranchée à toutes les mesures de DO des lysats. La concentration en protéines des lysats est calculée à partir de la courbe étalon (concentration de la gamme de BSA en fonction de la DO) et les résultats obtenus sont exprimés en mg de protéines totales du lysat. Les résultats des tests luciférase sont alors rapportés aux quantités totales de protéines correspondantes et sont exprimés en RLU/10 s/mg de protéine.

II.1.2.5 Suivi de la perméabilisation membranaire par l'iodure de propidium (IP)

L'étude de la perméabilisation membranaire a été menée à l'aide d'une technique publiée et qui fait appel à l'utilisation de l'iodure de propidium (IP)⁽¹⁴⁹⁾. Cette technique d'analyse se fait comme suit : les cellules HepG2 à analyser sont préalablement incubées en présence d'IP (3 µg/ml) et de doses croissantes de poloxamères (de 0,01 à 1% w/v) et diluées dans du milieu DMEM sans sérum dans un volume final de 400 µL. Les cellules sont alors incubées à 37 °C. Après 2 heures d'incubation, les cellules sont lavées deux fois au PBS puis décollées de la plaque de culture et dissociées par l'ajout de 100 µL d'une solution de PBS/trypsine diluée au tiers et par action mécanique. Les cellules sont alors resuspendues dans un volume final de 500 µL de PBS. Les échantillons sont maintenus sur glace jusqu'à analyse par cytométrie de flux (Becton Dickinson). Avant analyse, chaque échantillon est soigneusement resuspendu par action mécanique. L'analyse des résultats se fait grâce au logiciel d'acquisition et d'analyse des données CellQuest 3.1f (Becton Dickinson).

II.1.2.6 Le test d'intégrité membranaire LDH (Lactate Deshydrogenase)

La lactate deshydrogénase (LDH) est une enzyme exclusivement cytosolique, relativement stable, qui n'est pas capable de traverser la bicouche lipidique. Elle catalyse la conversion réciproque du pyruvate en lactate :

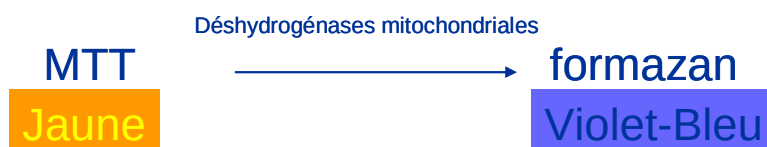


La mesure de la présence de l'enzyme dans le surnageant des cellules permet de détecter une altération membranaire. Le dosage de cette enzyme est, par conséquent, un bon indicateur de l'intégrité membranaire.

Afin de vérifier les propriétés perméabilisantes de nos différents poloxamères, nous avons incubé les lignées cellulaires HepG2 et les myotubes C2C12 en présence de quantités croissantes de poloxamères dilués dans du milieu sans sérum. Après 2h d'incubation à 37 °C, un aliquot du surnageant de chaque puits est prélevé afin de réaliser la mesure de l'activité LDH. Pour cela, nous avons utilisé le kit CytoTox-ONE™ (Promega) qui mesure de manière indirecte le taux de LDH relargué. En effet, la LDH catalyse la conversion du lactate en pyruvate via le cofacteur (NAD^+/NADH). Le NADH réagit avec les substrats du kit (diaphorase et résazurine) pour produire une molécule (résorufine) dont on peut mesurer la fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 544\text{nm}$ et $\lambda_{\text{émission}} = 612\text{nm}$). Des contrôles négatifs (cellules seules) et positifs (tampon de lyse Promega et melittine) ont été utilisés afin de normaliser les résultats. La melittine est un peptide extrait du venin d'abeille qui se fixe à la membrane et entraîne la destruction de la cellule. Lorsqu'elle est utilisée à une concentration supérieure à 5,3 μM , la melittine devient cytotoxique (150, 151). Dans nos études, nous avons utilisé la melittine à 1 μM , 10 μM et 20 μM .

II.1.2.7 Le test de viabilité cellulaire MTT

En présence de cellules métaboliquement actives, le sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est réduit en formazan sous l'action d'une enzyme, la succinate deshydrogénase mitochondriale, issues des cellules vivantes actives. La couleur du milieu passe alors du jaune au bleu-violet.



L'intensité de cette coloration est proportionnelle au nombre de cellules vivantes présentes lors du test. Le réactif du test est préalablement dilué au 1/10^{ième} dans du milieu de culture (DMEM) sans sérum. 30 h post-transfection, le surnageant contenu dans chaque puits est aspiré et les cellules sont incubées pendant 3 à 4h à la température de 37°C en présence de 500 µl de milieu contenant le réactif MTT (0,5 mg/ml soit 0,25 mg/puits). La réaction enzymatique est stoppée en éliminant le milieu de culture et en ajoutant de 500 µl de DMSO. L'absorbance est alors mesurée à 570 nm et le pourcentage de viabilité des cellules est évalué. Les cellules non traitées servent de contrôle (le contrôle cellule donne la valeur du 100%). Les cellules traitées avec le tampon de lyse et la melittine servent de contrôle positif de la mortalité cellulaire.

II.2.2. Concentration Micellaire Critique (CMC)

Toutes les expériences réalisées pour déterminer la concentration micellaire critique ont été faites à la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Paris, U640 Inserm – UMR 8151 CNRS par Nathalie Mignet et Gaelle Pembouong.

La concentration micellaire critique (ou CMC) a été déterminée en utilisant la méthode de fluorescence à la diphenylhydantoine DPH (152). En résumé, la DPH (3 µL à 1,5 mM préparée dans du tétrahydrofurane) a été ajoutée à des quantités croissantes de poloxamères dissous dans un volume de 200 µL de solution aqueuse.

Les mélanges DPH/poloxamères sont remués puis transférés dans une plaque noire 96 puits. Les plaques sont incubées à l'obscurité pendant 1 heure soit à température ambiante (env. 25°C) soit à 37°C. Les longueurs d'onde utilisées pour les mesures de fluorescence sont 358 nm pour la longueur d'onde d'excitation et 430 pour la longueur d'onde d'émission. Les fentes d'excitation et d'émission ont été réglées aux largeurs de bande de 1,5 et 20 respectivement. Le spectrophotomètre Cary Eclipse (Varian) a été utilisé pour les mesures de fluorescence. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

II.2.3. Les expériences *in vivo*

II.3.2.1 Injection d'ADN nu

Tous les plasmides injectés *in vivo* ont été préparés à l'aide du kit « Endofree Megaprep » de Qiagen. Sauf exception, 11,42 µg d'ADN ont été dilués dans un volume final de 40 µL d'une solution de NaCl 150 mM ou de Tyrode (voir Tableau 1, p58 pour la composition). Les échantillons sont ensuite placés à 4°C en vue de l'injection *in vivo*. 35 µL (soit 10 µg de plasmide) sont injectés par muscle *tibialis*.

II.3.2.2 Préparation des mélanges ADN/copolymères

Les mélanges ADN/poloxamères sont préparés de la manière suivante : l'ADN et le poloxamère (en % poids/volume) sont chacun dilués la veille de l'injection dans 20 µL de NaCl 150 mM ou Tyrode et placés à 4°C. Les 2 solutions sont mélangées une quinzaine de minutes avant administration *in vivo*. 35 µL du mélange sont injectés par muscle.

II.3.2.3 Injections

a. Injections par voie intramusculaire (IM)

L'ADN seul ou les complexes ADN/poloxamères ont été injectés par voie intramusculaire, dans le *tibialis* antérieur (TA) des souris préalablement anesthésiées (injection par voie intrapéritonéale d'un mélange de kétamine 100 mg/kg et xylazine 10 mg/kg, à raison de 100 µl pour une souris de 20 g, à l'aide d'une seringue à insuline de 1 ml et d'une aiguille de 25G). Les solutions ont été vortexées juste avant

l'injection et l'injection s'est faite à la base du muscle, parallèlement aux fibres musculaires à l'aide d'une seringue Hamilton (30G). Le sacrifice des souris injectées a lieu pour l'ensemble de nos protocoles (sauf indication contraire) sept jours après l'injection.

b. Injections par voie intrapéritonéale (IP)

Pour les études de perméabilisation *in vivo*, une injection préalable à J0 de 100 µl de bleu Evans (0,5 mg/ml) est réalisée par voie intrapéritonéale à l'aide d'une seringue à insuline (25G). Le bleu Evans est un colorant incapable de traverser les membranes et connu pour se lier à l'albumine du sang. Il est utilisé ici comme marqueur de la perméabilité membranaire des cellules musculaires. En effet, l'albumine du sang est capable de pénétrer dans les fibres musculaires des cellules dont la membrane a été altérée. Aussi, l'accumulation intracellulaire de bleu Evans dans les fibres musculaires indique que la membrane a perdu son intégrité. Suite à l'injection de bleu Evans, les solutions d'ADN seul (combiné ou non à la technique d'électrotransfert) ou de complexes ADN/poloxamères sont injectées le lendemain (J1) par voie intramusculaire dans les TA des souris préalablement anesthésiées. Le sacrifice de ces souris a lieu le lendemain de l'injection des plasmides (J2).

II.3.2.4 Sacrifices et prélèvements

Toutes les souris injectées ont été sacrifiées par élongation cervicale. Les prélèvements ont été recueillis immédiatement après le sacrifice.

a. Prélèvements pour analyses biochimiques

Les prélèvements musculaires ont été introduits dans des tubes eppendorf de 1,5 ml puis congelés dans de l'azote liquide. Une fois le tissu congelé, les tubes ont été placés dans un congélateur à -80°C en attendant d'être analysé.

b. Prélèvements pour analyses histologiques

Les prélèvements ont été montés sur des bouchons de liège surplombés de gomme arabique. Ils ont été congelés lentement dans une solution d'isopentane refroidi dans

de l'azote liquide. Une fois les tissus congelés, les prélèvements sont placés à -80°C en vue d'une coupe transversale au cryostat.

II.3.2.5 Mesure du niveau d'expression *in vivo* des gènes rapporteurs

a. Test luciférase sur les échantillons musculaires

Les prélèvements musculaires sont récupérés et mis sur carboglace en vue d'un broyage. 500 µL de tampon de lyse additionné d'un cocktail inhibiteur de protéase (Sigma) sont déposés sur les muscles congelés. Chaque muscle est alors broyé à l'aide d'un Ultra-turrax (Ika) pendant approximativement 30 secondes. Les broyats sont alors centrifugés pendant 10 minutes à 4°C à la vitesse de 14 000 rpm. 5 µl de du surnageant sont utilisés pour la mesure de l'activité luciférase. Celle-ci est réalisée, après injection automatique de 100 µl de tampon d'essai (composition : voir tableau des tampons plus haut) et de 100 µl d'une solution de luciférine (Molecular Probes) à 167 µM. La mesure de la luminescence produite sur une période de 10 secondes est alors mesurée grâce au luminomètre Victor2 (Perkin Elmer). Les résultats obtenus sont ensuite normalisés en fonction de la quantité de protéines cellulaires au sein de l'échantillon (déterminée par un dosage de Bradford). Les résultats sont exprimés en unités de lumière relative pour 10 secondes et par milligramme de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

b. Détection de la phosphatase alcaline sécrétée

Les souris ayant reçu 20 µg d'un plasmide codant pour la mSeAP sont anesthésiées à J7 en vue d'un prélèvement sanguin au sinus rétro-orbital. Les prélèvements sanguins sont alors immédiatement centrifugés à 4°C à 6000 rpm pendant 10 minutes. Le sérum est alors récupéré et la quantification de la mSeAP est faite à l'aide du kit Phospha-Light (Tropix Perkin-Elmer) suivant les recommandations du fabricant. La mesure de la luminescence est mesurée grâce au luminomètre Victor2 (Wallac, Perkin Elmer).

II.3.2.6 Histologie

a. Coupes sur cryostat

Les coupes musculaires transversales (8 à 10 µm d'épaisseur) sont effectuées sur les muscles précédemment prélevés et montés sur bouchons. Les cryosections sont réalisées à l'aide d'un cryostat (microtome maintenu dans une enceinte à -20°C) et étalées sur lames.

b. Coloration Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS)

L'Hématoxyline-Phloxine-Safran (HPS) est une coloration simple utilisée en routine histopathologique qui permet de mettre en évidence spécifiquement les différentes structures tissulaires et cellulaires. L'hématoxyline (colorant basique) colore les acides nucléiques en bleu noir tandis que la phloxine (colorant acide) colore en rouge plus ou moins intense les cytoplasmes et certaines structures extracellulaires, qui sont dits « éosinophiles ». Enfin, le safran colore les fibres de collagène en jaune-orangé.

Les coupes transversales ont été obtenues comme décrit précédemment et colorées à l'hématoxyline de Harris (Sigma) pendant 3 min. Après lavage à l'eau, les lames ont été plongées (passage) dans une solution d'alcool chlorhydrique à 0,2% (v/v) afin d'éliminer l'excédent de colorant. Après un nouveau lavage à l'eau, les tissus ont été bleuis dans l'eau de Scott (solution à 3,5 g/l de bicarbonate de sodium et 20 g/l de sulfate de magnésium) pendant 1 min avant d'être de nouveau rincés à l'eau et colorés à la phloxine 1% (m/v) (Sigma) pendant 30 s. Après rinçage à l'eau, les coupes ont été déshydratées à l'éthanol 70° pendant 1 min (au maximum), puis rincées dans l'éthanol absolu. Les tissus ont ensuite été colorés au safran 1% (v/v dans de l'éthanol absolu) pendant 3 min et rincés à l'éthanol absolu. Pour finir, les coupes ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min). Puis les lames ont été montées en milieu *Eukitt* (Fluka) et observées à l'aide d'un microscope (Nikon eclipse E600).

c. Coloration mSeAP sur les coupes musculaires

Une révélation histo-enzymatique de la murine Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (mSeAP) a été réalisée sur les coupes de muscles ayant préalablement reçu un plasmide codant pour la phosphatase alcaline murine afin

d'évaluer l'efficacité de transfert du vecteur. Après décongélation, les coupes transversales (obtenues comme décrit précédemment) ont été fixées pendant 10 min dans une solution de glutaraldéhyde 0,5 % (v/v) avant d'être rincées deux fois dans du PBS à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées dans du PBS (sans calcium, ni magnésium) pendant 30 min à 65°C afin d'inhiber l'activité de la phosphatase alcaline endogène, puis rincées dans du PBS pendant 10 min à température ambiante. La coloration « violette » de la mSeAP a été mise en évidence en incubant les coupes (pendant au moins 5 heures dans une chambre humide à 37°C) dans une solution contenant 0,1 M de Tris-HCl (pH = 9,5), 0,1 M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, 0,0165 % (m/v) de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) (Promega) et 0,033 % (m/v) de nitroblue tetrazolium (NBT) (Promega). Les coupes ont ensuite été rincées dans du PBS (sous agitation) avant d'être contre-colorées pendant 1 min dans une solution appelée « rouge à noyaux » contenant 1 mM de 1,2,3,5,6-tetrahydro-6-phenylimidazo(2,1-b)thiozole (levamisole) (Sigma), puis rapidement rincées à l'eau froide et plongées pendant 4 min dans du butanol. Pour finir, les coupes ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min). Puis les lames ont été montées en milieu *Eukitt* (Fluka) et observées à l'aide d'un microscope (Nikon eclipse E600).

d. Mise en évidence de la bêta-galactosidase sur des coupes musculaires

La révélation de la bêta-galactosidase a été réalisée sur les coupes de muscles ayant préalablement reçu le plasmide pCMV_LacZ. Après décongélation, les coupes transversales ont été fixées pendant 10 min dans une solution de glutaraldéhyde 0,5 % (v/v) avant d'être rincées dans du PBS puis dans une solution de chlorure de magnésium à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) pendant 4 à 6 h à 37°C. Les coupes ont ensuite été rincées deux fois dans du PBS avant d'être contre-colorées pendant 30 s dans de l'hématoxyline et 10 s dans de l'éosine. Enfin, afin de monter les lames, elles ont été plongées pendant 5 min dans du butanol, les coupes ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min). Puis les lames ont été montées en milieu *Eukitt* (Fluka) et observées à l'aide d'un microscope (Nikon eclipse E600).

e. Observation du marquage au bleu Evans

Les muscles des souris ayant été préalablement injectées au bleu Evans ont été coupées au cryostat puis traitées à l'acétone refroidi pendant 10 min sous hotte puis rincées au PBS. Les lames ont été montées au Vectashield/Fluoromount (VECTOR) puis scellées au vernis incolore avant d'être observée au microscope à fluorescence inversé à une longueur d'onde d'excitation de 633 nm (microscope inversé LEICA DM IRBE équipé d'une platine motorisée et d'une caméra couleur et piloté par une suite de logiciels de morphométrie proposés par la société Microvision).

II.3.2.7 Immunomarquage

a. Marquage anti-laminine

L'immunomarquage des laminines a été utilisé pour mettre en évidence le contour des fibres musculaires sur les coupes transversales de muscle afin de pouvoir compter le nombre de fibres et mesurer leur diamètre. Les coupes musculaires transversales ont été obtenues comme décrit précédemment et traitées à l'eau oxygénée pendant 20 min à température ambiante (en chambre humide) pour inhiber la peroxydase endogène avant d'être rincées dans du PBS pendant 5 min. Après saturation des sites non-spécifiques par du PBS-sérum de chèvre 10% (v/v) pendant 30 min, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire (anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la laminine, dilué au 1 :1000, DAKO) pendant 1 nuit à 4°C en chambre humide. Après lavages au PBS (3x10 min), les coupes ont été incubées avec l'anticorps secondaire du kit *En Vision™ Rabbit HRP* (anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, produit chez la chèvre, DAKO) pendant 30 min à température ambiante. Après lavages au PBS (3x10 min) et traitement au DAB (voir ci-dessus), les lames ont été égouttées et éclaircies dans 2 bains d'Histosol (2x2 min) avant d'être montées avec le milieu *Eukitt* (Fluka). Les coupes ont été observées au microscope (Nikon eclipse E600) et les images ont été capturées par une caméra CCD (Sony) avant d'être traitées par le logiciel Ellix (Microvision, Evry) pour estimer le nombre de fibres.

b. Marquage de la dystrophine

Les coupes de muscles sont réhydratées dans du PBS 1X (sans calcium ni magnésium) pendant 5 minutes. Les coupes sont traitées avec une solution à l'eau oxygénée pendant 10 min à température ambiante (en chambre humide) pour inhiber la peroxydase endogène avant d'être rincées dans du PBS pendant 5 min. Après saturation des sites non-spécifiques avec une solution d'eau oxygénée et d'azide de sodium, les coupes ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-dystrophine NCL-Dys 2 (anticorps monoclonal de souris dirigé contre la dystrophine, dilué au 1 : 20 dans une solution de PBS, 2% SVF, Novacastra) pendant au moins 2 heures à température ambiante ou toute la nuit à 4°C. Les coupes ont ensuite été rincées deux fois dans une solution de PBS puis incubées avec l'anticorps secondaire (pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide et à l'obscurité. Après lavages au PBS (3x15 min) sous légère agitation et traitement à la DAB-peroxydase, les lames ont été montées à l'Eukitt (Fluka). Les coupes ont été observées au microscope (Nikon eclipse E600) et les images ont été capturées par une caméra CCD (Sony) avant d'être traitées par les logiciels Cartograph et Ellix (Microvision, Evry) pour estimer le nombre de fibres dystrophine positives.

Résultats

III. Résultats

III.1. Optimisation des conditions d'études de l'ADN plasmidique après injection et électrotransfert

III.1.1. Introduction

Au cours de ce travail, certaines mises au point de protocole ont été effectuées pour optimiser le transfert de gène. Ces études préliminaires ont été effectuées sur des gènes rapporteurs en utilisant l'électrotransfert. Ce chapitre a donc pour objectif de présenter les résultats de ces différentes mises au point.

III.1.2. Contexte

Comme mentionné précédemment dans l'introduction, le muscle squelettique est un tissu cible très intéressant pour le transfert de gène *in vivo* car il offre de nombreux avantages : le muscle est facilement accessible et de grand volume, il possède une vascularisation développée permettant aux protéines produites d'atteindre rapidement la circulation sanguine, et surtout, les fibres musculaires sont des cellules quiescentes qui permettent un maintien du transgène et une expression à long terme. Ainsi, le muscle squelettique est un organe de choix pour la production de protéines thérapeutiques.

Cependant, dans un tel contexte, il est indispensable de disposer de techniques permettant de véhiculer efficacement l'ADN thérapeutique jusqu'au muscle. Pour cela, nous avons choisi d'étudier la technique d'électrotransfert.

III.1.3. Technique de l'électrotransfert

Brièvement, cette technique consiste à appliquer un courant électrique sur les cellules ou le tissu cibles après administration de l'ADN. Il en résulte 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. La migration de l'ADN est renforcée par les propriétés électrophorétiques de cette technique.

III.1.4. Optimisation des conditions d'électrotransfert

Historiquement, les conditions d'application de l'électrotransfert ont été définies sur la cellule *in vitro* (voir Introduction). Ensuite, ces paramètres ont été adaptés afin de travailler *in vivo* sur des fibres musculaires. Ainsi, il a été constaté que des impulsions répétées (8 à 10) à la fréquence de 1 ou 2 Hz, de longue durée (4-50 ms/impulsion) et peu intenses (100-500 V/cm) permettent d'atteindre de bons niveaux d'expression *in vivo* (86, 89, 92). L'équipe de M.P Rols a optimisé ces paramètres chez la souris dans le muscle *tibialis* antérieur (94-96).

Cependant, ne disposant pas du même matériel (générateur, plaques) ni d'informations sur la technique d'injection, nous avons voulu optimiser les différents paramètres décrits plus haut avec nos conditions de manipulation.

Nous avons commencé notre étude avec l'électroporateur que nous possédions à Généthon. Cependant, nous avons eu une longue série de problèmes avec ce générateur et nous n'obtenions pas du tout les mêmes gains que ceux décrits dans la littérature. En effet, nous nous sommes aperçus que celui-ci délivrait un voltage différent de celui programmé, et cela de manière complètement aléatoire.

De plus, les électrodes jusque là utilisées à Généthon, n'étaient pas conformes non plus. Une partie du courant délivré par le générateur « capricieux » était perdue à cause des électrodes. Les plaques d'électrodes contenaient un dépôt épais, ce qui rendait la conduction du courant électrique difficile. Le système permettant de régler l'écartement des plaques (afin de l'ajuster au diamètre de la patte de la souris) n'était pas isolant. En effet, la vis permettant le réglage de l'écartement des plaques était en métal et était mal isolée.

Ce n'est qu'après de nombreuses expérimentations et l'intervention d'un expert que nous avons découvert tous ces problèmes, qui jusque là n'avaient jamais été rapportés au sein du laboratoire. . Evidemment, l'ensemble de ces problèmes techniques a considérablement retardé le projet.

Suite à ces problèmes, nous avons fait l'acquisition d'un nouvel *électropulsateur ECM-830* (BTX) et nous avons vérifié et appliqué les différents paramètres décrits dans la littérature après administration d'ADN plasmidique codant pour le gène de la luciférase. De plus, nous avons optimisé nos plaques existantes en les nettoyant et en échangeant la vis en métal avec une vis en téflon.

Pour l'ensemble des séries d'expérience qui vont suivre, les souris injectées sont des souris Balb/c âgées d'environ 8 semaines à la date d'injection qui ont reçu 30 µg de plasmide CMV_luc. Les souris ont toujours été anesthésiées avant l'utilisation de l'électroporateur et le diamètre de la patte à injecter a été mesuré à l'aide d'une règle afin de délivrer le bon voltage. Les souris ont ensuite été sacrifiées à J7 et leurs muscles ont été prélevés et congelés dans de l'azote liquide en vue de l'analyse de l'expression luciférase. Pour doser cette dernière, les muscles sont préalablement broyés à l'aide de l'Ultra-turrax (Ika).

Nous avons utilisé le gène rapporteur codant la luciférase de luciole *Photinus pyralis* (firefly luciferase) qui est une enzyme bioluminescente. Pour qu'il y ait production de luminescence, la luciférase doit réagir avec son substrat, la luciférine. La réaction chimique entre la luciférase et la luciférine, nécessite la présence d'ATP, d'ions Mg^{2+} et d'oxygène (tampon d'essai) :



La mesure de la luminescence produite sur une période de 10 secondes est alors mesurée grâce au luminomètre Victor2 (Perkin Elmer). Les résultats obtenus sont ensuite normalisés en fonction de la quantité de protéines cellulaires au sein de l'échantillon (déterminée par un dosage de Bradford). Les résultats présentés ci-dessous sont exprimés en unités de lumière relative pour 10 secondes et par milligramme de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

III.1.5. Optimisation du mode d'injection

Au cours des diverses séries d'expériences réalisées et relatées ci-dessus, nous nous sommes interrogées sur différentes façons d'améliorer le transfert de gènes *in vivo* à l'aide de la technique d'électrotransfert. Nous avons fait varier plusieurs paramètres intervenant « techniquement » dans l'électrotransfert mais nous pouvons aussi nous interroger sur la manière d'injecter l'ADN plasmidique avant d'appliquer les électrodes et de délivrer le courant électrique.

Pour cela, nous avons testé 4 conditions d'injection variant autour de 2 paramètres, la vitesse d'injection ainsi que le lieu d'injection sur des groupes de 3 souris. Toutes les injections se sont faites parallèlement aux fibres musculaires et les conditions d'électrotransfert étaient les suivantes : 200 V/cm, 20 ms, 2 Hz, 8 pulses. Le volume d'ADN injecté était de 35 μ l. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous.

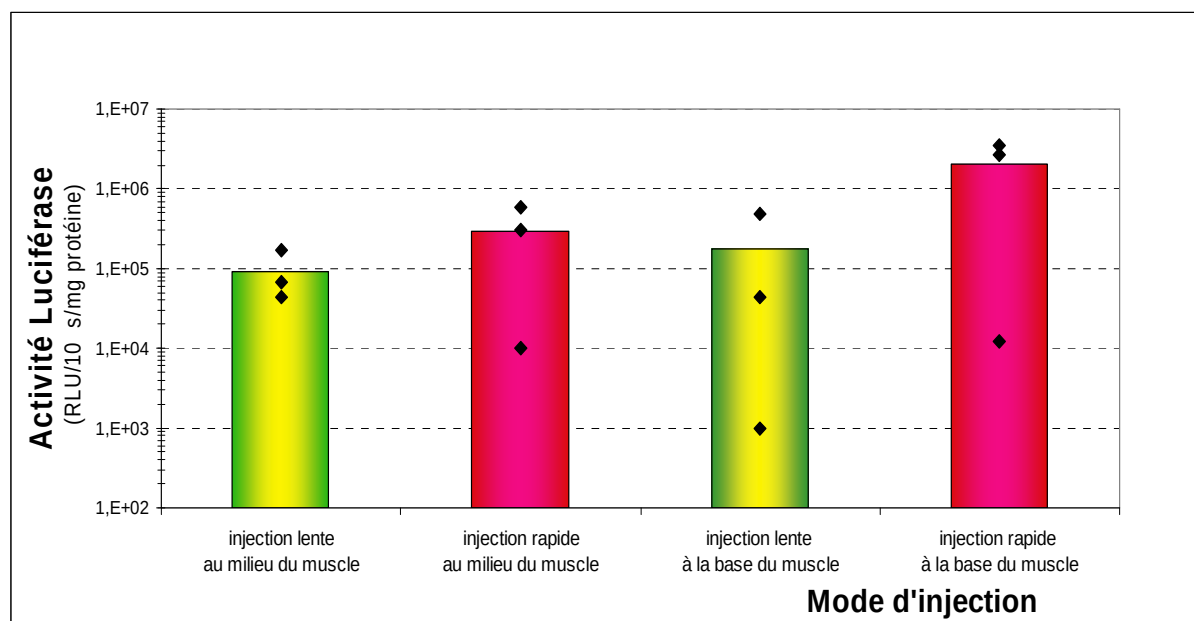


Figure 36 - Optimisation du mode d'injection avant électrotransfert

Les souris Balb/c ont été injectées dans le muscle tibialis antérieur gauche (TAG) avec 30 μ g de plasmide CMV_Luc préparé dans une solution de NaCl 150mM puis électroporé à 200V/cm (8 pls, 20 ms, 2 Hz). 7 jours après injection, les muscles (n=3, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

L'injection lente est comparée à une injection rapide, et qu'elle ait lieu au milieu du muscle ou bien à la base du muscle, côté tendon, elle est toujours moins efficace qu'une injection rapide (< 2 secondes). L'injection rapide à la base du muscle s'est révélée être la plus efficace en transfert de gène. En effet, en pratique, nous pouvons observer une augmentation du volume de la patte plus importante lorsque l'injection se fait rapidement. Cela nous fait penser qu'en injectant rapidement les 35 μ l, une augmentation de la pression hydrostatique se produirait, améliorant la pénétration de l'ADN comme déjà décrit en injectant un grand volume (correspondant à 30% du volume du tissu)

III.5.1.1 Effet de la concentration du solvant

La nature du tampon de l'ADN peut moduler l'efficacité de transfection. Ainsi, dans le cadre de l'utilisation de NaCl, il a été montré que plus la concentration en NaCl diminue plus l'efficacité de transfection augmente, jusqu'à une valeur optimale. Selon la littérature, une concentration d'à peu près la moitié de la concentration d'une solution de sérum physiologique (150 mM), permet une efficacité de transfection 3 fois plus forte qu'avec une solution saline classique (153). Aussi, nous avons comparé l'efficacité de transfection d'un ADN dilué dans du NaCl à 75 mM à celui dilué dans du NaCl 150 mM à la suite d'une injection dans le *tibialis* antérieur de souris Balb/c suivie d'un électrotransfert (200 V/cm, 20 ms, 2 Hz, 8 pls).

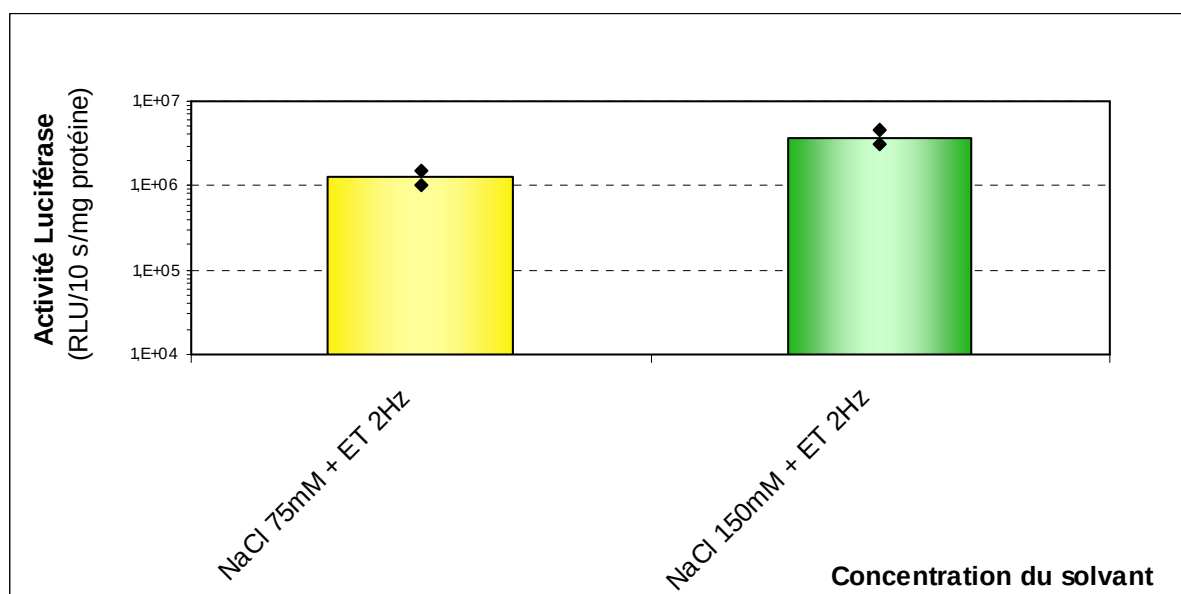


Figure 37 - Optimisation de la concentration de NaCl pour l'électrotransfert

Les souris Balb/c ont été injectées dans le muscle tibialis antérieur gauche (TAG) avec 30 µg de plasmide CMV_Luc préparé dans une solution de NaCl 150mM (ADN nu) et NaCl 75 mM puis électroporé à 200 V/cm (8 pls, 20 ms, 2 Hz). 7 jours après injection, les muscles (n=2, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

Les résultats présentés ci-dessus (Figure 37, ci-dessus) ne sont pas en accord avec la littérature. En effet, l'efficacité de transfection avec la solution de NaCl 75 mM est 4 fois moins efficace que quand l'ADN est dilué dans du NaCl 150 mM. A noter

cependant que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois avec un nombre d'animaux faibles. Malgré tout, au vu de ces résultats, nous avons choisi de continuer nos expériences avec 150 mM en NaCl.

III.5.1.2 Nombre d'impulsions

D'une façon générale, une variation du nombre des impulsions conduit à une variation de la perméabilisation cellulaire. Il a été décrit qu'une augmentation du nombre d'impulsions permettait une augmentation de la perméabilisation (154) et ainsi de l'efficacité de transfection.

Nous avons étudié 2 conditions différentes : 6 et 8 impulsions.

La Figure 38 illustre les résultats de cette mise au point.

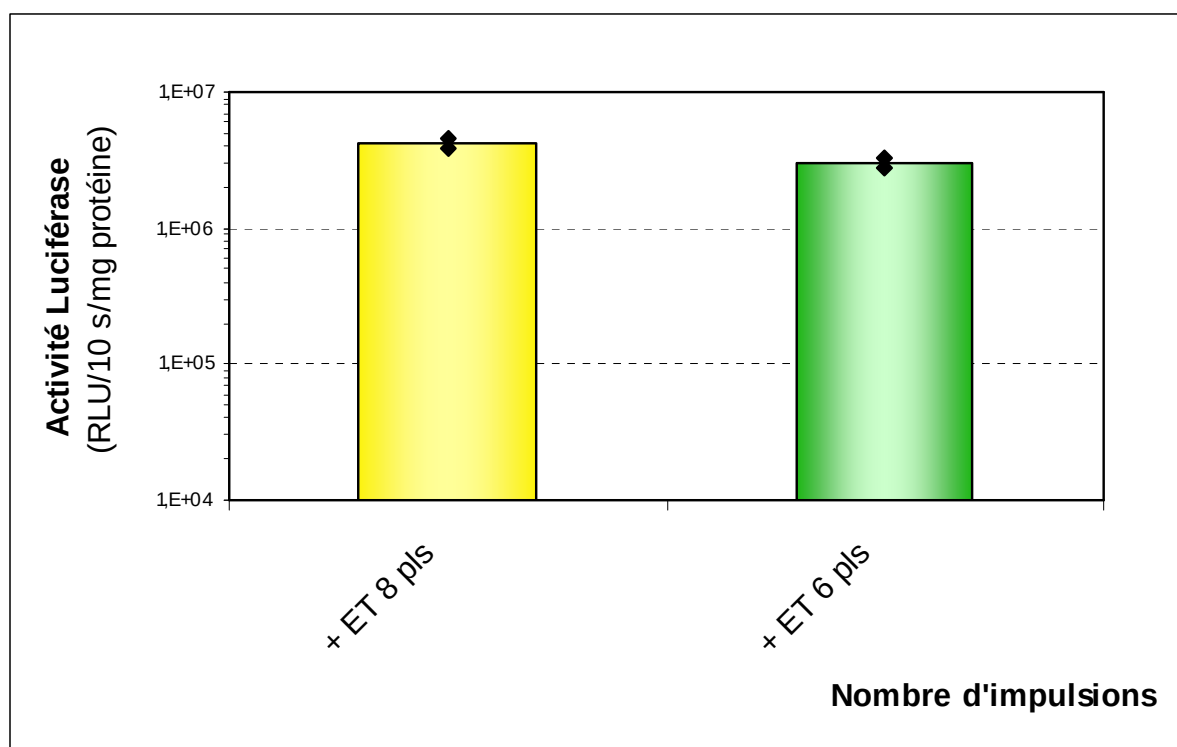


Figure 38 - Optimisation du nombre d'impulsions en électrotransfert

Les souris Balb/c ont été injectées dans le muscle tibialis antérieur gauche (TAG) avec 30 µg de plasmide CMV_Luc préparé dans une solution de NaCl 150 mM puis électroporé à 200V/cm, 20 ms, 2 Hz. 7 jours après injection, les muscles (n=2, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

Nos résultats montrent une très légère augmentation de l'efficacité de transfection lorsque la patte injectée de la souris est soumise à 8 impulsions plutôt qu'à 6, mais cela n'est pas statistiquement significatif.

III.5.1.3 Voltage

Des groupes de 3 souris ont chacun reçus un voltage croissant dans le muscle *tibialis* antérieur. Les résultats présentés (Figure 39, ci-dessous) nous montrent qu'en fonction du voltage utilisé, l'efficacité de transfection est de 10 à 100 fois supérieure à celle obtenue après injection d'ADN nu.

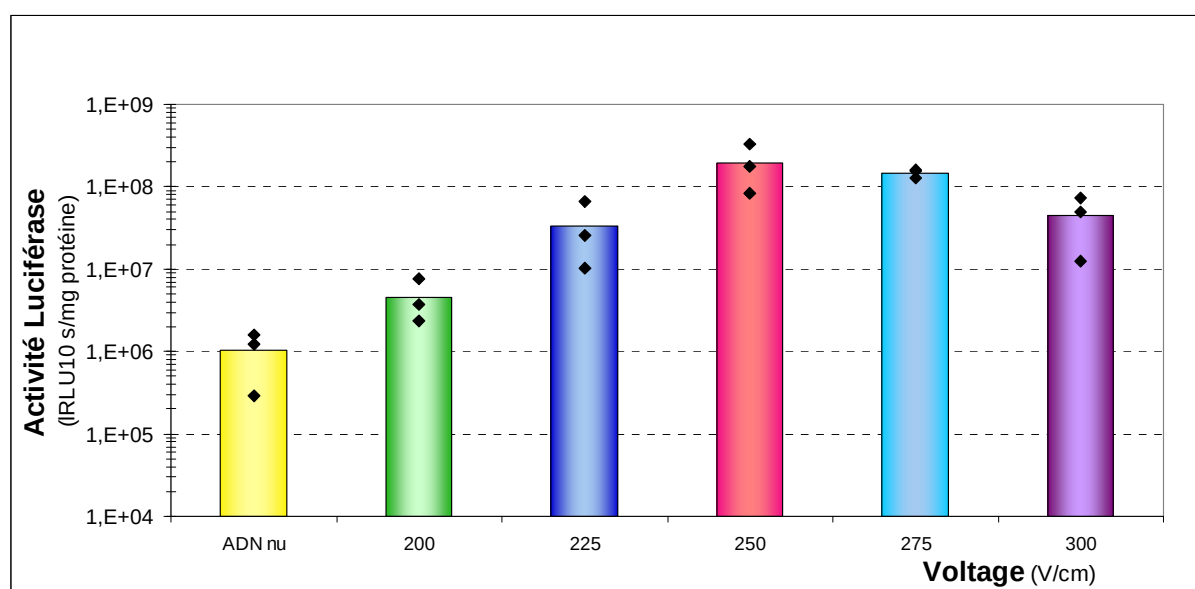


Figure 39 - Optimisation du voltage en électrotransfert

Les souris Balb/c ont été injectées dans le muscle tibialis antérieur gauche (TAG) avec 30 µg de plasmide CMV_Luc préparé dans une solution de NaCl 150 mM puis électroporé en faisant varier le voltage entre 200 et 300 V/cm (8 pls, 20 ms, 2 Hz). 7 jours après injection, les muscles (n=3, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

Le voltage 250 V/cm permet d'obtenir la meilleure efficacité de transfection. Notons aussi qu'un voltage supérieur à 250 V/cm dans le *tibialis* antérieur génère une efficacité moindre tout en augmentant les dommages tissulaires. Malheureusement, cette expérience venant après les autres dans le temps, révèle que le voltage utilisé dans nos expérimentations (à savoir 200 V/cm) n'était pas le voltage optimal.

III.5.1.4 Action des promoteurs sur l'efficacité de transfection par la technique d'électrotransfert

Nous avons voulu compléter nos analyses avec l'étude de l'effet du promoteur sur l'efficacité de transfert de gènes en utilisant la technique d'électrotransfert. Pour cela, nous avons utilisé quatre constructions dans lesquelles le gène de la phosphatase alcaline murine est sous le contrôle du promoteur du cytomégalovirus humain CMV, du du promoteur synthétique muscle spécifique C5-12 ⁽¹⁴⁷⁾, du promoteur muscle spécifique de la créatine kinase MCK et du promoteur de la desmine.

Les muscles injectés ont été prélevés 7 jours après l'injection et le niveau d'expression de l'alcaline phosphatase circulante a été mesuré avant injection et à J7.

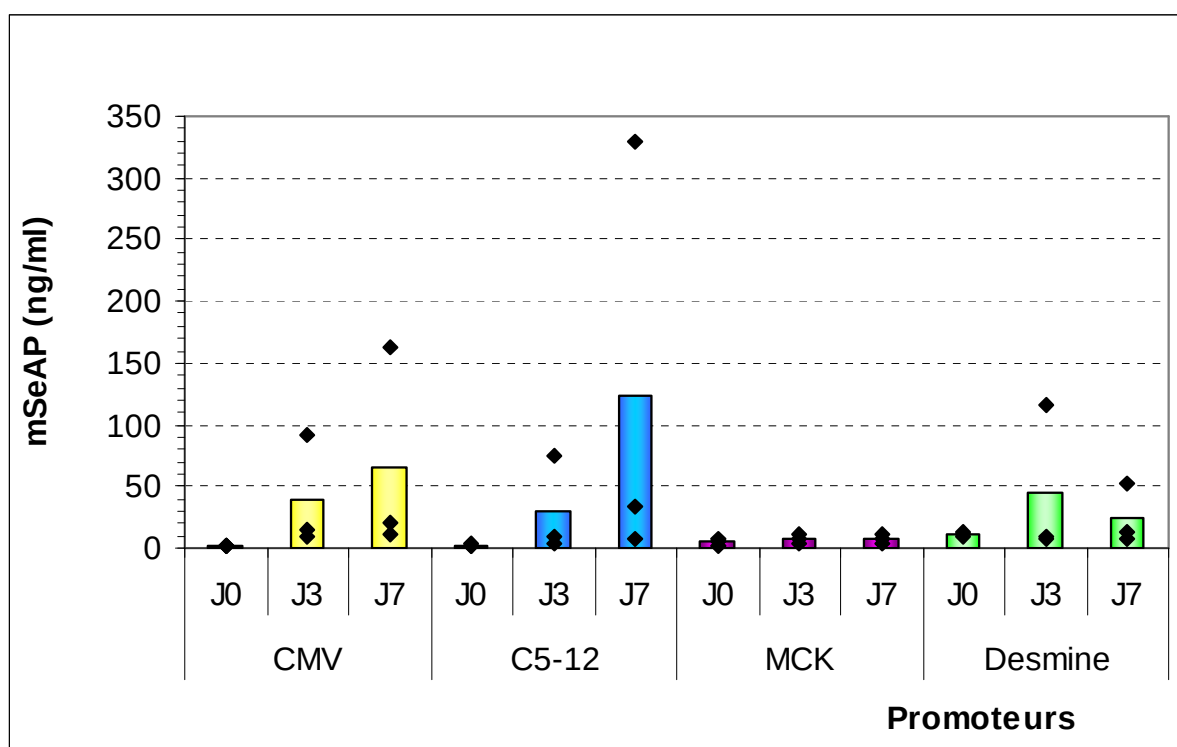


Figure 40 - Effet du promoteur sur l'efficacité de transfection par ET

20 µg de plasmide codant pour la mSeAP sous le contrôle des promoteurs CMV, C5-12, MCK et Desmine respectivement, ont été préparé dans du NaCl 150 mM. Un électrotransfert à 200 V/cm, 20 ms, 2 Hz, 8 pls a été pratiqué suite à l'injection. Des prélèvements sanguins ont été prélevés avant l'injection (J0) et 7 jours après l'injection (J7) et le niveau de mSeAP a été mesuré. Les histogrammes représentent les activités moyennes de phosphatase alcaline en ng/mL.

La mesure de la concentration de mSeAP à J0 nous permet d'évaluer l'augmentation du niveau de cette enzyme suite à l'injection. Les résultats indiquent que les constructions contenant les promoteurs CMV et C5-12 donnent les efficacités les plus élevées.

III.1.6. Conclusions

Compte-tenu des nombreux obstacles qui se sont présentés à nous à cause de la défaillance du matériel, nous avons dû abandonner tous les résultats obtenus avec l'électroporateur précédant le BTX. Aussi, nous avons dû refaire toute une série d'expériences afin de vérifier le fonctionnement du nouvel appareil et de le calibrer.

Pour cela, nous avons essayé de reproduire les résultats rapportés dans la littérature. Les résultats présentés ci-dessus résument les expérimentations menées. Cependant, le gain observé, y compris avec le nouveau générateur et les nouvelles plaques, n'était pas du niveau de ceux publiés. En effet, nous avons à peine obtenu un facteur 10 avec le gène rapporteur codant pour la luciférase, en utilisant les paramètres suivants : 200 V/cm, 8 pls, 20 ms, 2 Hz alors que la littérature décrit un gain de 100, voire 1000 fois, supérieur à celui de l'ADN nu.

De plus, les dommages tissulaires observés se sont révélés importants, ce qui n'est pas recommandé dans le cadre d'approches pour des pathologies comme la DMD.

Aussi avons-nous réorienté notre sujet de thèse à la suite de ces observations : au lieu de nous focaliser sur des approches thérapeutiques sur la souris mdx (approche microdystrophine, saut d'exon avec U7, etc...) en utilisant la technique d'électrotransfert, nous avons décidé de nous consacrer à l'étude des nouveaux systèmes de vectorisation non virale.

III.2. Etude de l'efficacité de transfection de poloxamères

III.2.1. Introduction

Dans le contexte de transfert de gène *in vivo*, il est indispensable de disposer d'un système de vectorisation efficace. Après avoir étudié dans une première partie la

capacité de transfection suite à un électrotransfert, nous nous sommes penchés sur l'étude de copolymères amphiphiles multi-blocs.

III.2.2. Contexte

Les poloxamères sont des molécules amphiphiles formées de l'assemblage de motifs d'oxyde de polyéthylène (POE) et d'oxyde de polypropylène (PPO). Il existe une large variété de copolymères tri-blocs POE-PPO-POE qui sont commercialement disponibles et qui varient entre eux par leur poids moléculaire et/ou par la taille des blocs POE ou PPO. En fait, il existe 2 familles de copolymères : les polymères tri-blocs linéaires Pluronic (POE-PPO-POE) et les copolymères branchés à quatre bras (Tetronic). Chacune de ces deux familles existe également avec l'arrangement inverse : PPO-POE-PPO (Pluronic Reverse et Tetronic Reverse).

La structure des polymères que nous avons utilisés dans nos travaux de recherche est représentée dans la figure suivante (Figure 41, ci-dessous)

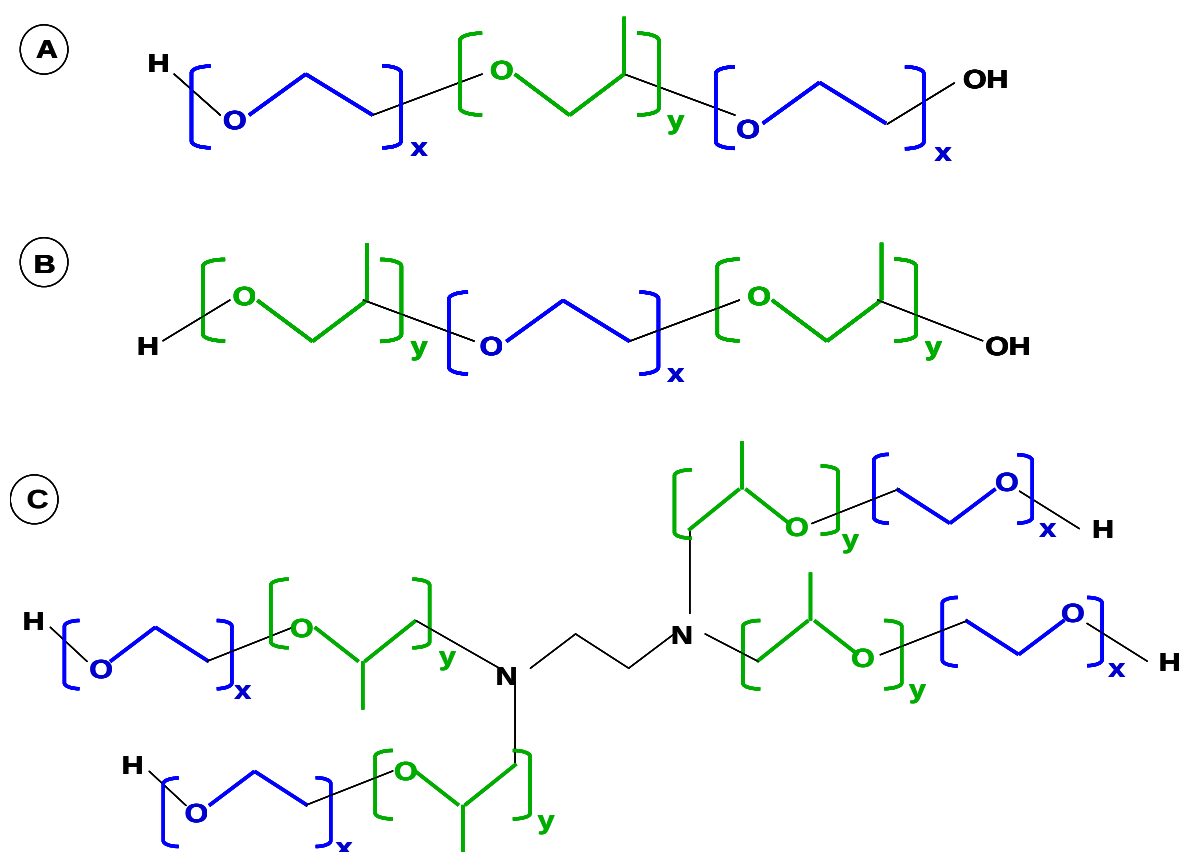


Fig. A. Pluronic, **Fig. B.** Pluronic Reverse, **Fig. C.** Tetronic
Avec en vert, blocs hydrophobes et en bleu, blocs hydrophiles

Figure 41 - Représentation schématique des différentes structures de copolymères tri-blocs

Nous avons regroupé les caractéristiques des différents copolymères que nous avons utilisés dans nos travaux (Tableau 3, ci-dessous). La première colonne représente la répartition des blocs EO (oxyde de polyéthylène) et des blocs PO (oxyde de polypropylène). La nomenclature de ces polymères provient de la base BASF.

(<http://www.2basf.us/performancechemical/bcperfnomenclature.html>)

Structure	Famille	Nomenclature	MW	% EO (en masse)
(EO)13-(PO)30-(EO)13	Pluronic	L64	2900	40
(EO)19-(PO)30-(EO)19	Pluronic	L65	3400	50
(EO)26-(PO)40-(EO)26	Pluronic	P85	4600	50
(EO)23-(PO)52-(EO)23	Pluronic	P104	5000	40
(EO)20-(PO)70-(EO)20	Pluronic	P123	5800	30
(EO)34-(PO)52-(EO)34	Pluronic	P105	6000	50
(EO)75-(PO)30-(EO)75	Pluronic	F68	8400	80
(EO)95-(PO)65-(EO)95	Pluronic	F127	12000	70
(PO)21-(EO)14-(PO)21	Pluronic Reverse	25R2	3100	20
(PO)19-(EO)33-(PO)19	Pluronic Reverse	25R4	3600	40
(EO)7-(PO)8-N---N-(PO)8-(EO)7	Tetronic	T304	1650	40
(EO)120-(PO)38-N---N-(PO)38-(EO)120	Tetronic	T1107	15000	70
(EO)227-(PO)43-N---N-(PO)43-(EO)227	Tetronic	T908	25000	80

Tableau 3 - Liste et structure des polymères utilisés dans nos travaux

Dans un premier temps, nous avons sélectionné cinq poloxamères (Pluronic) que nous avons étudié pour leurs capacités de transfection *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus sont présentés ci-après.

Puis, nous avons étudié une autre série constituée de poloxamères, de poloxamères réverses ainsi que de Tetronic.

III.2.3. Etude de l'efficacité de transfection de 5 poloxamères

Voici les 5 poloxamères de la famille Pluronic que nous avons choisis afin de tester l'influence du pourcentage EO et de la masse moléculaire (MW) sur la transfection.

Nous les avons regroupés dans le tableau suivant : (Tableau 4, ci-dessous)

A

Structure	Famille	Nomenclature	MW	% EO (en masse)
(EO)13-(PO)30-(EO)13	Pluronic	L64	2900	40
(EO)23-(PO)52-(EO)23	Pluronic	P104	5000	40
(EO)20-(PO)70-(EO)20	Pluronic	P123	5800	30
(EO)34-(PO)52-(EO)34	Pluronic	P105	6000	50
(EO)95-(PO)65-(EO)95	Pluronic	F127	12000	70

B

Structure	Famille	Nomenclature	MW	% EO (en masse)
(EO)20-(PO)70-(EO)20	Pluronic	P123	5800	30
(EO)13-(PO)30-(EO)13	Pluronic	L64	2900	40
(EO)23-(PO)52-(EO)23	Pluronic	P104	5000	40
(EO)34-(PO)52-(EO)34	Pluronic	P105	6000	50
(EO)95-(PO)65-(EO)95	Pluronic	F127	12000	70

Tableau 4 - Les 5 poloxamères étudiés

Les tableaux 5A et 5B représentent les 5 poloxamères utilisés dans la suite des travaux. La masse moléculaire (5A) et le % d'EO (5B) ont été classés par ordre croissant afin de faciliter la lecture

III.3.2.1 Evaluation de l'efficacité des poloxamères à « complexer » l'ADN plasmidique

Afin de voir si les copolymères amphiphiles étaient capables d'interagir avec l'ADN, nous avons réalisé des gels retards. Lorsque l'ADN se retrouve compacté par un produit, il subit un changement de charge et de taille, caractérisé sur le gel d'électrophorèse par un retard de migration. Pour réaliser cette étude, nous avons mélangé une quantité croissante de poloxamères (de 0,01 à 1% w/v) avec une

quantité fixe d'ADN (1 μ g). La Figure 42 ci-dessous présente le gel retard obtenu avec les poloxamères L64, P104, P123, P105 et F127.

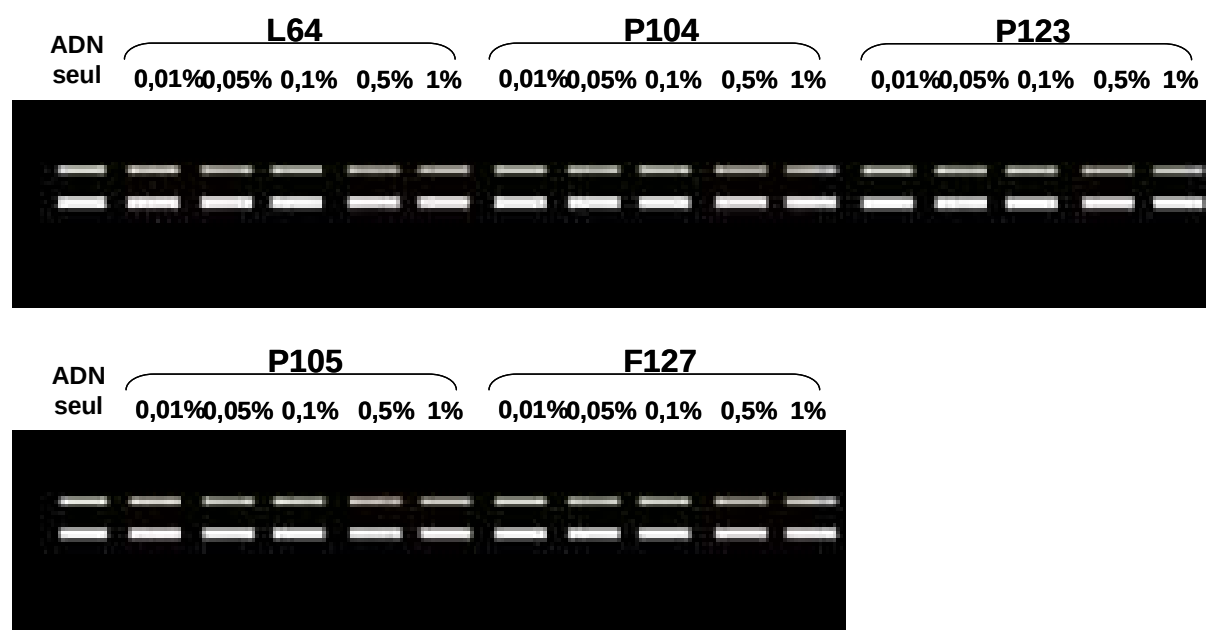


Figure 42 - Profil électrophorétique des "complexes" ADN/Poloxamères

L'efficacité de complexation de 1 μ g d'ADN plasmidique est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les « complexes » ADN/Poloxamères sont préparés à différentes concentrations (de 0,01% à 1% w/v par μ g d'ADN). Le premier puits est l'ADN en absence de poloxamère (les deux bandes observées sont les formes relâchée et surenroulée du plasmide en haut et en bas respectivement).

Les résultats montrent qu'aucun des poloxamères n'est capable de retarder la migration de l'ADN, et ce, quelle que soit la concentration testée.

III.3.2.2 Evaluation de l'efficacité de transfection

Bien que ne complexant pas l'ADN nous avons choisi de réaliser des expériences de transfection in vitro car on ne peut pas exclure que les copolymères puissent favoriser l'entrée de l'ADN dans les cellules sans pour autant interagir avec le plasmide. Pour cela, nous avons évalué l'efficacité de transfection des différents composés sur la lignée cellulaire d'hépatocytes humains HepG2.

Le protocole de transfection utilisé consiste en la préparation des « complexes » transfectants en incubant chaque poloxamère en quantité croissante (de 0,01 à 1% p/v) avec une quantité fixe de plasmide codant la luciférase pSMD2-Luc Δ ITR (2

µg/puits) dans une solution NaCl 150 mM ou Tyrode. Il a été récemment décrit qu'une formulation ADN avec le polymère (EO)₇₅-(PO)₃₀-(EO)₇₅ dans du Tyrode (NaCl 140mM, KCl 6mM, CaCl₂ 3mM, MgCl₂ 2mM, Hepes 10mM, Glucose 10mM, pH 7,4) permettait d'obtenir une meilleure activité luciférase dans le muscle par rapport à celle obtenue avec une solution saline classique (155). Aussi, nous avons voulu comparé l'efficacité de transfection des poloxamères dans du NaCl ou du Tyrode.

Après dilution des complexes dans du milieu de culture, ceux-ci sont ajoutés sur les cellules. 30 heures après le début de l'expérience, les cellules sont lysées et l'activité luciférase (Relative light unit/10 s) et la quantité de protéines sont mesurées. Les efficacités de transfection présentées correspondent aux activités luciférase des lysats normalisés par leurs quantités de protéines (unité : RLU/10 s/mg protéine).

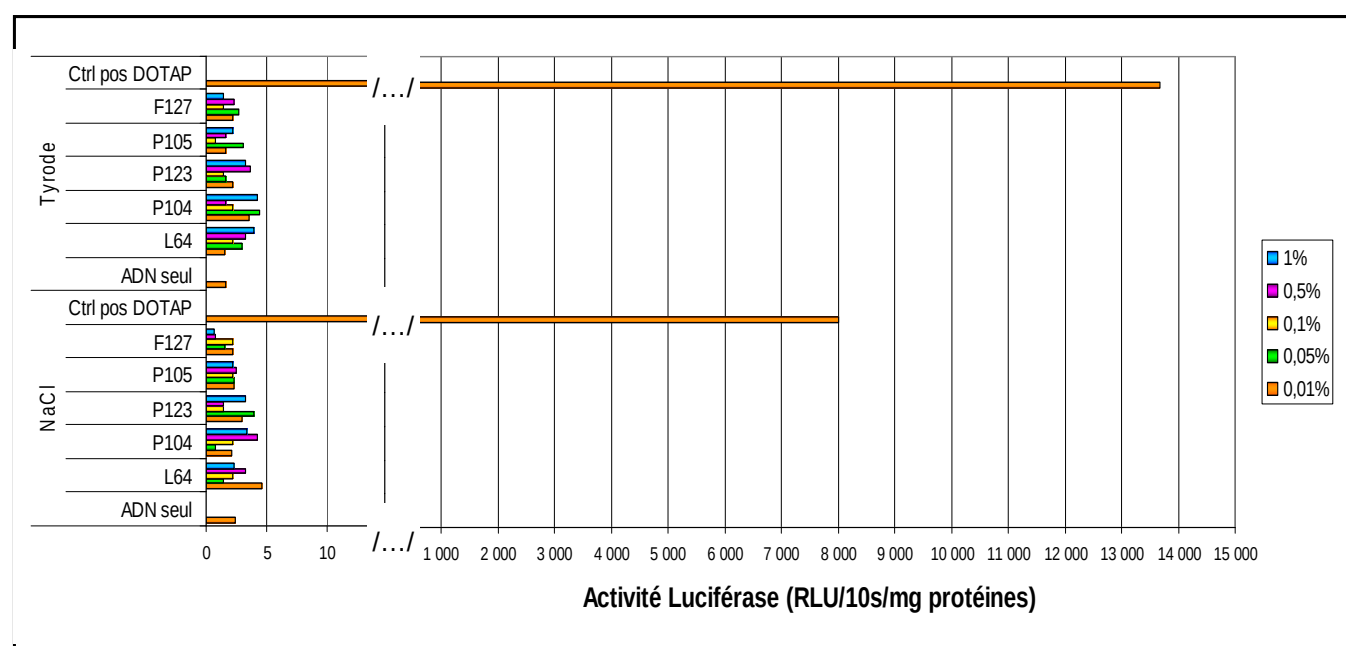


Figure 43 - Evaluation de l'efficacité de transfection in vitro des poloxamères

Les cellules HepG2 ont été transfectées en duplicat par le plasmide SMD₂-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits). 30 heures après transfection les cellules sont lysées puis testées pour leur activité luciférase. L'histogramme présente les activités des différents polymères. L'efficacité de transfection obtenue avec les quantités testées de chaque polymère est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine). Le DOTAP a été utilisé à sa concentration optimale en tant que témoin positif

L'efficacité des poloxamères a été comparée à celle d'un agent transfectant commercialisé, le DOTAP, qui est utilisé comme témoin positif. Le niveau d'expression de la luciférase 30h après transfection indique qu'aucun des poloxamères n'est capable d'améliorer l'efficacité de transfert de gènes *in vitro* (Figure 43, ci-dessus).

Conclusion :

Si l'on tient compte des résultats d'analyse des gels retards et des transfections *in vitro*, ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par d'autres équipes. En effet, une étude conduite avec L64 n'a pas pu démontrer une interaction entre le polymère et l'ADN par gel d'électrophorèse, ni une amélioration de l'efficacité de transfection *in vitro* (102). L'absence d'interactions entre L64 et l'ADN a été confirmée par une étude récente menée par Gau-Racine et al. utilisant différentes techniques (156).

III.3.2.3 Le transfert de gène *in vivo* avec P105

Nous avons commencé nos études de transfert de gènes *in vivo* avec le poloxamère P105. Pour cela, 10 µg d'ADN plasmidique codant pour le gène de la luciférase ont été mélangés avec des concentrations croissantes de poloxamères puis injectés dans le *tibialis* antérieur de souris Balb/c. Les muscles ont été prélevés 7 jours après l'injection, et l'activité luciférase a été mesurée. Les résultats sont présentés dans la figure ci-après (Figure 44, ci-dessous)

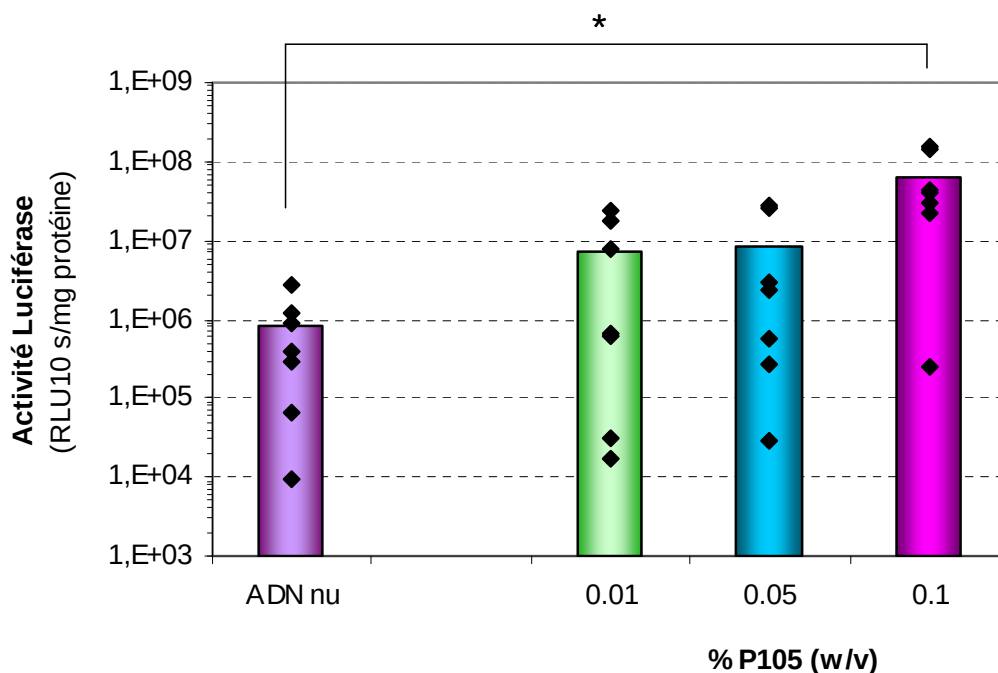


Figure 44 - Evaluation de l'efficacité de transfection d'une gamme de P105.

10 µg de plasmide CMV_Luc ont été mélangés avec des quantités croissantes de poloxamère P105 préparées dans une solution de NaCl 150 mM. 35 µl de solution ont été lentement injectés dans les muscles *tibialis* antérieurs. 7 jours après injection, les muscles (n=7, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les concentrations suivantes ont été testées : 0,01%, 0,05% et 0,1% (p/v). Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues avec la gamme de P105. L'efficacité de transfection obtenue est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine). L'injection d'ADN nu a été utilisée comme point de référence et de comparaison.

Chaque losange représente un muscle (n=7) et la barre indique l'activité luciférase moyenne pour chaque condition. La première colonne représente l'efficacité de transfection de l'ADN nu. Les colonnes de droite représentent respectivement celle du poloxamère P105 aux concentrations 0,01% ; 0,05% et 0,1%. Les résultats montrent que l'addition de poloxamère P105 augmente significativement le niveau d'expression de la luciférase comparé à l'ADN nu (test de Student, *p<0,05). Toutefois, nous pouvons observer que comme l'ADN nu, l'efficacité de transfection du poloxamère P105 présente une large variabilité dans les résultats.

A la concentration optimale, c'est à dire 0,1% (p/v), l'efficacité de transfection est 75 fois supérieure à celle obtenue avec l'ADN nu. Nous avons également voulu tester

une concentration supérieure à 0,1% afin de vérifier que nous avons atteint le plateau d'activité.

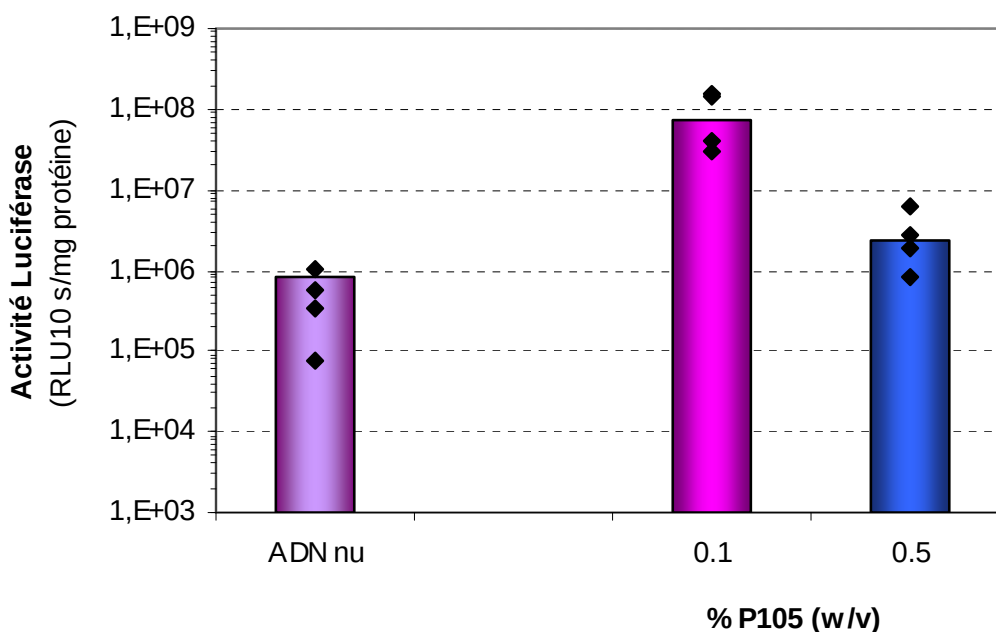


Figure 45 – Comparaison de l'efficacité de 0,1% P105 et 0,5% P105

Les souris Balb/c ont été injectées avec les complexes ADN/P105 préparés dans une solution de NaCl 150 mM. 7 jours après injection, les muscles (n=4, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues avec 0,1% P105 et 0,5% P105. L'efficacité de transfection est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10s/mg protéine). L'injection d'ADN nu a été utilisée comme point de référence et de comparaison.

Comme le montre la figure ci-dessus, une concentration de 0,5% donne de moins bons résultats que P105 à 0,1% (Figure 45, ci-dessus). En effet, l'efficacité obtenue avec le P105 à 0,5% est 35 fois inférieure à celle du P105 à 0,1%. Par conséquent, nous avons décidé de poursuivre notre étude sur l'efficacité du P105 dans le transfert de gène en l'utilisant à la concentration optimale, c'est-à-dire 0,1%.

III.3.2.4 Evaluation de P105 avec différents promoteurs

Il été décrit que l'activité de transfert de gène du poloxamère P85 est promoteur-dépendante (104). Afin de vérifier si cela était aussi le cas pour P105, nous avons utilisé trois autres constructions dans lesquelles le gène de la luciférase est sous le

contrôle du facteur humain d'élongation EF1-alpha, du promoteur synthétique muscle spécifique C5-12 (147), et du promoteur viral SV40. Sept jours après l'injection d'ADN +/- 0,1% P105, l'activité luciférase dans les muscles injectés a été mesurée. Les résultats sont présentés dans la figure suivante (Figure 46, ci-dessous)

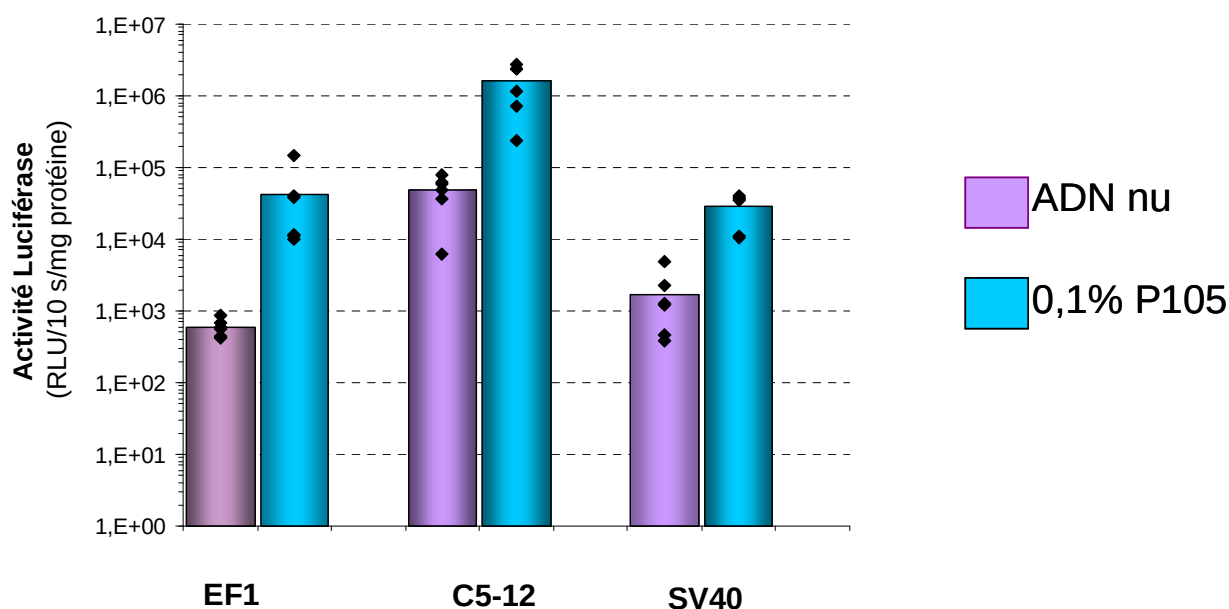


Figure 46 - Comparaison de l'efficacité de transfection de P105 en fonction du promoteur
 10 µg de chaque plasmide EF1_Luc, C5-12_Luc et SV40_Luc préparés dans une solution de NaCl 150 mM ont été injectés seuls ou complexés au poloxamère P105 à la concentration 0,1%. 7 jours après injection, les muscles (n=6, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues avec 0,1% P105 et 0,5% P105. L'efficacité de transfection est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10s/mg protéine).

Les histogrammes en violet représentent l'activité luciférase suite à l'injection d'ADN nu et les histogrammes en bleu représentent celles des « complexes » ADN/0,1% P105. Les résultats indiquent que le poloxamère P105 est capable d'augmenter le niveau d'expression de la luciférase avec les trois constructions.

Cependant, nous pouvons observer des différences entre les promoteurs : l'augmentation de l'efficacité médiée par le P105 est moindre avec la construction contenant le promoteur viral SV40. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui rapporte qu'avec le poloxamère P85, l'efficacité était moindre qu'avec une construction contenant un promoteur CMV (104). Ces résultats seront discutés plus en détails par la suite.

III.3.2.5 Effet de la composition de la solution saline sur l'efficacité de transfection

Il est connu que la concentration en sel du plasmide peut affecter l'efficacité de transfection dans le muscle. Par exemple, il a été montré par J. Hartikka et al.⁽¹⁵⁷⁾ que du plasmide dilué dans 150 mM de sodium phosphate (NaP) donnait des niveaux d'expression de gènes rapporteurs de 2 à 7 plus élevés que si le plasmide est dilué dans du NaCl ou du PBS. Il a été également récemment décrit qu'une formulation ADN avec le polymère (EO)₇₅-(PO)₃₀-(EO)₇₅ dans du Tyrode (NaCl 140 mM, KCl 6 mM, CaCl₂ 3 mM, MgCl₂ 2 mM, Hepes 10 mM, Glucose 10 mM, pH 7,4) permettait d'obtenir une meilleure activité luciférase dans le muscle par rapport à celle obtenue avec une solution saline classique ⁽¹⁵⁵⁾. Nous avons donc voulu savoir s'il était possible d'améliorer les performances de P105 (ou d'ADN nu) en utilisant du Tyrode ou du NaP à 150 mM.

Nos résultats sont présentés dans la Figure 47.

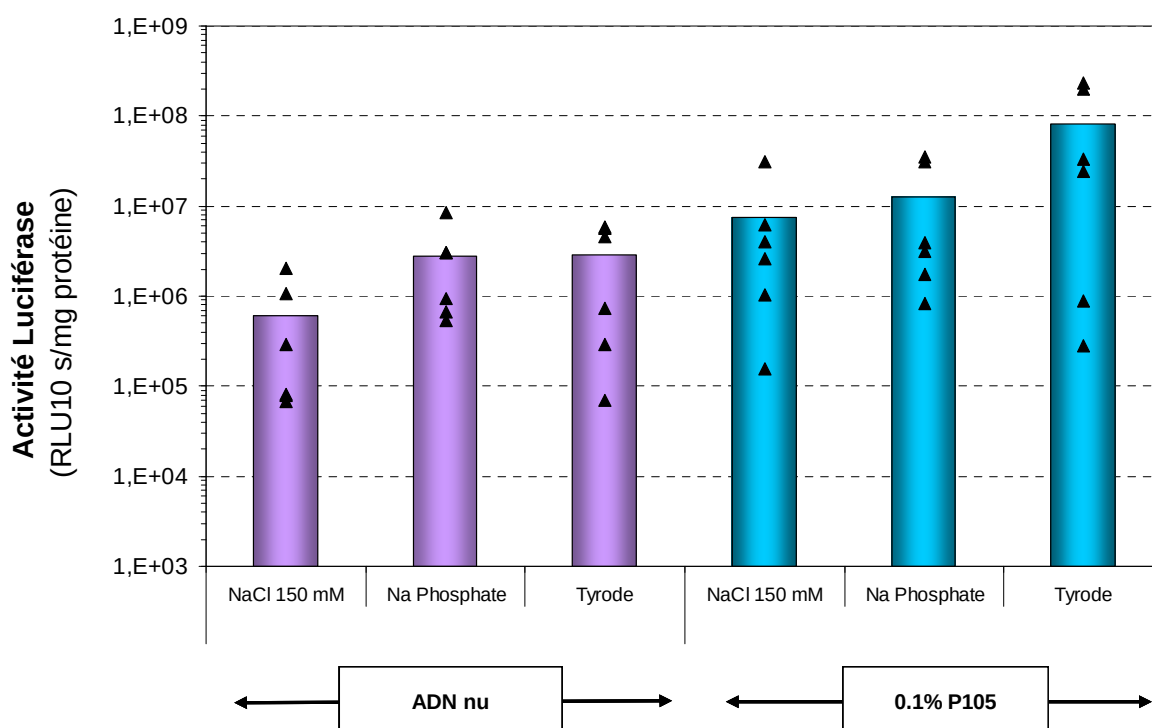


Figure 47 - Effet du solvant sur l'efficacité de transfection

10 µg de CMV-Luc/0.1% P105 ont été préparés respectivement dans une solution de NaCl 150 mM ou de Tyrode. 7 jours après injection, les muscles (n=6, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues avec l'ADN nu et 0,1% P105. L'efficacité de transfection est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

Effet du solvant sur l'efficacité de transfection de l'ADN nu :

Les efficacités de transfection de l'ADN préparé dans les tampons sodium phosphate et Tyrode sont comparables et permettent d'augmenter en moyenne d'un facteur 5 le niveau d'expression du gène rapporteur.

Effet du solvant sur l'efficacité de transfection du complexe ADN / 0,1% P105 :

L'efficacité de transfection du P105 formulé dans du tampon sodium phosphate est comparable à celle obtenue lorsque celui-ci est formulé dans du NaCl 150 mM. Par contre, l'analyse de nos résultats indique qu'une formulation dans du Tyrode permet d'augmenter en moyenne d'un facteur 10 le niveau d'expression du gène rapporteur dans les transfections *in vivo* médiées par P105.

III.3.2.6 Transfert de gènes avec les gènes rapporteurs LacZ et mSeAP

Au vu des résultats obtenus avec le gène codant pour la luciférase, nous avons voulu compléter nos analyses avec d'autres gènes rapporteurs. Nous avons commencé avec le gène LacZ codant pour la β -galactosidase.

Pour cela, 20 μ g d'ADN plasmidique CMV_LacZ mélangé au poloxamère P105 à 0,1%, préparés dans une solution de Tyrode ont été injectés dans le *tibialis* antérieur de souris Balb/C. Les souris ont été sacrifiées cinq jours après l'injection et les muscles ont été prélevés. Des coupes musculaires transversales ont été réalisées à l'aide d'un cryostat et une coloration X-Gal a été effectuée afin de mettre en évidence l'activité de la β -galactosidase (Figure 48, ci-dessous)

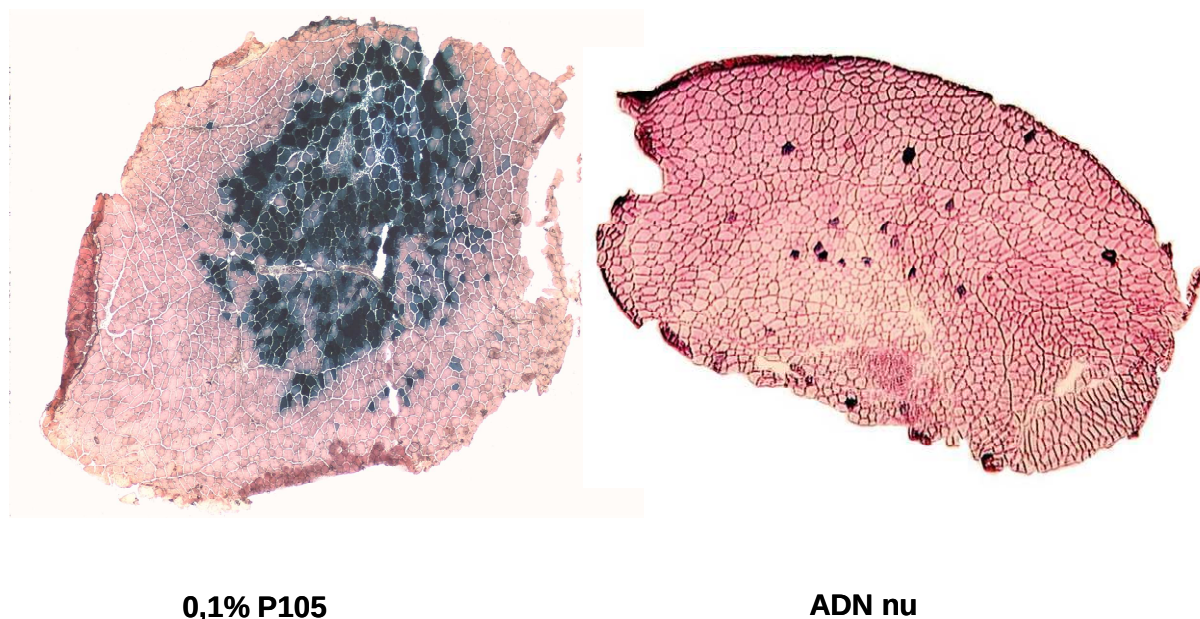


Figure 48 - Représentation de l'activité β -galactosidase sur des coupes musculaires
 Les souris Balb/c ont reçu par injection intramusculaire 20 μ g du plasmide CMV_LacZ formulé dans du NaCl 150 mM ou complexé avec 0,1% de P105 préparé dans du Tyrode. 5 jours après injection, les muscles ont été prélevés et une coloration X-Gal a été effectuée. L'efficacité de transfection est visualisée par le marquage bleu-violet mettant en évidence la présence de la β -galactosidase.

La coupe musculaire de gauche représente un TA ayant été injecté avec le plasmide CMV_LacZ en combinaison avec le P105. Les fibres musculaires exprimant la β -galactosidase apparaissent en bleu-violet. Les résultats révèlent qu'environ 30% des fibres musculaires expriment ce transgène. Ce pourcentage est significativement supérieur aux résultats obtenus en injectant l'ADN nu formulé dans une solution de NaCl 150mM (photo de droite). A noter que l'état du muscle ne semble pas affecté par le poloxamère, comme observé dans les analyses histologiques.

Après avoir étudié l'effet du P105 sur l'expression de la β -galactosidase, nous avons réalisé un protocole similaire avec le gène rapporteur codant pour l'enzyme phosphatase alcaline murine mSeAP (158). Ce gène rapporteur présente plusieurs caractéristiques intéressantes : (1) lorsqu'il est injecté chez la souris, il n'y a pas de réponse immunitaire contre la protéine mSeAP, (2) la protéine est stable à haute température contrairement aux phosphatases endogènes – ce qui limite le bruit de

fond, et (3) une détection sensible et spécifique de la phosphatase alcaline sécrétée est réalisable facilement puisqu'il suffit de prélever un peu de sang.

Les muscles injectés ont été prélevés 7 jours après l'injection et le niveau d'expression de l'alcaline phosphatase circulante a été mesuré avant injection et à J7.

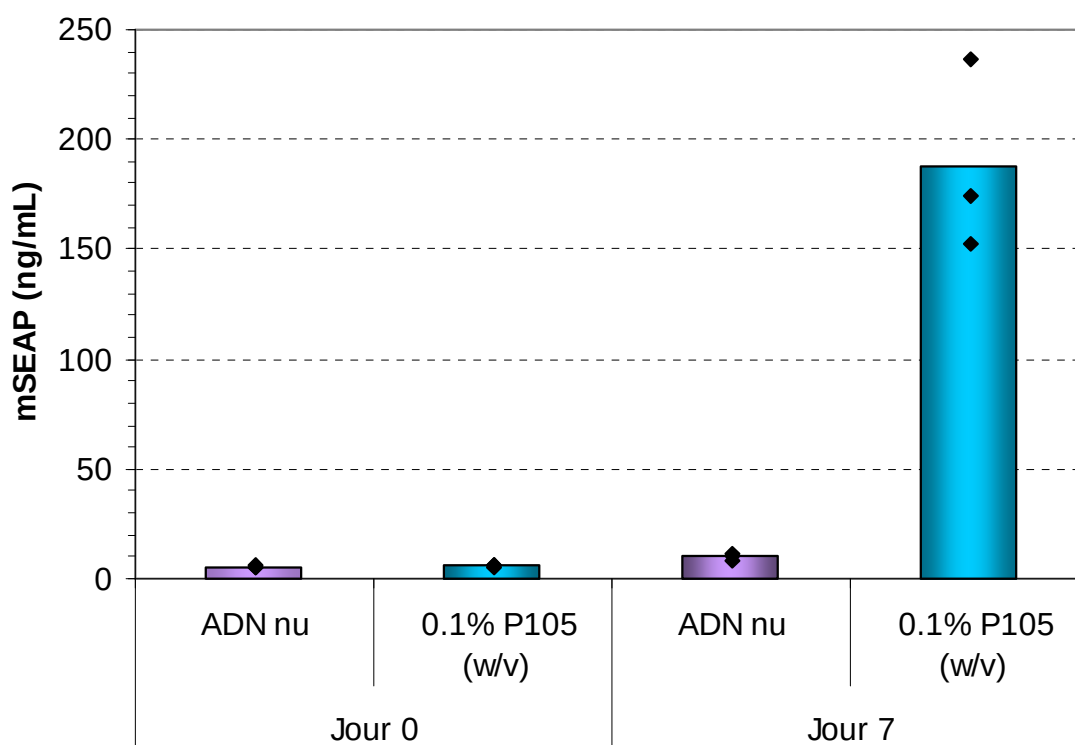


Figure 49 - Evaluation de l'efficacité de transfection du P105 avec le gène mSeAP

20 µg de plasmide codant pour la mSeAP sous le contrôle du promoteur CMV ont été préparé soit dans du NaCl 150 mM soit formulé avec 0,1% de P105 dans du Tyrode. Des prélèvements sanguins ont été prélevés avant l'injection (J0) et 7 jours après l'injection (J7) et le niveau de mSeAP a été mesuré. Les histogrammes représentent les activités moyennes de phosphatase alcaline en ng/mL. L'injection d'ADN nu a été utilisée comme point de référence et de comparaison.

La mesure de la concentration de mSeAP à J0 nous permet d'évaluer l'augmentation du niveau de cette enzyme suite à l'injection. L'utilisation du P105 (à 0,1%, formulé dans du Tyrode) permet d'augmenter le niveau d'expression de la phosphatase alcaline murine sécrétée, et ce, d'un facteur 18 par rapport aux souris traitées avec la même quantité de plasmide dilué dans du NaCl 150 mM (Figure 49, ci-dessus)

Conclusion :

Si l'on tient compte des résultats d'analyse des transfections *in vivo* avec les plasmides codant pour la β -galactosidase et la phosphatase alcaline murine sécrétée, l'utilisation du P105 à la concentration de 0,1% permet d'améliorer significativement l'efficacité de transfection *in vivo*. Aussi, nous nous sommes intéressés à d'autres poloxamères dans le but de vérifier : (1) s'ils possédaient les mêmes propriétés que le P105, (2) s'il existait une relation liant la structure du polymère avec son activité de transfection.

III.3.2.7 Evaluation *in vivo* de 4 autres poloxamères

Afin de voir s'il y avait une relation structure-activité nous avons évalué l'efficacité de transfert de gènes de 4 autres poloxamères, à savoir L64, P104, P123 et F127 (voir le **Tableau 3** pour la structure)..

Pour chaque poloxamère, une gamme de concentration allant de 0,01 à 1% a été testée comme précédemment pour le P105. Les résultats ont montré que la concentration « optimale » pour les copolymères était de 0,1% pour L64 et de 0,05% pour P104, P123 et F127 (résultats non montrés).

Ensuite, nous avons comparé les cinq poloxamères dans la même expérience pour leur capacité de transfection. 10 μ g d'ADN plasmidique CMV_luc dilué dans du NaCl 150 mM ont été injectés avec les différents poloxamères aux concentrations choisies. L'expression du gène rapporteur de la luciférase est mesurée au jour 7.

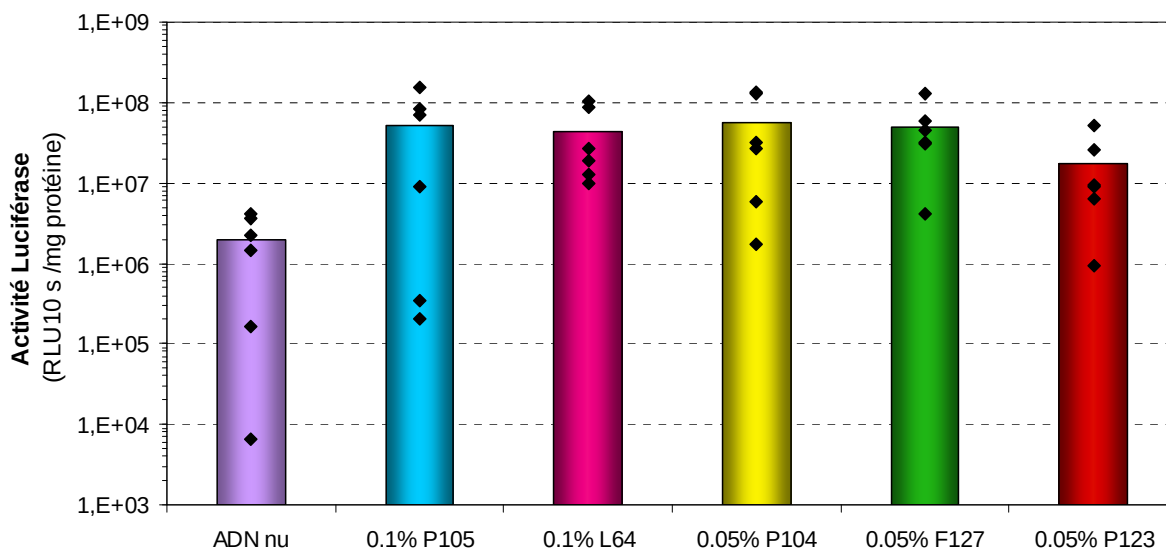


Figure 50 - Comparaison de l'efficacité de transfections de différents poloxamères

10 µg de plasmide CMV_Luc ont été mélangé avec les différents poloxamères préparés dans une solution de NaCl 150 mM aux concentrations suivantes : 0,1% pour P105 et L64, et 0,05% pour P104, F127 et P123. 35 µl de solution ont été injectés dans les muscles *tibialis* antérieurs. 7 jours après injection, les muscles (n=6, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues avec les différents poloxamères. L'efficacité de transfection obtenue est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10s/mg protéine). L'injection d'ADN nu a été utilisée comme point de référence et de comparaison.

Les efficacités de transfections sont comparées à celles obtenues avec l'ADN nu. Les P105, L64, P104 et F127 sont capables d'améliorer l'efficacité de transfection d'un facteur 50 à peu près comparé à l'ADN nu. Les résultats montrent que l'efficacité des 5 poloxamères est très similaire. Toutefois, notons que le P123 semble légèrement moins efficace que les quatre autres poloxamères car il améliore l'efficacité de transfection que d'un facteur 10.

Conclusion :

Tous les poloxamères testés diffèrent par leur masse moléculaire et par leur balance hydrophile/hydrophobe. En effet, les masses moléculaires varient entre 29 000 et 12 000 g/mol, les % EO varient de 30 à 70 % en masse.

A

Structure	Famille	Nomenclature	MW	% EO (en masse)
(EO)13-(PO)30-(EO)13	Pluronic	L64	2900	40
(EO)23-(PO)52-(EO)23	Pluronic	P104	5000	40
(EO)20-(PO)70-(EO)20	Pluronic	P123	5800	30
(EO)34-(PO)52-(EO)34	Pluronic	P105	6000	50
(EO)95-(PO)65-(EO)95	Pluronic	F127	12000	70

B

Structure	Famille	Nomenclature	MW	% EO (en masse)
(EO)20-(PO)70-(EO)20	Pluronic	P123	5800	30
(EO)13-(PO)30-(EO)13	Pluronic	L64	2900	40
(EO)23-(PO)52-(EO)23	Pluronic	P104	5000	40
(EO)34-(PO)52-(EO)34	Pluronic	P105	6000	50
(EO)95-(PO)65-(EO)95	Pluronic	F127	12000	70

Malgré ces différences de structure, l'activité de ces 5 poloxamères est comparable en transfection *in vivo*. Ces résultats indiquent qu'il y a une grande flexibilité au niveau structural pour l'activité transfectrice *in vivo*.

III.3.2.8 Evaluation de la perméabilité membranaire

Afin de déterminer s'il existait une relation entre les propriétés détergentes des polymères amphiphiles et leur activité de transfection, nous avons réalisé différentes expériences afin de caractériser les propriétés de perméabilisation membranaire des 5 copolymères.

Nous avons commencé cette étude en utilisant une méthode basée sur les propriétés de l'iodure de propidium (IP)⁽¹⁴⁹⁾. Cette molécule n'est pas capable de traverser les bicouches lipidiques, et par conséquent ne peut pas se lier à l'ADN présent dans la cellule dont la membrane plasmique est intacte. Par contre, si la membrane est perméabilisée, l'IP peut pénétrer dans la cellule et se lier à l'ADN génomique, ce qui

se traduira par l'émission d'une forte fluorescence observable au FACS (λ (excitation de l'IP) = 535 nm et λ (émission de l'IP) = 615 nm). Ces propriétés font de l'IP un bon marqueur de l'intégrité membranaire.

Des cellules HepG2 ont été incubées en présence d'IP et de concentrations croissantes (de 0,01 à 1%) de poloxamères.

Les résultats ont montré que seule une incubation aux concentrations 0,1 et 1% avec le poloxamère L64 génèrait de la fluorescence (voir Figure 51, ci-dessous).

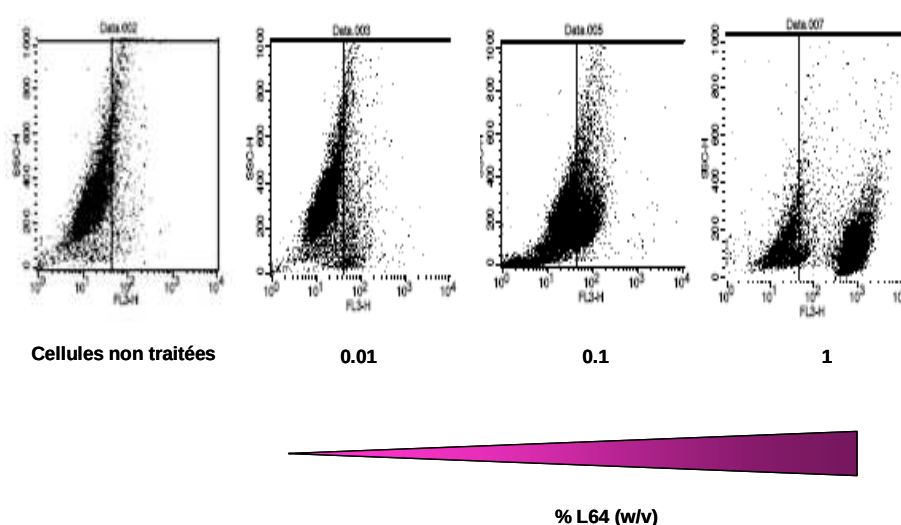


Figure 51 - Evaluation de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux

Les cellules HepG2 ont été incubées en présence d'iodure de propidium (3 μ g/ml) et de doses croissantes de poloxamère L64 (en absence d'ADN) et diluées dans du DMEM sans sérum. 2 h après l'incubation à 37°C, les cellules sont décollées de la plaque et culture et resuspendue dans du PBS. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux. Un contrôle négatif (cellules non traitées) est utilisé pour normaliser les résultats.

Les résultats indiquent que près de 40% de cellules IP sont positives quand elles ont été traitées avec le L64 à 0,1% et environ 75% avec L64 à 1%. Le pourcentage de cellules positives pour l'IP reste inférieur à 20% lorsqu'elles ont été traitées avec les 4 autres poloxamères aux mêmes concentrations (résultats non montrés).

Afin de vérifier ces résultats, nous avons réalisé un autre test qui consiste à mesurer le relargage de la lactate deshydrogénase (LDH). En effet, la lactate deshydrogénase est une enzyme exclusivement cytosolique, relativement stable, qui n'est pas capable de traverser la bicouche lipidique. Aussi, la détection d'une activité

enzymatique dans le milieu de culture cellulaire nous indique une altération membranaire. Les lignées cellulaires HepG2 et les myotubes C2C12 ont été incubés avec des quantités croissantes de poloxamères (en absence d'ADN) dans du milieu sans sérum. Après 2 h d'incubation à 37°C, l'activité de l'enzyme LDH est mesurée dans le surnageant cellulaire. Les résultats présentés dans la Figure 52 représentent les pourcentages de relargage de LDH avec les cellules HepG2.

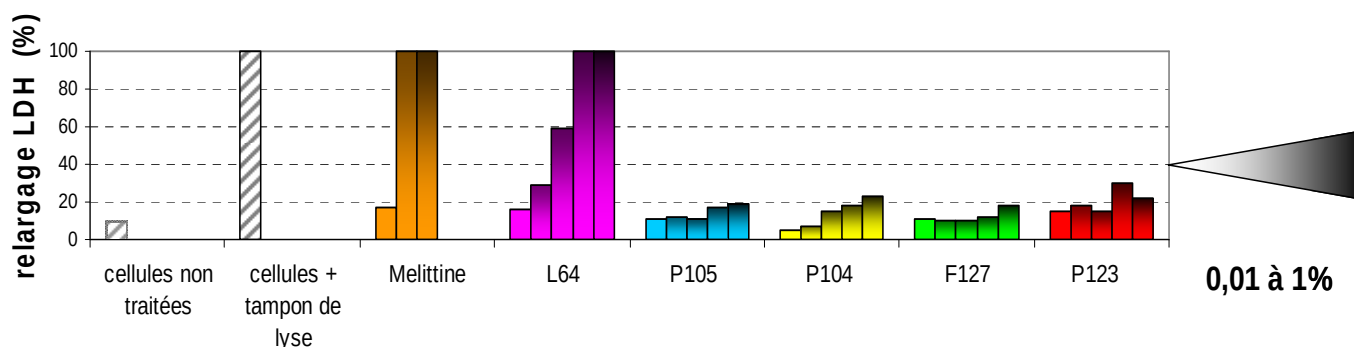


Figure 52 - Test de perméabilité membranaire sur des cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été incubées en présence de quantités croissantes de copolymères (0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1%) dilués dans du milieu sans sérum et incubés à 37°C. 2H après l'incubation, un aliquot du surnageant est prélevé et l'activité LDH est mesurée. Le puits cellules non traitées sert de contrôle négatif et les cellules traitées au tampon de lyse et à la melittine (1 μ M, 10 μ M et 20 μ M) sont les témoins positifs.

Le contrôle cellules non traitées ne donne que 10% de LDH. Un traitement avec le tampon de lyse ou la melittine donne 100% de LDH et sont nos contrôles positifs. La melittine est un polypeptide extrait du venin d'abeille qui est bien connue pour avoir une forte activité hémolytique. Nous avons utilisé la melittine à 1, 10 et 20 μ M.

Tous les poloxamères, excepté le L64, donnent un pourcentage de relargage LDH inférieur à 20% en moyenne. Le L64 relargue plus de 20% de LDH à partir de la concentration 0,05% (w/v). L'analyse des résultats nous permet de conclure qu'aucun des poloxamères, excepté le L64, n'est capable de perméabiliser les membranes des cellules HepG2. Cependant, le P104 et le P123 présentent une légère activité LDH, ce qui suppose une faible capacité de perméabilisation à forte concentration.

Pour compléter cette étude, nous avons réalisé le test de viabilité cellulaire MTT. Les cellules HepG2 ont été transfectées par le plasmide SMD2-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits) en présence de quantités croissantes de copolymères. 30 h post-transfection, les cellules ont été incubées en présence de réactif MTT pendant 3 heures à 37°C. La réaction enzymatique est alors stoppée par l'ajout de DMSO et la viabilité cellulaire est évaluée par mesure de l'absorbance des cellules à 570nm.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous (Figure 53).

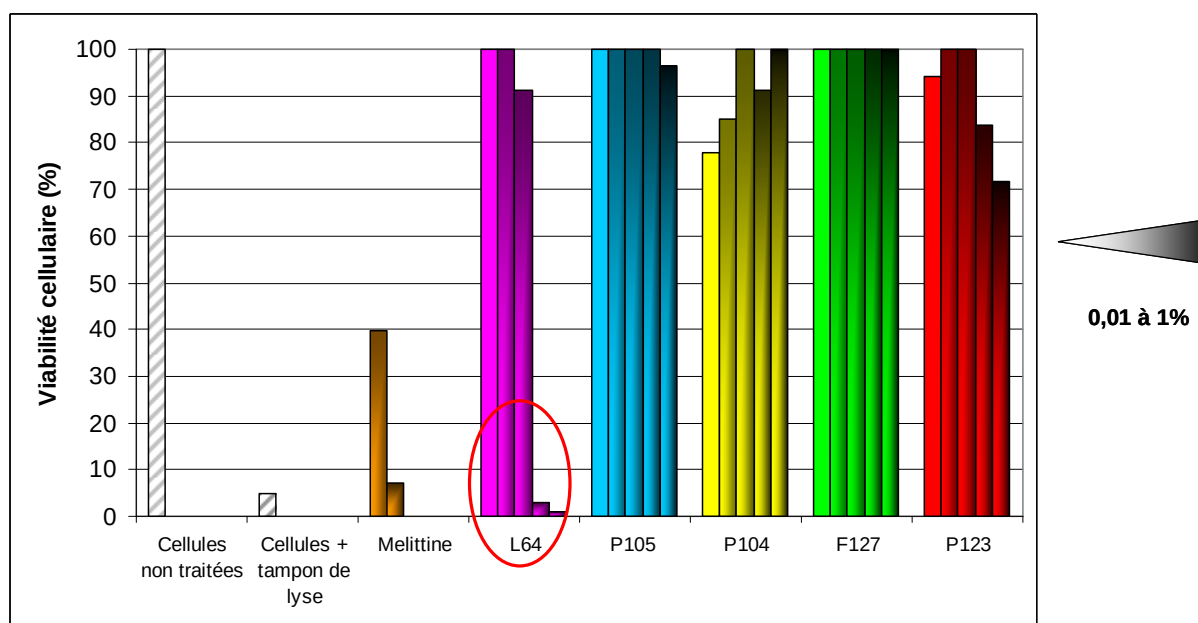


Figure 53 - Test de viabilité cellulaire avec les 5 poloxamères

Les cellules HepG2 ont été transfectées en duplicat par le plasmide SMD2-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits). 30 heures après transfection le surnageant est aspiré et les cellules sont incubées en présence de réactif MTT à 37°C. 3 heures après l'incubation, la réaction enzymatique est stoppée et l'absorbance est alors mesurée à 570 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire comparé aux cellules non traitées. Les cellules traitées au tampon de lyse et à la melittine (1 µM et 10 µM) servent de contrôle positif pour la mortalité cellulaire.

Les cellules non traitées possèdent 100% de viabilité cellulaire. Les cellules traitées au tampon de lyse et à la mellitine 10 µM ont une viabilité cellulaire inférieure à 10%. Les cellules traitées avec tous les poloxamères, excepté avec le L64, possèdent une viabilité supérieure en moyenne à 80%. Les cellules traitées avec la gamme de L64 ont une viabilité qui décroît quand le pourcentage poids/volume augmente pour arriver à une viabilité comparable à celle des contrôles positifs (tampon de lyse et

melittine). Toutefois, nous pouvons noter que les cellules traitées avec le P104 et le P123 à forte concentration voient leur viabilité diminuer pour atteindre près de 80% pour le P104 et 70% pour le P123.

Afin d'essayer de se rapprocher des expériences réalisées *in vivo* dans le muscle, nous avons décidé de réaliser les expériences de relargage LDH sur des myotubes murins obtenus après différenciation des myoblastes C2C12. L'expérience a été réalisée dans les mêmes conditions expérimentales que pour les HepG2.

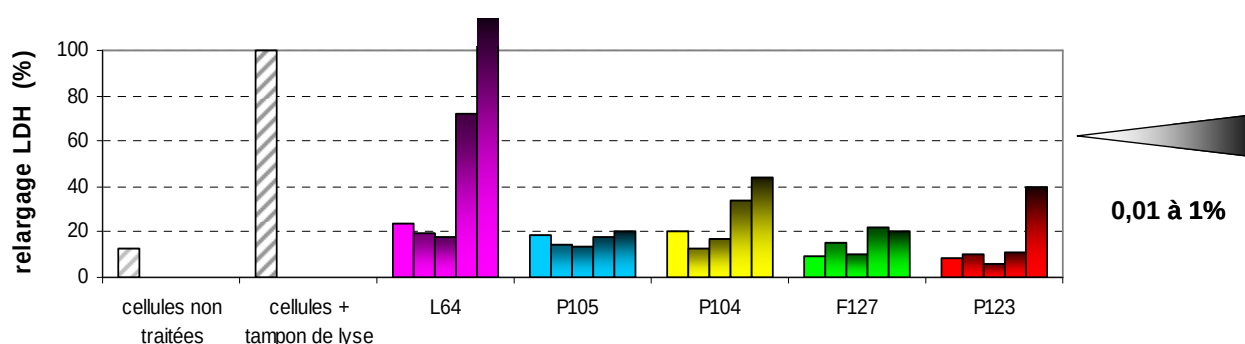


Figure 54 - Test de perméabilité membranaire sur des myotubes C2C12

Les myotubes ont été incubés en présence de quantités croissantes de copolymères (0,01 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,5 ; 1%) dilués dans du milieu sans sérum et incubés à 37°C. 2 h après l'incubation, un aliquot du surnageant est prélevé et l'activité LDH est mesurée. Le puits cellules non traitées sert de contrôle négatif et les cellules traitées au tampon de lyse sont le témoin positif.

Le contrôle cellules non traitées ne donne que 15% de LDH. Un traitement avec notre contrôle positif, le tampon de lyse, donne 100% de LDH.

Jusqu'à une concentration de 0,1%, aucun poloxamère ne donne un pourcentage de relargage LDH supérieur à 20%. Par contre, au-delà de 0,1% le L64 provoque un relargage important de LDH. A noter que contrairement à ce qui a pu être observé avec les HepG2, le P104 et le P123 semblent devenir perméabilisant à fortes doses.

Malgré cette différence, ces résultats sont globalement en accord avec ceux obtenus sur HepG2.

Pour la même raison que celle décrite plus haut, nous avons terminé notre étude de perméabilisation *in vitro* par un test de viabilité via le réactif MTT. Le test a été réalisé dans les mêmes conditions que pour les cellules HepG2. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous

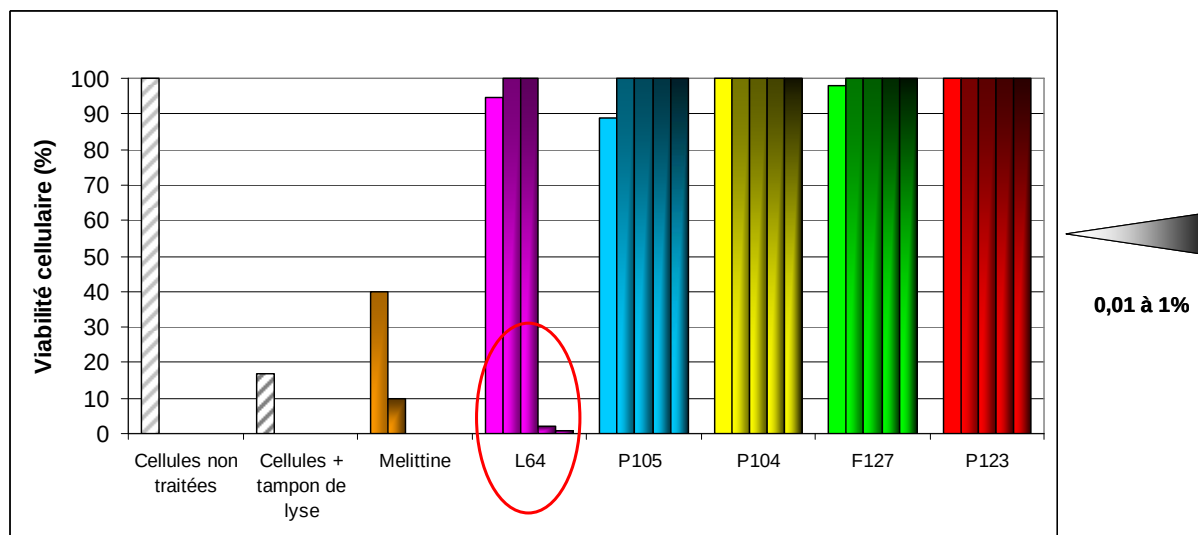


Figure 55 - Test de viabilité cellulaire MTT sur les myotubes C2C12

Tout comme sur les cellules HepG2, seules les cellules traitées avec le poloxamère L64 voient leur viabilité affaiblie voire nulle à partir d'une utilisation du L64 supérieure à la concentration 0,1% (p/v).

Conclusion sur les expériences de perméabilisation *in vitro* :

Les expériences de perméabilisation membranaire réalisées sur la lignée HepG2 et sur les myotubes C2C12 concordent quant à leur conclusion. Les tests LDH et MTT ont permis de mettre en évidence qu'à partir d'une certaine concentration (> 0,1% p/v), le L64 était capable de perméabiliser les membranes. De plus, l'utilisation du L64 sur les cellules, au-delà de cette concentration, provoque une chute drastique de la viabilité cellulaire, ce qui nous permet d'affirmer que le L64 devient toxique pour les cellules.

Comme les expériences *in vitro* ne permettent pas toujours de savoir ce qui se passe *in vivo*, nous avons cherché à savoir s'il y avait perméabilisation membranaire *in vivo*. Pour cette étude, nous avons utilisé les propriétés du bleu Evans. Celui-ci est

un colorant incapable de traverser les membranes et connu pour se lier à l'albumine du sang. Il est utilisé ici comme marqueur de la perméabilité membranaire des cellules musculaires. Ainsi, une accumulation de colorant dans les fibres musculaires indique une altération membranaire. En pratique, nous avons injecté à des souris Balb/c 100 μ L de bleu Evans par voie intrapéritonéale à J0. Puis, à J1, les souris ont reçu une injection de CMV_Luc mélangé à différentes concentrations de poloxamères (0,05% pour P104, P123, F127; 0,1% pour P105 et L64; et enfin 0,5 et 1% pour L64). Enfin, les souris ont été sacrifiées et leurs muscles prélevés le lendemain (J2). Les résultats sont présentés dans les Figure 56 et Figure 57.

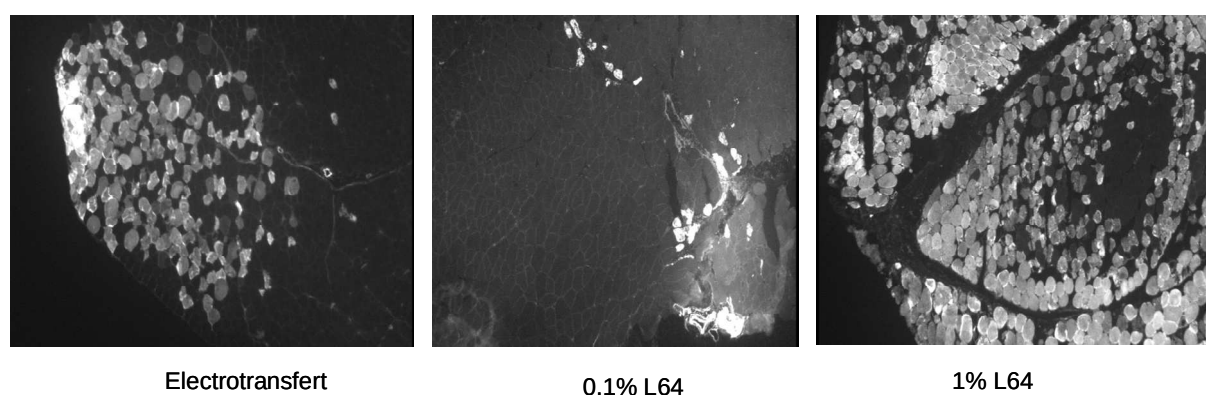


Figure 56 - Mise en évidence de la perméabilisation membranaire *in vivo*

Les souris Balb/c ont été injectées à J0 avec 100 μ L de bleu Evans par voie intrapéritonéale. A J1, elles ont reçu le plasmide CMV_Luc complexé à une gamme de concentration de poloxamères. A J2, les souris ont été sacrifiées et les muscles prélevés. Des coupes histologiques transversales ont été réalisées. Afin de conserver les lames, un traitement à l'acétone refroidi a été pratiqué.

Comme contrôle positif de perméabilisation membranaire *in vivo*, nous avons pratiqué l'électrotransfert (Figure 56, photo de gauche) Nos résultats confirment qu'après application de la technique d'électrotransfert, une quantité significative de fibres musculaires traitée sont positives au Bleu Evans. L'injection de L64 à 1% est capable de fortement perméabiliser les membranes, comme révélé par la photo de droite (Figure 56) obtenue par microscopie à fluorescence.

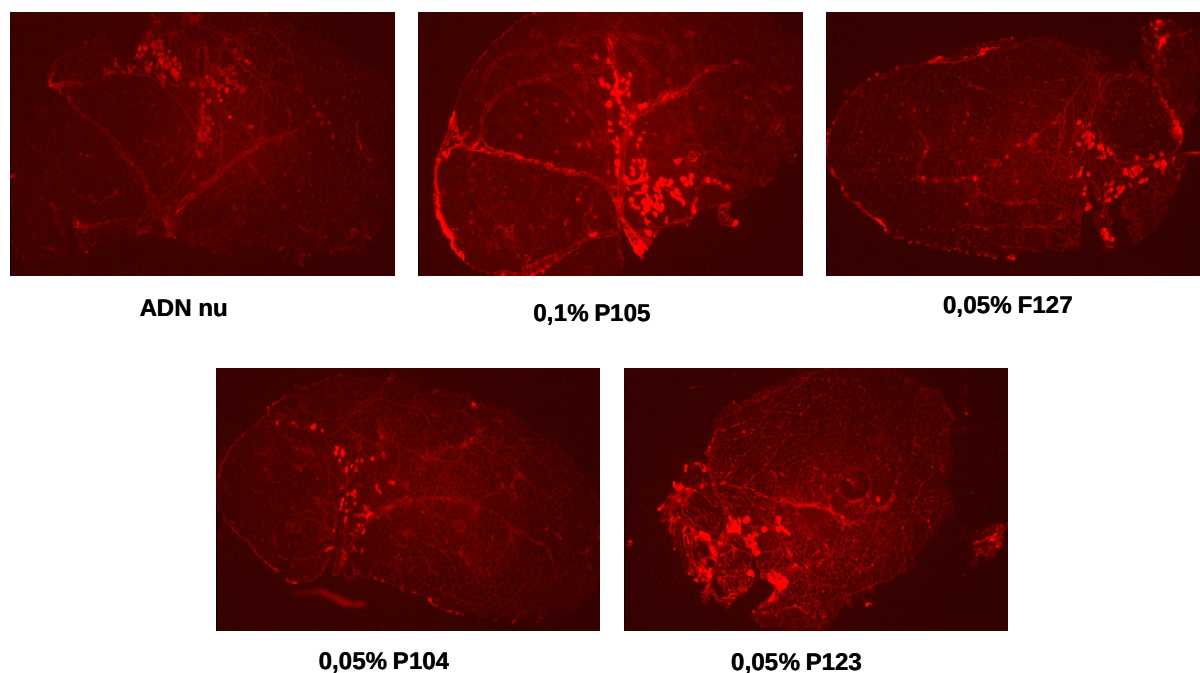


Figure 57 – Traitement des poloxamères au bleu Evans
Les procédures expérimentales ont été les mêmes que pour la Figure 56.

Les capacités de perméabilisation *in vivo* des 4 autres poloxamères ont ensuite été testées. Aucun des 4 poloxamères testés ne montre un marquage positif aussi fort que celui observé avec l'électrotransfert ou le L64 à 1% (voir Figure 57). Toutefois, nous pouvons noter qu'il existe quelques fibres positives qui sont présentes même lors de l'injection d'ADN nu. Elles sont sans doute dûes au passage de l'aiguille et/ou à la pression locale de l'injection.

Ainsi, les résultats obtenus pour le marquage Bleu Evans *in vivo* sont en accord avec les tests de perméabilité membranaire pratiqués *in vitro*.

III.3.2.9 Effet de l'électrotransfert couplé au poloxamère P105

Comme nous venons de le voir, les copolymères amphiphiles de type poloxamères permettent une amélioration significative de l'efficacité de transfection dans le muscle. Nous avons voulu savoir s'il y avait un intérêt de combiner électrotransfert avec les poloxamères. Le rationnel est basé sur des études effectuées avec le

polymère F68 : en effet, il a été décrit qu'une administration de poloxamère F68 permettait de réduire les dommages induits par une électrocution (98, 159, 160).

Chaque groupe de souris a reçu 10 µg de plasmide CMV_luc couplé ou non à 0,1% P105. Suite à l'injection, l'électrotransfert a eu lieu dans les conditions standards (200 V/cm, 20 ms, 8 pls, 2 Hz). Les solutions de « complexes » ADN/P105 ont été diluées soit dans une solution de NaCl 150 mM soit dans une solution de Tyrode 1X. L'efficacité de transfection est reportée dans la figure suivante (**Figure 58, ci-dessous**)

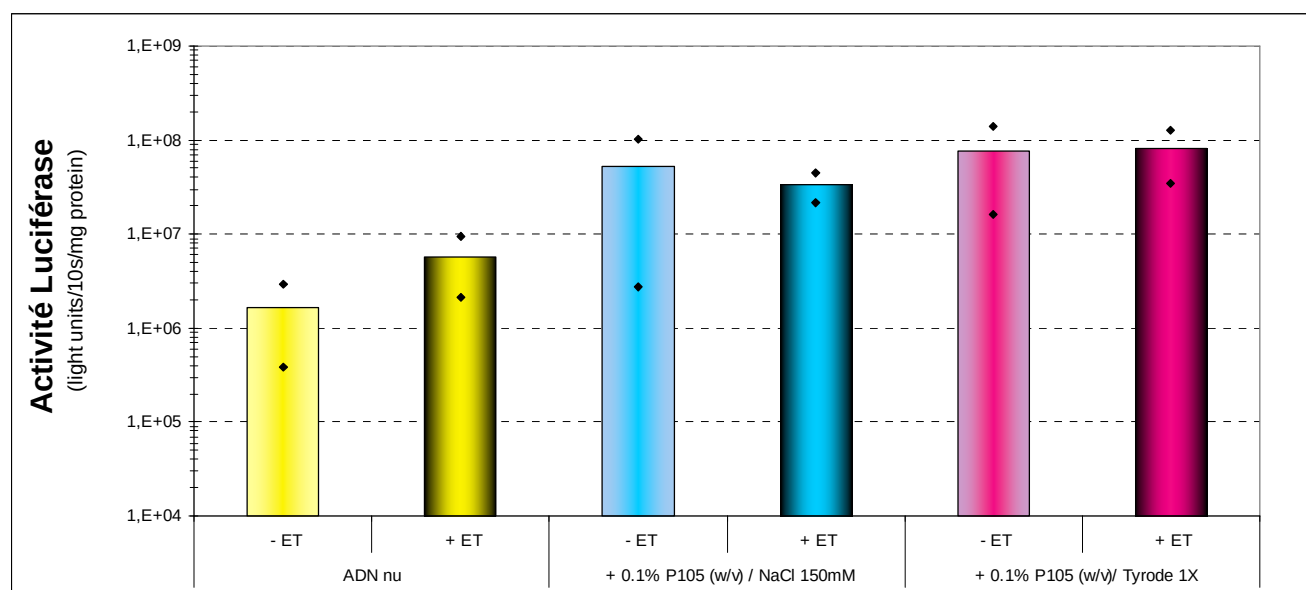


Figure 58 - Combinaison de l'électrotransfert et de P105

Les souris Balb/c ont été injectées dans le muscle tibialis antérieur gauche (TAG) avec 10 µg de plasmide CMV_Luc préparé dans une solution de NaCl 150mM ou de Tyrode complexé à 0,1% P105 puis électroporé (200 V/cm, 8 pls, 20 ms, 2 Hz). 7 jours après injection, les muscles (n=2, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10s/mg protéine).

L'addition de poloxamère P105 (0,1%) permet d'augmenter de près d'un facteur 100 l'efficacité de transfection comparé à l'ADN nu, quel que soit la solution saline utilisée. Le fait d'ajouter l'électrotransfert à l'injection du « complexe » ADN/P105 n'apporte pas de gain d'efficacité de transfection. . Nous n'avons cependant pas vérifié si le fait d'ajouter le poloxamère réduisait les dommages tissulaires après électrotransfert. Ce point serait à vérifier avant de conclure définitivement qu'il n'y a pas d'intérêt à combiner électrotransfert et P105.

III.3.2.10 Relation entre CMC et activité de transfection

Les expériences de mesure de la CMC ont été réalisées par Gaelle Pembouong et Nathalie Mignet (UMR 8151, Paris).

Les copolymères amphiphiles ont la capacité de s'auto-assembler en micelles en solution aqueuse. Comme les valeurs des CMC rapportées dans la littérature diffèrent souvent (106, 161) et que les températures utilisées pour les mesures sont souvent omises, nous avons décidé de déterminer les valeurs des CMC dans nos conditions de température et de milieu, à savoir à température ambiante (environ 25°C) et à 37°C dans une solution NaCl 150 mM (et Tyrode pour le P105). Ainsi, cela nous permettra de déterminer s'il existe une relation entre l'activité de transfection et l'auto-assemblage des polymères.

La concentration micellaire critique a été déterminée par la méthode DPH (voir matériels et méthodes). La fluorescence de la DPH a été mesurée pour chaque mélange DPH/poloxamère et l'intensité de la DPH a été rapportée au logarithme de la concentration du polymère. De là, en augmentant la concentration du poloxamère, les intensités de fluorescence commencent à augmenter, indiquant que la DPH est dans un environnement différent, ce qui correspond à un changement d'organisation du poloxamère.

Les résultats obtenus sont détaillés dans le tableau ci-dessous.

Copolymère	CMC (%)	
	25°C	37°C
L64	1.50 ± 0.07	0.25 ± 0.02
P104	0.08 ± 0.004	0.007 ± 0.0006
P123	0.014 ± 0.002	0.004 ± 0.002
P105	0.98 ± 0.09	0.032 ± 0.002
P105 dans Tyrode	0.83 ± 0.01	0.032 ± 0.003
F127	0.3 ± 0.006	0.014 ± 0.003

Tableau 5 - Détermination de la CMC par la méthode de la DPH

L'analyse de ce tableau nous montre que les CMC diminuent lorsque la température augmente de 25°C à 37°C. Ces résultats sont en adéquation avec la littérature (162).

Comme la CMC a été décrite comme variant avec la concentration en sels (163), nous avons réalisé les mêmes mesures que précédemment avec le P105 dilué dans une solution de Tyrode. Le Tyrode est une solution enrichie en sels (voir composition dans le Tableau 1, p58). Les résultats indiquent que les valeurs des CMC dans le Tyrode à 25°C et 37°C sont semblables à celles obtenues avec le P105 dilué dans le NaCl 150mM. . De plus, les résultats présentés dans le tableau indiquent que les valeurs de la CMC :

- 1- diminuent avec la taille des blocs PEO (P123 a la CMC la plus basse ainsi que le % de PEO le plus faible)
- 2- pour un pourcentage en blocs PEO fixe, les valeurs des CMC diminuent quand la masse moléculaire (MM) augmente. En effet, par exemple, le L64 et le P104 ont le même pourcentage en blocs PEO mais P104 a une MM plus élevée : la CMC du P104 est beaucoup plus faible que celle du L64.

Finalement, si on compare la concentration optimale utilisée pour le transfert de gène dans le muscle et les valeurs des CMC dans le NaCl 150mM à 37°C, on peut noter que pour tous les poloxamères, l'activité transfectrice de ces composés est obtenue à la CMC (L64) ou au-dessus.

III.3.2.11 Transactivation du promoteur CMV

Il a été proposé – et en partie démontré – que les poloxamères étaient capables d'améliorer les niveaux d'expression suite à l'activation de la voie NF-κB. Afin de vérifier entre nos mains ces résultats nous avons réalisé l'expérience suivante : des cellules HepG2 et NIH 3T3 ont été transfectés avec du DOTAP ou du PEI avec une cassette CMV-Luc (2 µg ADN/puits). 24 h après la transfection, le milieu a été aspiré et les cellules ont été incubées pendant 3 h en présence de quantités croissantes de poloxamère L64 (de 0,01% à 0,5%). Le milieu a ensuite été aspiré et remplacé par du DMEM + 10% SVF. 24 h après, les cellules ont été lysées et l'activité luciférase a

été mesurée. Les résultats obtenus avec la lignée HepG2 et la lignée NIH3T3 sont présentés respectivement dans les figures suivantes: (Figure 59 A et B)

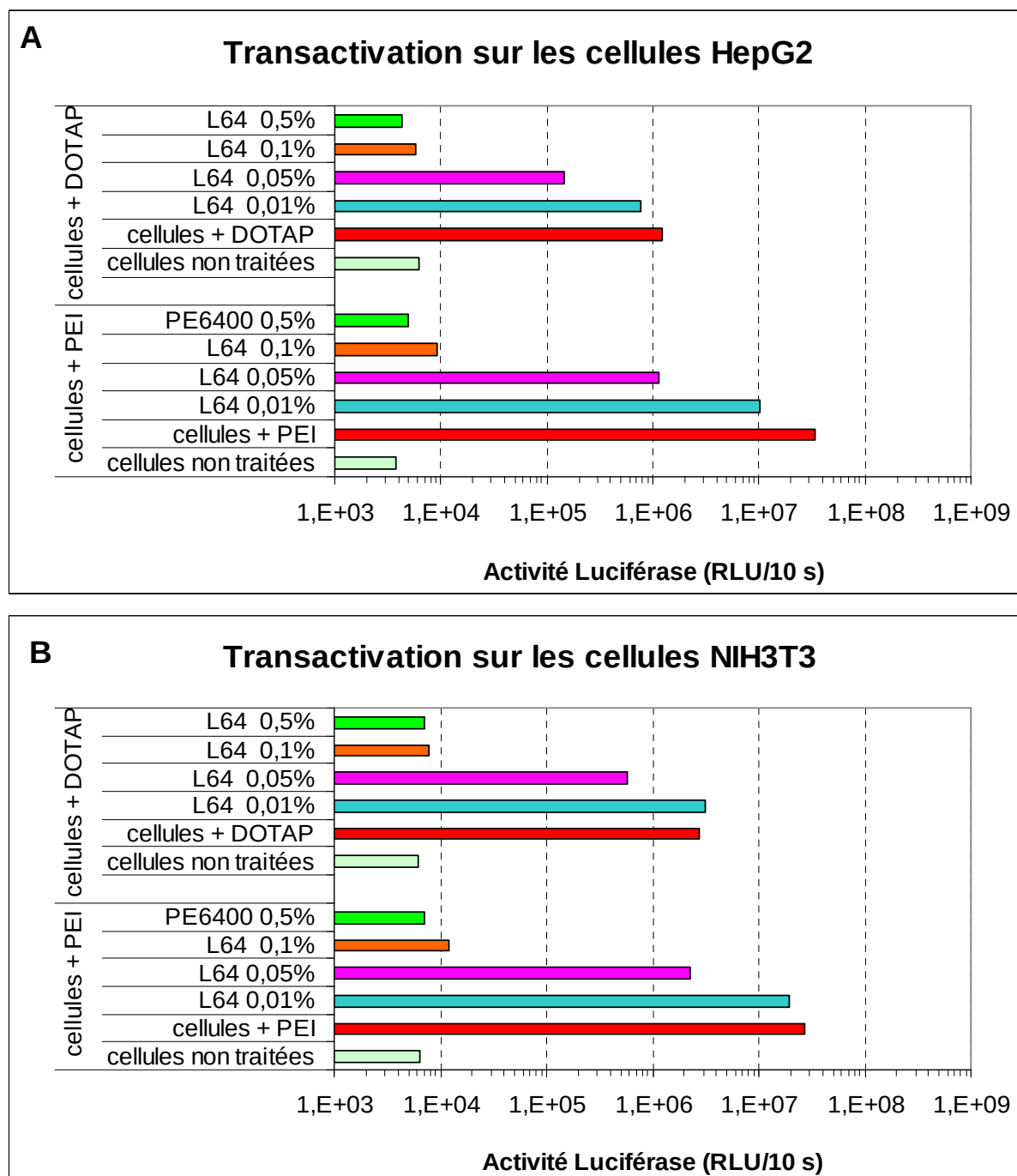


Figure 59 - Effet d'une incubation de L64 sur des cellules transfectées

Les cellules HepG2 (fig. A) et la lignée murine de fibroblastes NIH3T3 (fig. B) ont été transfectées en duplicat par le plasmide SMD₂-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits) avec soit le PEI 25 kDa soit le DOTAP (3. éq). 24 heures après transfection les cellules sont mises en présence du poloxamère L64 aux concentrations suivantes : 0,01%, 0,05% ; 0,1%, 0,5% pendant 3h à 37°C. 24 h après, les cellules sont lysées puis testées pour leur activité luciférase. L'histogramme présente les activités des différents polymères. L'efficacité de transfection

obtenue avec les quantités testées de chaque polymère est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10s/mg protéine).

Les résultats montrent que les cellules ayant été incubées avec du L64 ont des niveaux inférieur ou égal à ceux obtenus avec les cellules transfectées non traitées avec du L64. Ces résultats ne semblent pas indiquer qu'il y ait transactivation du promoteur CMV via les poloxamères. Ceci étant, des études plus poussées devront être menées pour confirmer ou infirmer ce point.

III.3.2.12 Efficacité de transfection et vitesse d'injection

Dans l'objectif de toujours optimiser l'efficacité de transfection, nous avons voulu testé si la vitesse d'injection avait un impact sur l'efficacité de transfection. Pour cela, nous avons injecté le plasmide CMV_Luc formulé dans du NaCl 150 mM ou dans un tampon NaP 150 mM couplé ou non au P105 à la concentration 0,1%. Nous avons testé 2 vitesses d'injection : une vitesse dite « classique » (lente), utilisée jusque là dans toutes nos expérimentations, et une vitesse dite « rapide » avec une injection se faisant en moins de 2 secondes. Les résultats obtenus sont présentés ci-après : **(Figure 60)**

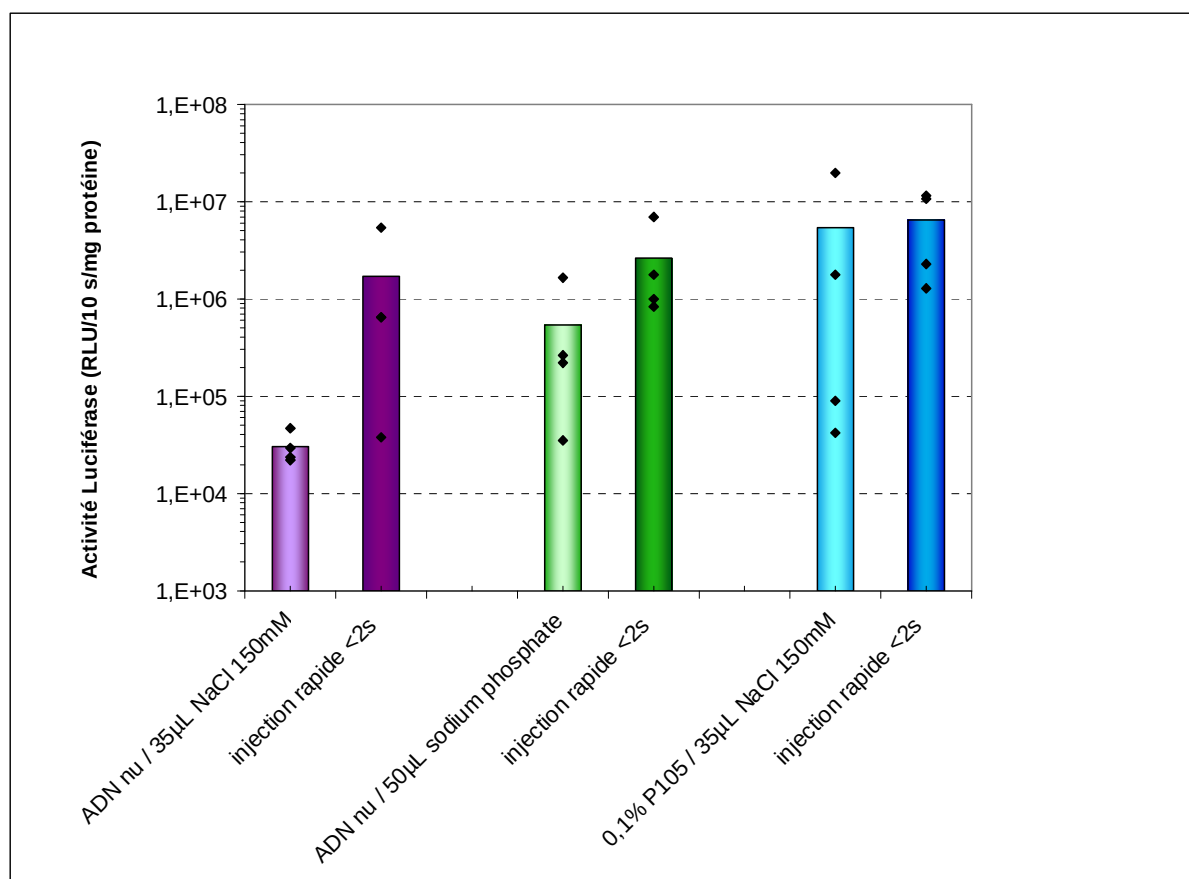


Figure 60 - Effet de la vitesse d'injection sur l'efficacité de transfection

Les souris Balb/c ont été injectées avec 10 µg de plasmide CMV_Luc préparé dans une solution de NaCl 150mM ou de NaP 150 mM complexé ou non à 0,1% P105 formulé dans du NaCl 150 mM. Les injections ont été testées en vitesse normale et vitesse rapide (<2 secondes). 7 jours après injection, les muscles (n=3, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

Les résultats montrent que lorsque l'ADN est couplé au poloxamère P105, l'efficacité de transfection est comparable quelle que soit la vitesse d'injection pratiquée. Par contre, concernant l'ADN nu, l'utilisation d'un tampon sodium phosphate montre une augmentation de l'efficacité de transfection d'un facteur 5 à vitesse d'injection rapide. Le plus grand gain est observé avec l'ADN nu dans du NaCl 150 mM. En effet, la vitesse d'injection rapide permet d'augmenter d'un facteur 50 l'efficacité de transfection. Toutefois, cette efficacité reste en moyenne inférieure à celle obtenue avec le P105.

III.3.2.13 Effet de la température sur l'efficacité de transfection

I

Il a été rapporté très récemment que la (37°C versus température ambiante) pouvait jouer un rôle dans l'efficacité de transfection *in vivo* du L64 (164). Aussi avons-nous souhaité essayer de reproduire ces résultats avec le L64.

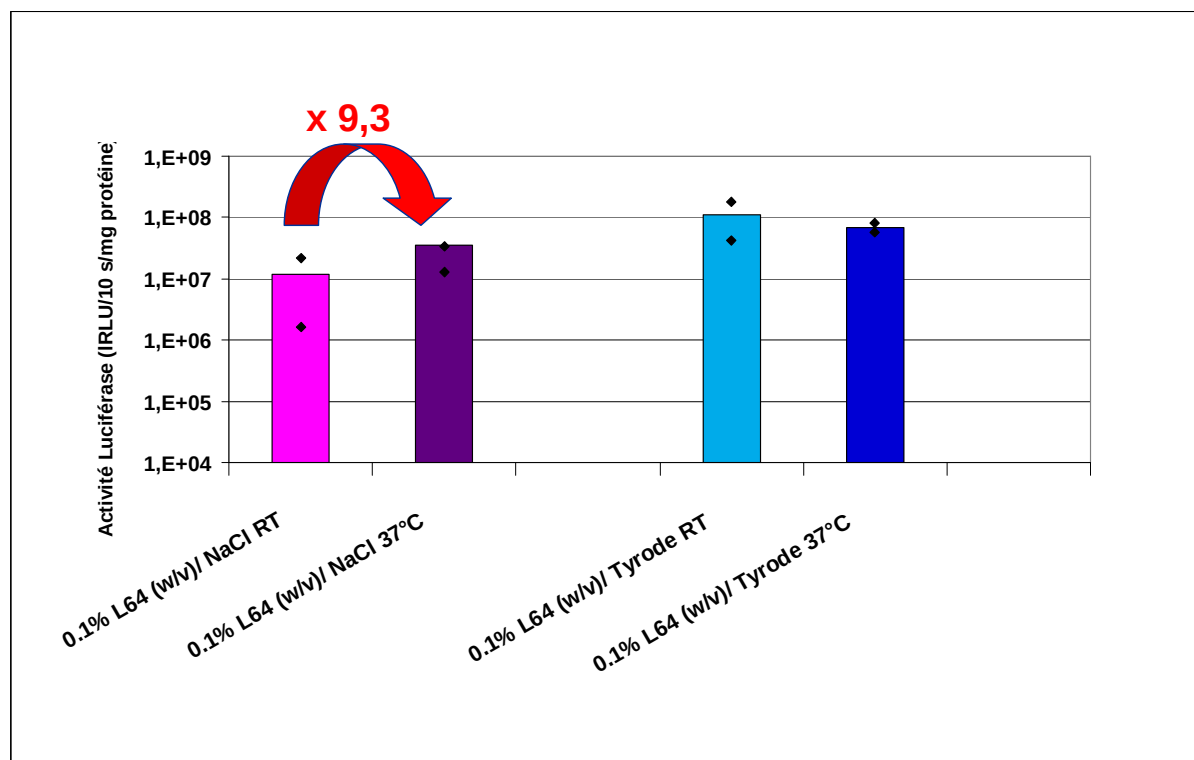


Figure 61 - Effet de la température sur l'efficacité de transfection

10 µg de plasmide CMV_Luc couplé au 0,1% L64 formulé dans du NaCl 150 mM ou dans du Tyrode ont été injectés dans le tibialis antérieur. 2 conditions de température ont été testées : Température ambiante et 37°C. Pour la condition à 37°C, les tubes contenant le plasmide+le copolymère ont été préalablement chauffés pendant au moins 30 min à 37°C avant l'injection.

La formulation du L64 dans le Tyrode ne semble pas être sensible à la température de mélange copolymère/ADN. En effet, les efficacités de transfection observée à température ambiante et à 37°C sont comparables. Ce pendant, il semblerait qu'une formulation dans du NaCl 150 mM soit sensible à la température. En effet, un gain d'un facteur 9,3 est observé lorsque les « complexes » sont préalablement chauffés à 37°C. Ces résultats sont donc en accord avec les résultats obtenus par l'équipe de Fromès. Ainsi, la température joue un rôle dans l'efficacité de transfection *in vivo* du

L64. Il serait intéressant de voir si cela est également le cas pour d'autres poloxamères tels que le P105.

III.2.4. Etude de l'efficacité de transfert de gène des copolymères Pluronic reverse et Tetronic

Nous avons reproduit les mêmes séries d'expériences avec d'autres polymères afin de vérifier si la structure des tri-blocs branchés ou linéaires influait sur l'efficacité de transfection de ces molécules.

Pour cela, nous avons évalué des poloxamères réverses (25R2 et 25R4) ainsi que des poloxamines ou tetronic (T304, T908 et T1107). A noter que nous avons également évalué l'efficacité des poloxamères P85 et P65.

III.4.2.1 Evaluation de l'efficacité d'une nouvelle série de copolymères à « complexer » l'ADN plasmidique

Dans le même but que précédemment, nous avons voulu vérifier la capacité de cette série de copolymères à interagir avec l'ADN. Un mélange d'ADN en quantité fixe (1 µg) et de poloxamères en quantité croissante (de 0,005 à 10% w/v) est déposé sur un gel d'agarose 1%. La figure présente le gel retard obtenu avec les polymères P85, P65, 25R2, 25R4, T304, T908 et T1107 respectivement.

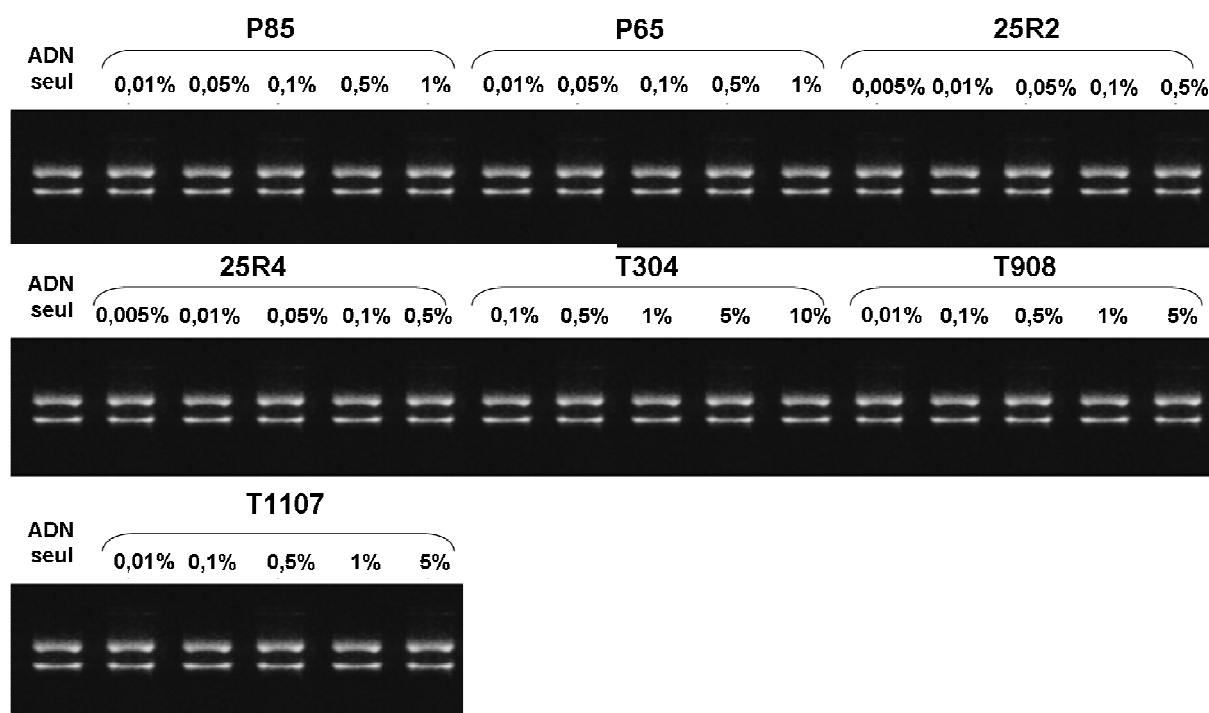


Figure 62 - Profil électrophorétique des "complexes" ADN/Polymères

L'efficacité de complexation de 1 μ g d'ADN plasmidique est évaluée par électrophorèse sur gel d'agarose 1%. Les « complexes » ADN/Polymères sont préparés à différentes concentrations (de 0,01% à 1% pour P85 et P65 ; de 0,005% à 0,5% pour 25R2 et 25R4 ; de 0,1% à 10% pour T304 ; et de 0,01% à 5% pour T908 et T1107). Le premier puits représente l'ADN en absence de polymère (les deux bandes observées représentent les formes relâchée et surenroulée du plasmide en haut et en bas respectivement).

L'analyse du gel d'électrophorèse nous montre que l'ADN seul migre bien. En présence de copolymères, nous pouvons observer que les profils électrophorétiques sont identiques entre eux et identiques au profil de l'ADN seul. Cela nous permet d'affirmer qu'aucun des polymères testés n'est capable de retarder la migration de l'ADN plasmidique aux concentrations étudiées.

III.4.2.2 Evaluation de l'efficacité de transfection

Nous avons ensuite testé l'efficacité de transfection de cette série de polymères sur des cultures cellulaires d'hépatocytes humains HepG2. Le protocole de transfection utilisé est le même que pour les poloxamères décrit précédemment. L'ADN utilisé est le plasmide SMD₂-Luc- Δ ITR codant la luciférase (2 μ g/puits). Les complexes transfectants sont préparés en incubant chaque polymère en quantité croissante

avec une quantité fixe d'ADN. Les quantités de polymère utilisées sont les suivantes, et ce pour l'ensemble des expériences menées sur cette série de polymères :

Nom du Polymère	Nature du polymère	Quantité utilisée en pourcentage poids/volume
P85	Pluronic	0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1
P65	Pluronic	0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1
25R2	Pluronic Reverse	0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5
25R4	Pluronic Reverse	0,005 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5
T304	Tetronic	0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10
T908	Tetronic	0,01 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5
T1107	Tetronic	0,01 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5

Tableau 6 - Les concentrations utilisées de différents polymères

30 heures après le début de l'expérience, les cellules sont lysées et l'activité luciférase (Relative Light Unit/10s) et la quantité de protéines sont mesurées.

Le témoin positif utilisé est le DOTAP, agent transfectant commercialisé, connu pour ses activités de transfection. Le premier puits représente l'ADN seul, qui est notre témoin négatif - puisque comme déjà mentionné à plusieurs reprises, l'ADN non vectorisé *in vitro* pénètre très inefficacement dans les cellules. Nous avons testé cette série de polymères dans 2 solutions salines différentes : une solution saline NaCl 150 mM et le Tyrode (voir composition Tableau 1, p58).

Le niveau d'expression de la luciférase 30h post-transfection indique qu'aucun des polymères ne possède la capacité d'améliorer significativement le transfert de gènes *in vitro*, et ce, quelque soit la solution saline utilisée. (Figure 63, ci-dessous)

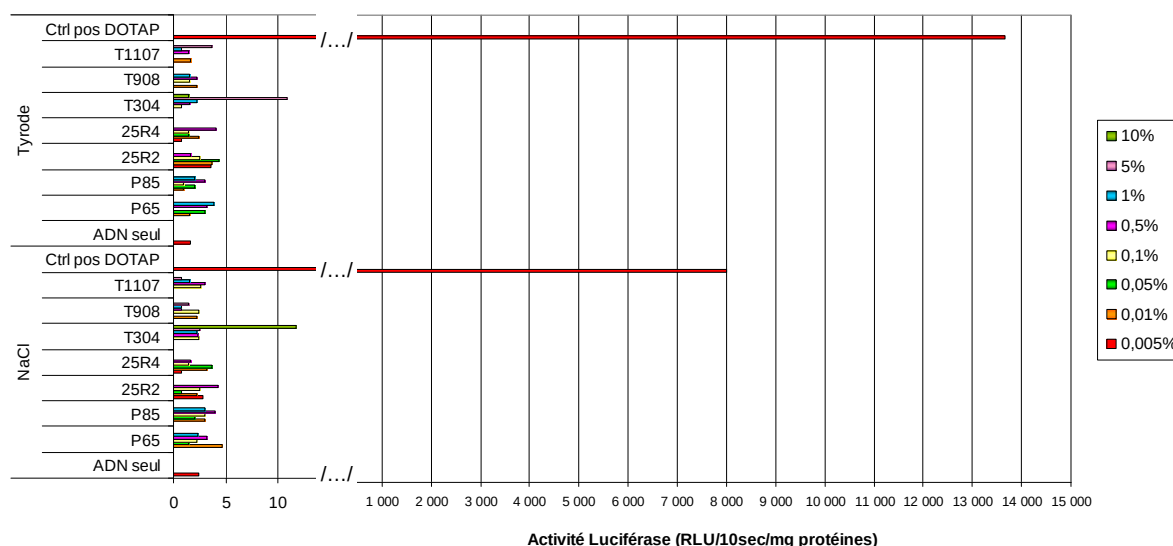


Figure 63 - Evaluation de l'efficacité de transfection in vitro d'une série de polymères

Les cellules HepG2 ont été transfectées en duplicat par le plasmide SMD₂-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits). 30 heures après transfection les cellules sont lysées puis testées pour leur activité luciférase. L'histogramme présente les activités des différents polymères. L'efficacité de transfection obtenue avec les quantités testées de chaque polymère est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine). Le DOTAP a été utilisé à sa concentration optimale en tant que témoin positif.

Il est intéressant de noter toutefois qu'une légère activité de transfection a été observée pour le T304 à 5% (valeurs en RLU/10s/mg prot de 11 dans Tyrode et de 12 dans NaCl) mais celle-ci est négligeable par rapport au contrôle positif DOTAP (activité luciférase autour de 13 000 RLU/10 s/mg prot).

Ensuite, nous avons testé ces polymères pour leur activité de transfert de gènes *in vivo*.

III.4.2.3 Le transfert de gène *in vivo*

Afin de déterminer si notre série de poloxamères possédait les mêmes caractéristiques et propriétés que le poloxamère P105, nous les avons testés *in vivo*. Pour cela, nous avons mélangé 10 µg d'ADN plasmidique codant pour la luciférase avec des quantités croissantes de polymères (détaillées dans le **Tableau 6, ci-dessus**). Les « complexes » ainsi obtenus ont été injectés dans le tibialis antérieur de souris Balb/C. Sept jours après l'injection, les muscles ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Deux conditions ont été testées : les complexes transfectants ont été préparés soit dans une solution de chlorure de sodium (150 mM

final) soit dans le Tyrode. Les résultats obtenus sont présentés dans les 2 histogrammes ci-dessous.

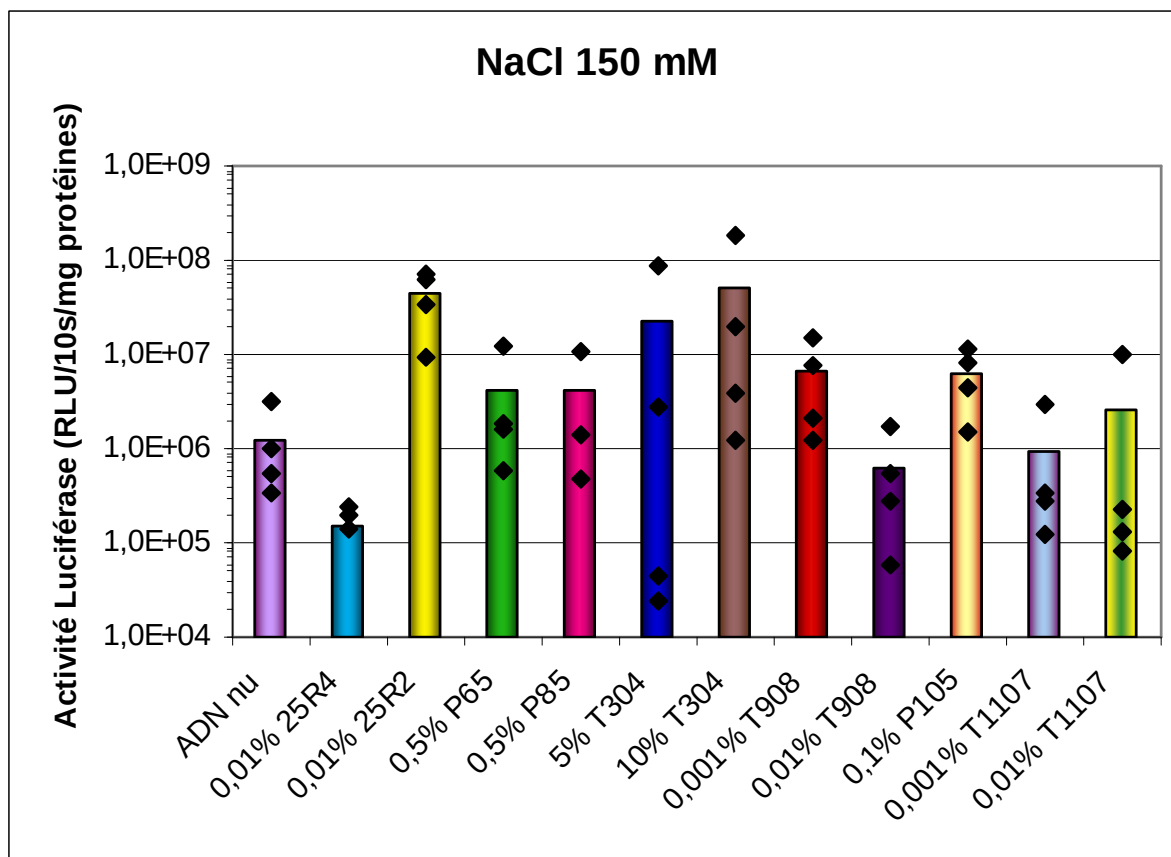


Figure 64 - Evaluation de l'efficacité de transfection d'une série de polymères préparés dans une solution de NaCl 150mM

Les souris Balb/c ont été injectées avec les complexes ADN/polymère préparés dans une solution de NaCl 150mM (ou Tyrode pour la figure ci-dessous). 7 jours après injection, les muscles (n=4, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues avec les différents polymères. L'efficacité de transfection obtenue avec les quantités testées de chaque polymère est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine). L'injection d'ADN nu a été utilisée comme point de référence et de comparaison.

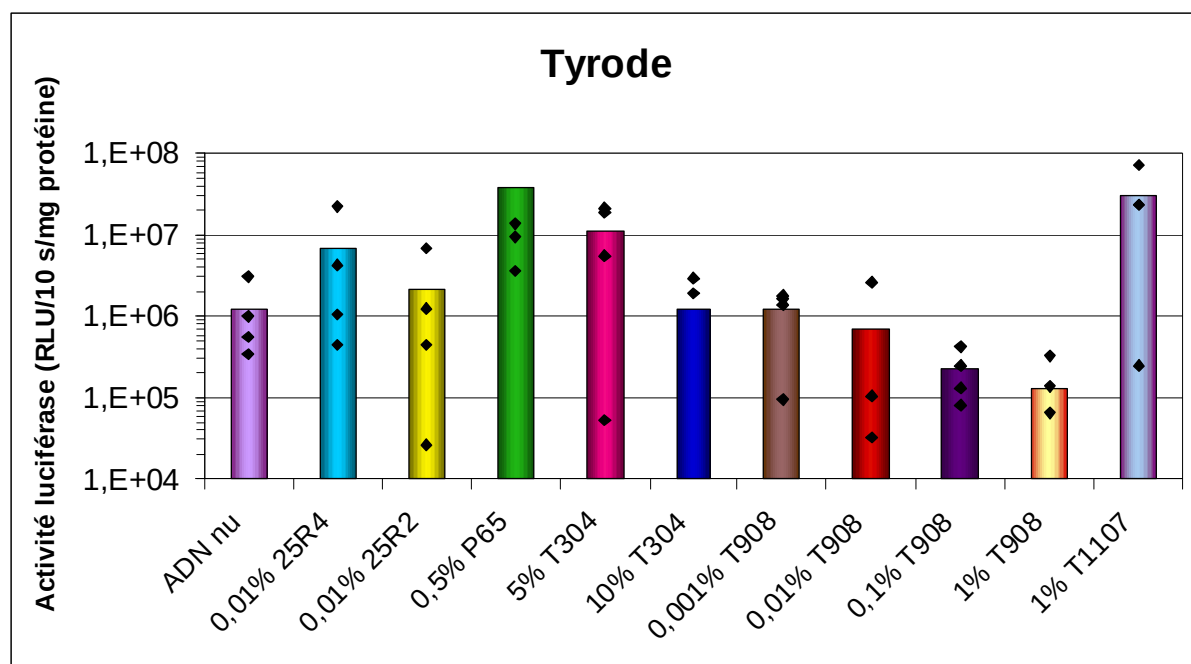


Figure 65 - Evalutaion de l'efficacité de transfection d'une série de polymères préparés dans une solution de Tyrode

Les résultats obtenus dans le NaCl nous montrent que les deux meilleurs polymères sont le 25R2, un pluronic reverse, et le tetronic T304. Les résultats des efficacités de transfection des polymères complexés dans le Tyrode ne correspondent pas ce à quoi on pouvait s'attendre si on se base sur les résultats NaCl. Ces résultats soulignent à nouveau la difficulté d'obtenir des effets reproductibles avec les copolymères. On peut cependant relever que l'ensemble des composés testés a le potentiel pour augmenter les niveaux d'expression après formulation avec l'ADN.

Nous avons choisi le composé 25R2 afin d'effectuer une comparaison avec notre poloxamère de référence, le P105. Pour cela, 10 µg d'ADN plasmidique CMV_Luc couplé à une gamme de concentrations de poloxamère reverse 25R2, préparés dans du NaCl 150 mM ont été injectés dans le tibialis antérieur de souris Balb/C. Les souris ont été sacrifiées sept jours après l'injection et les muscles ont été prélevés. L'efficacité de transfection du 25R2 a été comparée à celle du 0,1% P105 préparé dans une solution de NaCl ainsi qu'à celle d'ADN nu. Les efficacités de transfert de gènes *in vivo* sont reportées dans la figure ci-dessous (Figure 66, ci-dessous)

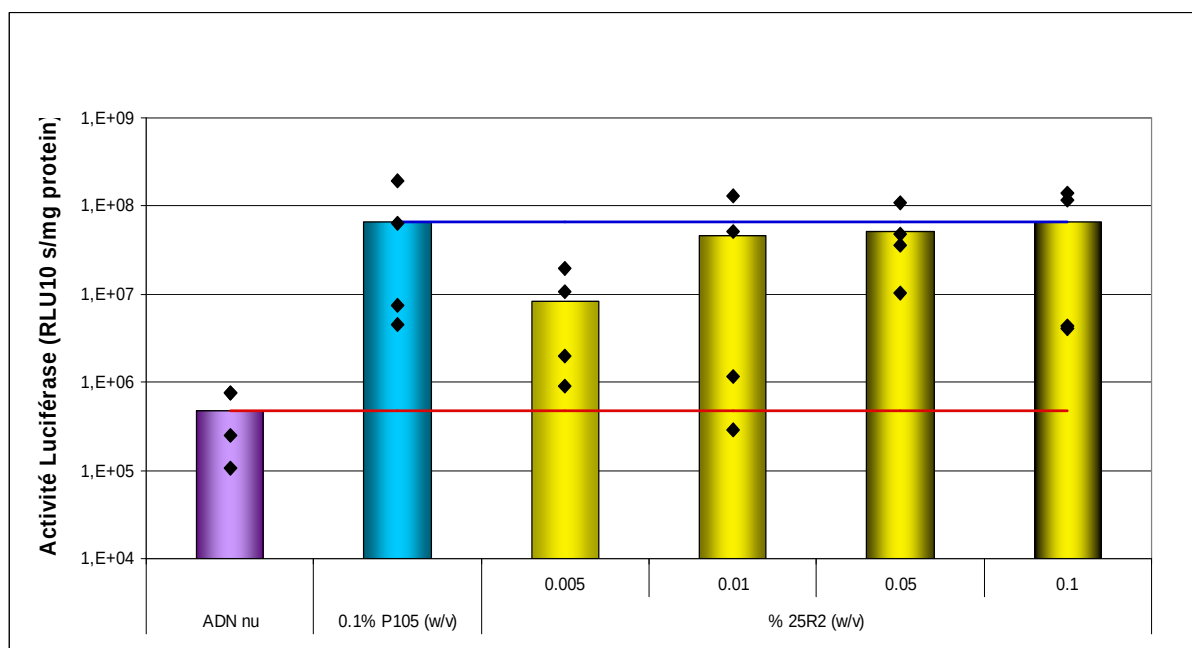


Figure 66 - Comparaison de l'efficacité de transfection du 25R2 et du P105

Les souris Balb/C ont été injectées avec les complexes ADN/25R2 préparés dans une solution de NaCl 150 mM. 7 jours après injection, les muscles (n=4, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection obtenues avec la gamme de concentration de 25R2 sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10s/mg protéine) et comparées à celle obtenue avec le P105 préparé dans du NaCl.

L'analyse des résultats nous montre qu'à partir de la concentration de 0,01%, le 25R2 possède une efficacité de transfection comparable à celle obtenue avec le P105 dans les conditions optimales.

III.4.2.4 Evaluation de la perméabilité membranaire

Nous avons mené les mêmes investigations que précédemment afin de déterminer un lien entre les activités de transfection des polymères et leurs propriétés détergentes. Ainsi, des cellules HepG2 ont été incubées en présence d'IP et de gammes croissantes des polymères P85, P65, 25R2, 25R4, T304, T908 et T1107. Les résultats ont été comparables pour tous les poloxamères (voir Figure 67A, les résultats obtenus, par exemple, pour le P85) c'est-à-dire qu'ils ne présentaient pas de cellules IP positives, excepté pour le 25R2 (voir Figure 67B).

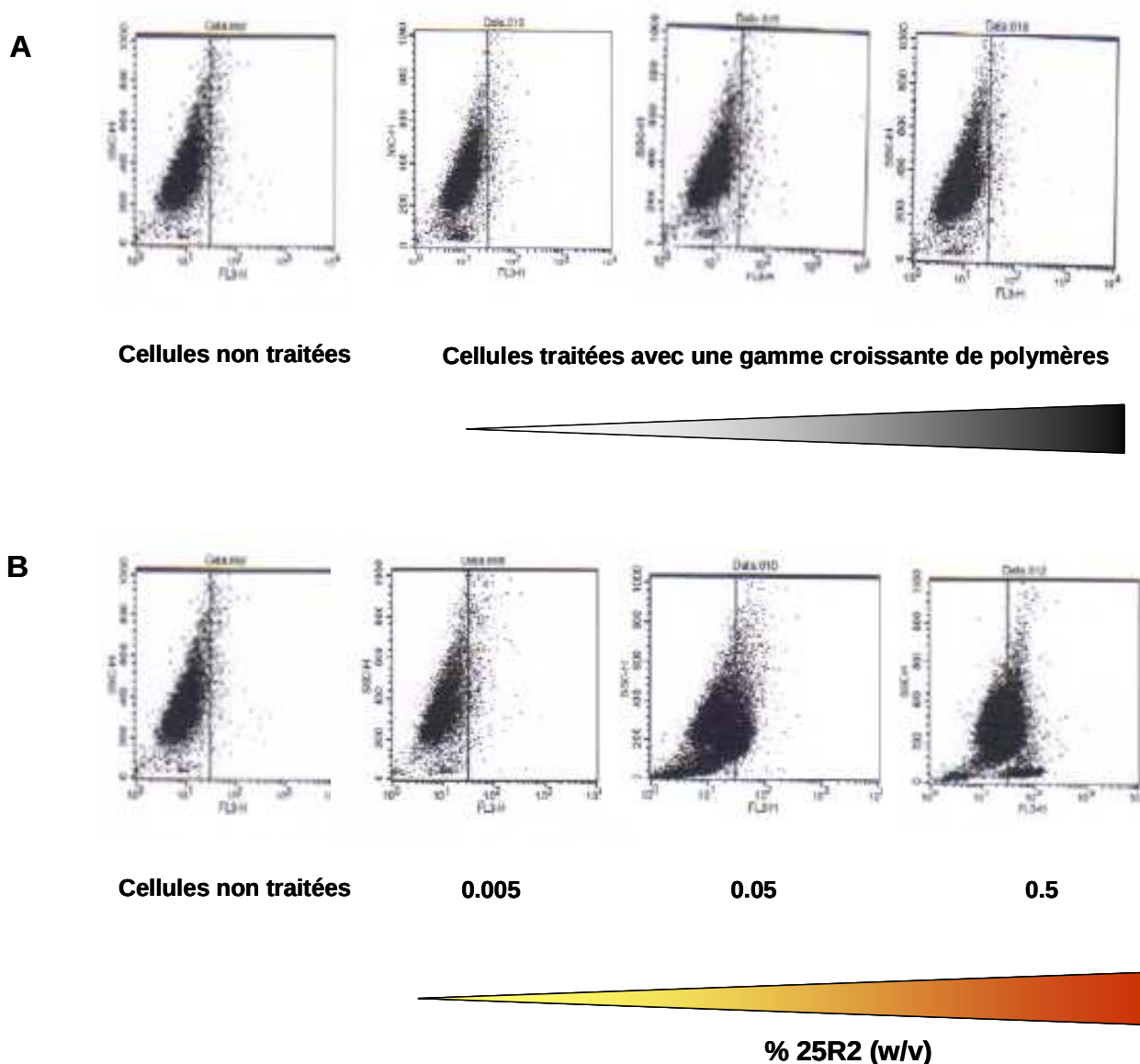


Figure 67 - Evaluation de la perméabilité membranaire par cytométrie en flux

Les cellules HepG2 ont été incubées en présence d'iodure de propidium (3 μ g/ml) et de doses croissantes de polymères (P85, P65, 25R2, 25R4, T304, T908 et T1107 ; voir Tableau 6 pour les gammes de concentration testées) et diluées dans du DMEM sans sérum. 2h après l'incubation à 37°C, les cellules sont décollées de la plaque et culture et resuspendue dans du PBS. Les échantillons sont ensuite analysés par cytométrie en flux. Un contrôle négatif (cellules seules) est utilisé pour normaliser les résultats. Les résultats présentés dans la figure A sont ceux obtenus avec le T908 (résultats similaires obtenus avec les autres copolymères, excepté avec le 25R2) et ceux de la figure B sont ceux obtenus avec le 25R2.

En effet, le poloxamère inverse 25R2 présente des cellules positives à l'IP aux concentrations de 0,05 et 0,5% (environ 20 et 40% de cellules positives respectivement). Le pourcentage de cellules IP positives après incubation avec les autres polymères est resté inférieur à 10% aux concentrations testées.

Dans le souci de conforter ces résultats, nous avons réalisé le test LDH sur des cellules C2C12 différenciées en myotubes. Les myotubes ont été incubés avec les mêmes quantités croissantes de polymères (sans ADN) que celles mentionnées dans le Tableau 6 dans du milieu sans sérum. Après 2h d'incubation à 37°C, l'activité de la LDH est mesurée. Les pourcentages de relargage de LDH sont présentés dans la Figure 68.

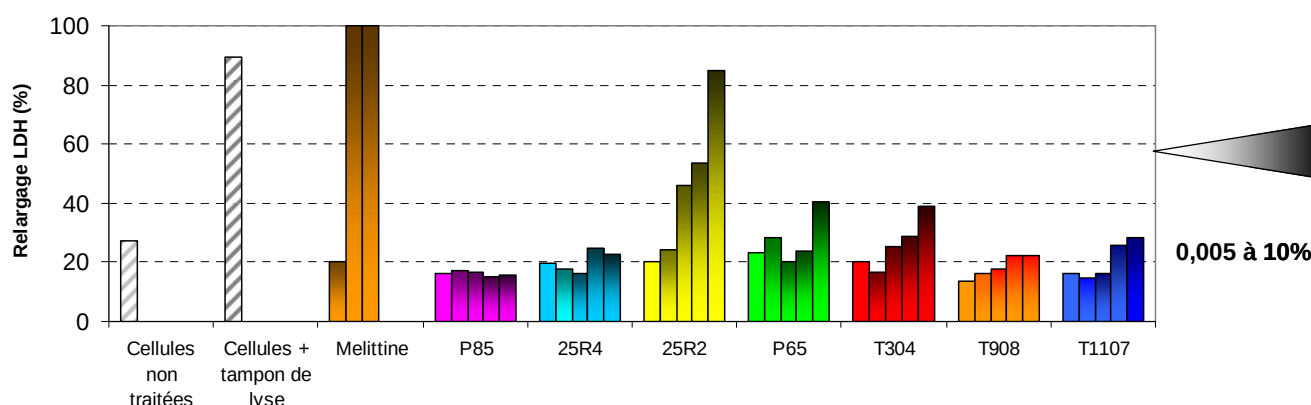


Figure 68 - Test de perméabilité membranaire sur des myotubes C2C12

Les myotubes C2C12 ont été incubés en présence de quantités croissantes de copolymères (0,01, 0,05, 0,01, 0,5, 1% pour P85, P65 ; 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5 pour 25R2 et 25R4 ; 0,1, 0,5, 1, 5, 10 pour T304 et enfin 0,01, 0,1, 0,5, 1 et 5 pour T908 et T1107) dilués dans du milieu sans sérum et incubés à 37°C. 2H après l'incubation, un aliquot du surnageant est prélevé et l'activité LDH est mesurée. Le puits cellules non traitées sert de contrôle négatif et les cellules traitées au tampon de lyse et à la melittine (1 μ M, 10 μ M et 20 μ M) sont les témoins positifs.

L'analyse du test LDH nous permet de conclure que parmi les copolymères testés, le 25R2 est celui ayant l'activité perméabilisante la plus importante. A noter que le P65 et le T304 à leur concentration la plus élevée présentent une légère activité LDH, ce qui suppose une activité de perméabilisation.

Pour finir cette étude nous avons réalisé le test de viabilité cellulaire MTT. Les myotubes C2C12 ont été transfectés par le plasmide SMD₂-Luc_ Δ ITR (2 μ g ADN/puits) en présence de quantités croissantes de copolymères. 30h post-transfection, les cellules ont été incubées en présence de réactif MTT pendant 3 à 4 heures à 37°C. La réaction enzymatique est alors stoppée par l'ajout de DMSO et la

viabilité cellulaire est alors évaluée par mesure de l'absorbance des cellules à 570nm.

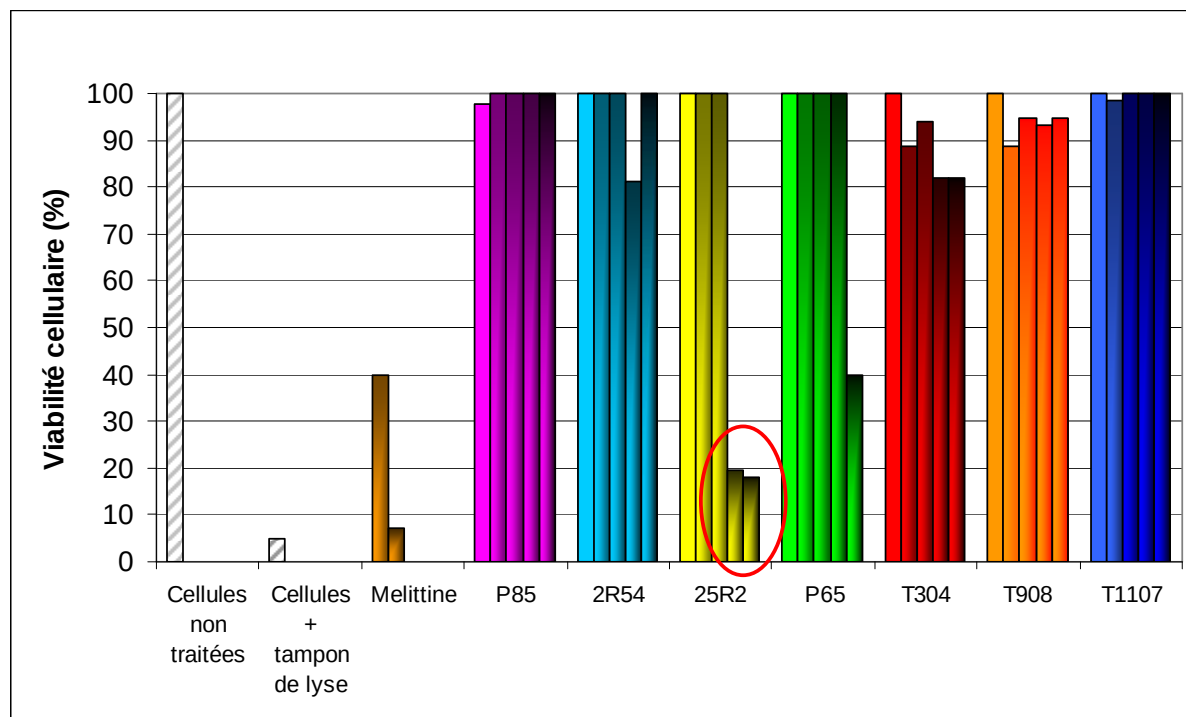


Figure 69 - Mesure de la viabilité cellulaire d'une série de copolymères via le test MTT

Les myotubes C2C12 ont été transfectées en duplicat par le plasmide SMD₂-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits) avec des quantités croissantes de copolymères (0.01, 0.05, 0.01, 0.5, 1% pour P85, P65 ; 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 pour 25R2 et 25R4 ; 0.1, 0.5, 1, 5, 10 pour T304 et enfin 0.01, 0.1, 0.5, 1 et 5 pour T908 et T1107). 30 heures après transfection le surnageant est aspiré et les cellules sont incubées en présence de réactif MTT à 37°C. 3 heures après l'incubation, la réaction enzymatique est stoppée et l'absorbance est alors mesurée à 570nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire comparé aux cellules non traitées. Les cellules traitées au tampon de lyse et à la melittine (1 µM et 10 µM) ont été utilisés pour avoir 100% de mortalité.

Les résultats présentés dans la figure ci-dessus (**Figure 69**) illustrent le fait qu'aucun des copolymères testés n'est toxique pour la cellule, excepté le 25R2 aux concentrations de 0,1 et 0,5% (p/v) et le P65 à la concentration de 1%.

Ainsi, le poloxamère réverse 25R2 semble détenir des propriétés assez voisines de celles du L64.

Conclusion :

Compte tenu des résultats obtenus avec cette nouvelle série de poloxamère (P65 et P85), de poloxamère réverse (25R2 et 25R4) et de poloxamine (Tetronic T304, T908 et T1107), nous pouvons dire qu'il existe une grande flexibilité structurale pour obtenir un gain en transfert de gènes après injection intra-musculaire. Ceci pose évidemment des questions quant au mécanisme d'action de ces composés.

III.2.5. Conclusion sur l'ensemble des copolymères testés

Si l'on reprend l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, nous pouvons affirmer que :

- tous les poloxamères testés ont prouvé qu'ils étaient capables d'améliorer le transfert de gène dans le muscle *in vivo* avec des efficacités assez comparables.
- Pour être efficaces, il semblerait qu'il soit nécessaire que les poloxamères soient utilisés à leur CMC.
- Les copolymères ne sont pas capables de perméabiliser efficacement les membranes des cellules que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, aux concentrations utilisées pour effectuer le transfert de gènes. Ceci suggère que ces composés ne favorisent pas l'entrée de l'ADN dans les fibres suite à une destabilisation transitoire de la membrane plasmique.
- Leur efficacité peut être optimisée en utilisant un promoteur spécifique, en les formulant dans une solution saline adaptée (Tyrode) ou encore en jouant sur la vitesse d'injection et sur la température à l'injection.
- Ils ne semblent pas interagir avec l'ADN mais leur injection simultanée est requise.

Leur mode d'action reste toutefois à découvrir. Nous n'avons pas pu mettre en évidence une relation entre la structure de ces copolymères et leur activité. En effet, ils varient tous par leur masse moléculaire (de 1 650 g/mol pour le tetronic T304 à 25 000 g/mol pour le tetronic T908) et par leur balance hydrophile/hydrophobe (de 20% EO pour le 25R2 à 80% pour le T908). La compréhension de leur mécanisme

d'action représentera un atout afin d'optimiser leur efficacité dans le transfert de gènes.

III.3. Injection des complexes ADN plasmidiques / Acides Biliaires

III.3.1. Introduction

Les dérivés d'acides biliaires ressemblent sur le plan chimique à des molécules détergentes, en ce sens qu'une portion de la molécule est polaire et hydrosoluble tandis que l'autre portion est non polaire et liposoluble (Figure 70, ci-dessous).

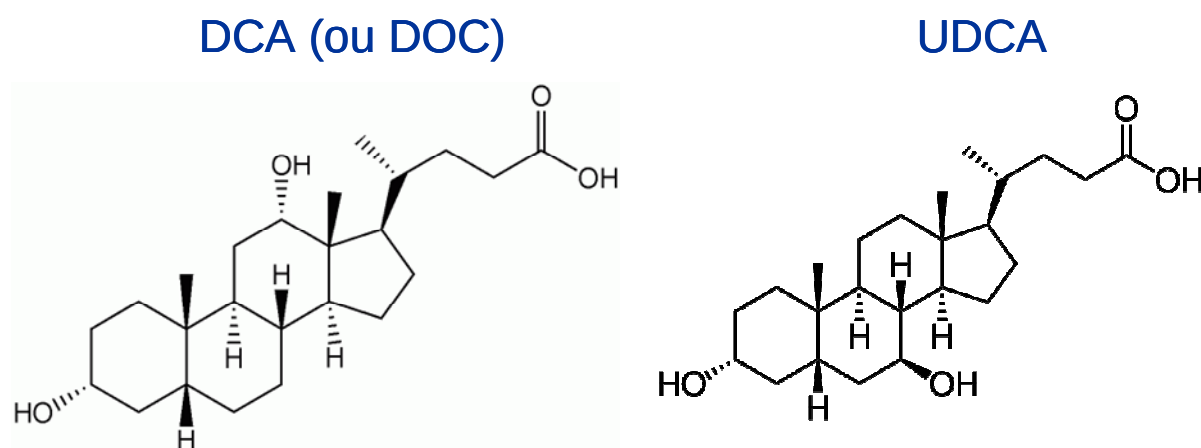


Figure 70 - Structure de l'acide déoxycholique (DCA) et de l'acide ursodéoxycholique (UDCA)

Une fois présents en quantité suffisante, c'est-à-dire lorsqu'ils ont atteint la concentration micellaire critique (CMC), les acides biliaires forment des sphères chargées négativement, appelées micelles simples et sont alors capables de s'insérer dans la bicouche lipidique de la membrane plasmique et ainsi la solubiliser. Leur utilisation en tant qu'agent transfectant, notamment combiné au chitosan (165, 166) ou à la spermine (167) a donné des résultats encourageants.

Au vu de leurs propriétés détergentes (faibles) et leur présence naturelle dans l'organisme, nous avons pensé que cette famille de composés pouvait être intéressante à tester en transfert de gène dans le muscle.

III.3.2. Etude de l'efficacité de transfection des acides biliaires

III.2.3.1 Evaluation de l'efficacité de transfection

Nous avons choisi les composés acide déoxycholique (DOC) et acide ursodéoxycholique (UDCA) afin d'effectuer une comparaison avec notre poloxamère de référence, le P105. Pour cela, 10 µg d'ADN plasmidique CMV_Luc couplé à une gamme de concentrations d'acides biliaires, préparés dans du NaCl 150 mM ont été injectés dans le *tibialis* antérieur de souris Balb/c. Les souris ont été sacrifiées sept jours après l'injection et les muscles ont été prélevés. L'efficacité de transfection des acides biliaires a été comparée à celle du 0,1% P105 préparé dans une solution de NaCl ainsi qu'à celle d'ADN nu (témoin négatif). Les efficacités de transfert de gènes *in vivo* sont reportées dans la figure ci-dessous.

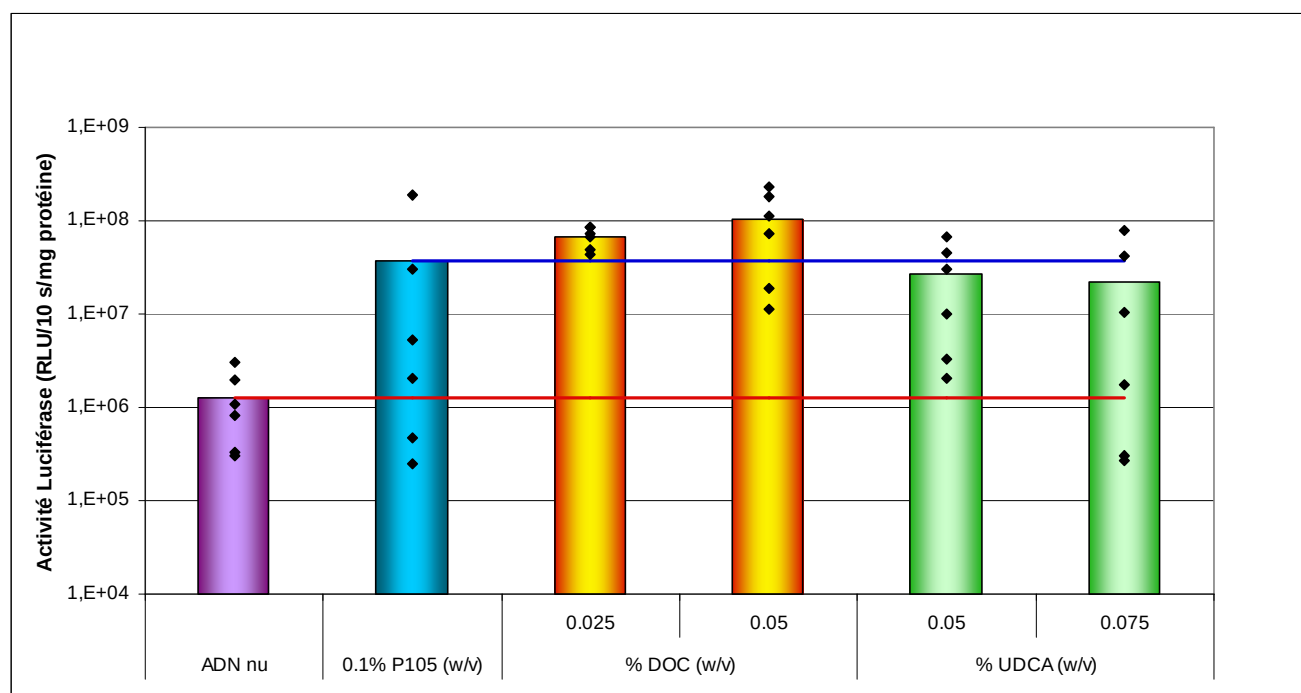


Figure 71 - Comparaison de l'efficacité de transfection des acides biliaires par rapport au poloxamère P105
 Les souris Balb/c ont été injectées avec les complexes ADN/P105 et ADN/Acides biliaires préparés dans une solution de NaCl 150 mM. 7 jours après injection, les muscles (n=6, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine) et comparées à celle obtenue avec le P105 préparé dans du NaCl.

L'efficacité de transfection des sels biliaires est comparée à celles obtenues avec l'ADN nu et 0,1% P105. Comparé à l'ADN nu, le déoxycholate DOC montre un gain de 70 fois supérieur à la concentration 0,025% et 100 fois supérieur à 0,05% DOC. L'ursodéoxycholate affiche aussi un gain (environ un gain de 20 pour les deux concentrations testées) mais celui-ci reste inférieur à celui obtenu avec le DOC. Si on compare les résultats avec le P105, on observe que le DOC a une efficacité de transfection meilleure que celle obtenue avec le P105.

Devant ces résultats prometteurs, nous avons décidé de continuer la suite des expérimentations avec le DOC.

III.2.3.2 Effet de la composition de la solution saline sur l'efficacité de transfection

Pour les mêmes raisons que pour les poloxamères, nous avons voulu savoir si les performances du DOC pouvaient être augmentées en utilisant une solution saline de Tyrode. Pour cela, nous avons injecté les souris Balb/c avec 10 µg de plasmide CMV_Luc couplé au DOC à la concentration de 0,025% préparé dans une solution de NaCl 150 mM ou de Tyrode. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure qui suit :

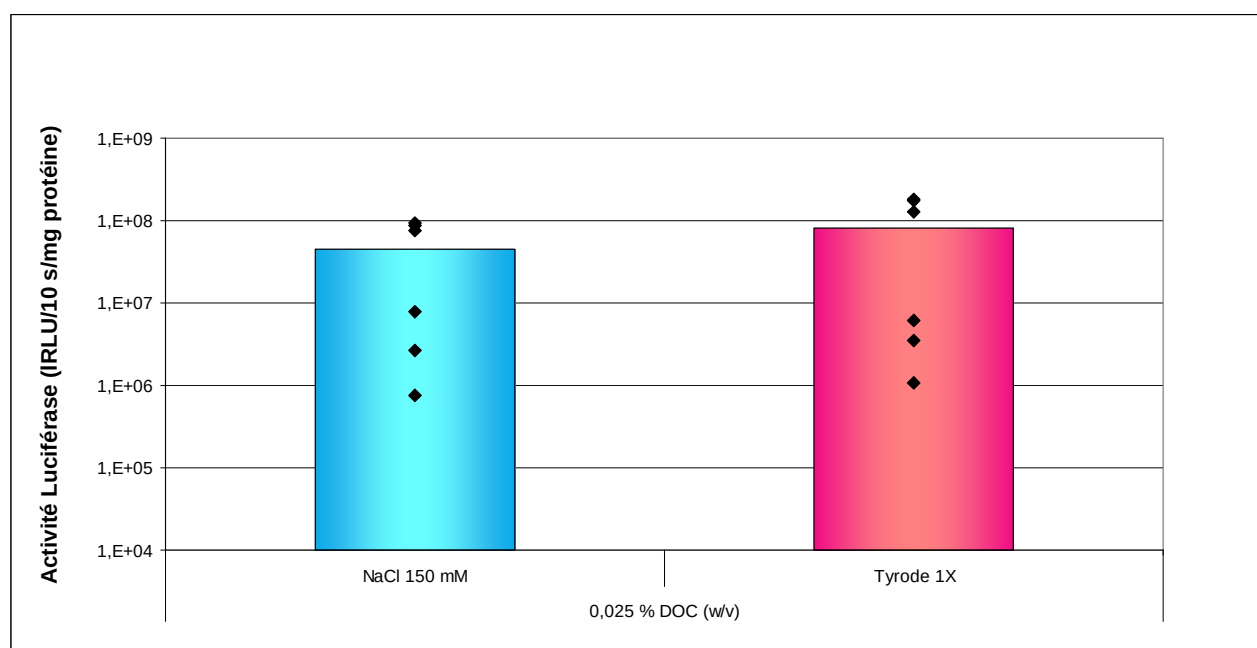


Figure 72 - Comparaison de l'effet de la concentration saline sur l'efficacité de transfection
10 µg de CMV-Luc/0,025% DOC ont été préparés respectivement dans une solution de NaCl 150 mM ou de Tyrode. 7 jours après injection, les muscles (n=6, représentés par des losanges)

ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues avec l'ADN nu et 0,025% DOC. L'efficacité de transfection est donnée en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10 s/mg protéine).

L'efficacité de transfection du DOC formulé dans du tampon Tyrode est comparable à celle obtenue lorsque celui-ci est formulé dans du NaCl 150 mM. Aussi pouvons-nous conclure que la composition de la solution saline n'influe pas sur l'efficacité de transfection du DOC.

III.2.3.3 Evaluation de la perméabilité membranaire

a. Perméabilité membranaire sur les cellules

Afin de vérifier si le DOC avait des propriétés perméabilisantes sur la membrane des cellules, nous avons réalisé un test LDH. Les cellules HepG2 et les myotubes C2C12 ont été incubés avec des quantités croissantes d'acides biliaires (en présence d'ADN) dans du milieu sans sérum. Après 2 h d'incubation à 37°C, l'activité de l'enzyme LDH est mesurée dans le surnageant cellulaire. Les résultats présentés dans la représentent les pourcentages de relargage de LDH avec les cellules HepG2.

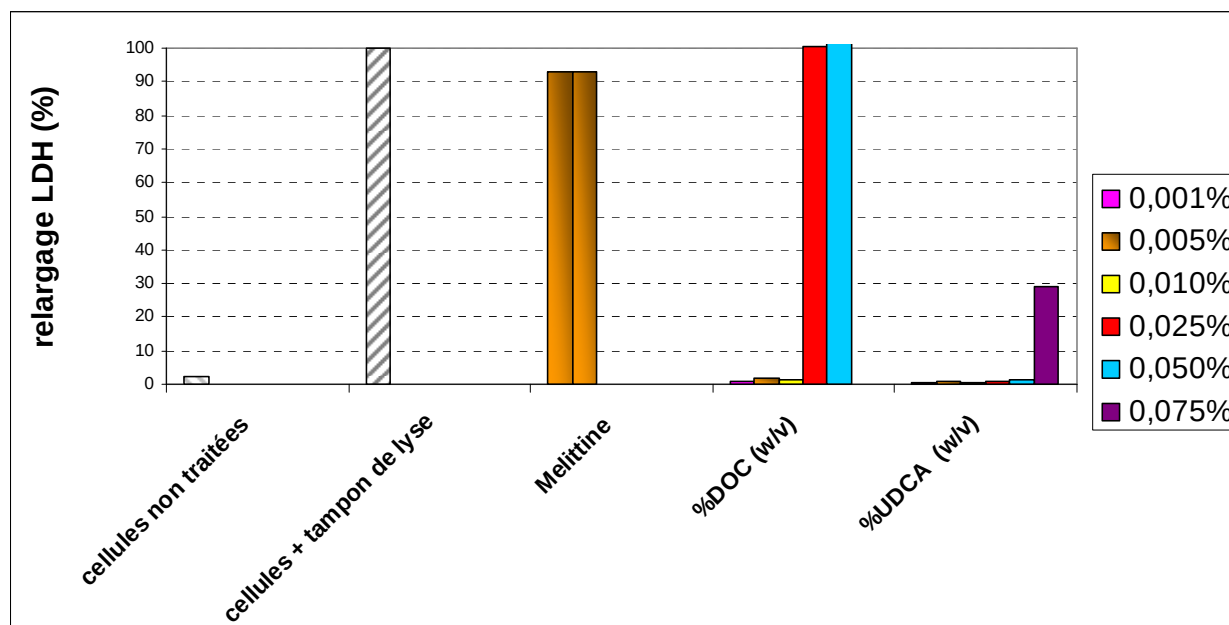


Figure 73 - Test de perméabilité cellulaire LDH sur les cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été incubées en présence de quantités croissantes de DOC (0,001, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05%) et d'UDCA (0,001, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05 et 0,075%) dilués dans du milieu sans sérum et incubés à 37°C. 2h après l'incubation, un aliquot du surnageant est

prélevé et l'activité LDH est mesurée. Le puits cellules non traitées sert de contrôle négatif et les cellules traitées au tampon de lyse et à la melittine (10 μ M et 20 μ M) sont les témoins positifs.

Le contrôle cellules non traitées ne donne que 2% de LDH. Un traitement avec le tampon de lyse ou la melittine donne près de 100% de LDH et sont nos contrôles positifs. Le DOC et l'UDCA donnent un pourcentage de relargage LDH inférieur à 2% en moyenne jusqu'à la concentration 0,01% pour le DOC et 0,05% pour l'UDCA. A la concentration la plus forte, UDCA relarguent plus 30% de LDH, ce qui indique une légère perméabilisation des membranes. L'analyse des résultats pour le DOC nous permet de conclure que celui-ci est capable de perméabiliser les membranes des cellules HepG2 à partir de la concentration 0,025%.

Afin de vérifier ces résultats, nous avons répété l'expérience sur la lignée de myoblastes C2C12. Les conditions du test sont les mêmes que sur les cellules HepG2. Voici les résultats obtenus :

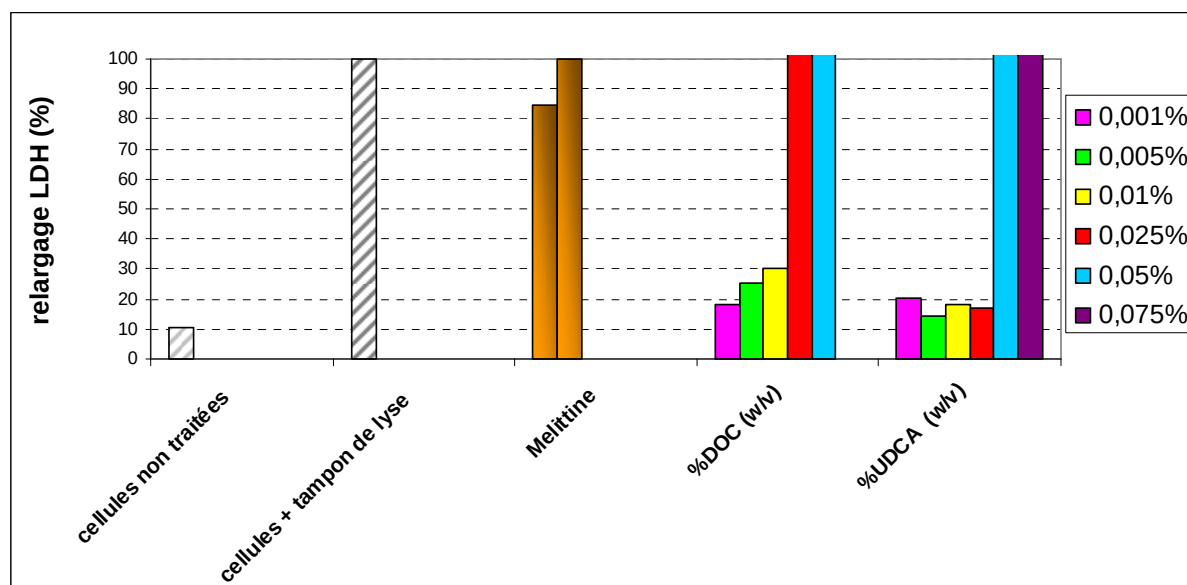


Figure 74 - Test de perméabilité membranaire LDH sur des myotubes C2C12

Le DOC et l'UDCA donnent un pourcentage de relargage LDH inférieur à 30% en moyenne jusqu'à la concentration 0,01% (DOC) et inférieur à 20% en moyenne jusqu'à la concentration 0,025% (UDCA). Aux concentrations les plus fortes, DOC et UDCA relarguent 100% de LDH, comme les témoins positifs.

L'analyse des résultats nous permet de conclure que les acides biliaires DOC et UDCA sont capables de perméabiliser les membranes des myotubes C2C12 à partir des concentrations 0,025% et 0,05% respectivement.

Les résultats avec UDCA sont légèrement différents de ceux obtenus sur les cellules HepG2 mais confirment bien que le DOC perméabilise aux concentrations 0,025 et 0,05%.

Pour compléter cette étude, nous avons réalisé le test de viabilité cellulaire MTT. Les cellules HepG2 (Figure 75) et les myotubes C2C12 (Figure 76) ont été transfectés par le plasmide SMD₂-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits) en présence de quantités croissantes d'acides biliaires. 30 h post-transfection, les cellules ont été incubées en présence de réactif MTT pendant 3 heures à 37°C. La réaction enzymatique est alors stoppée par l'ajout de DMSO et la viabilité cellulaire est évaluée par mesure de l'absorbance des cellules à 570nm.

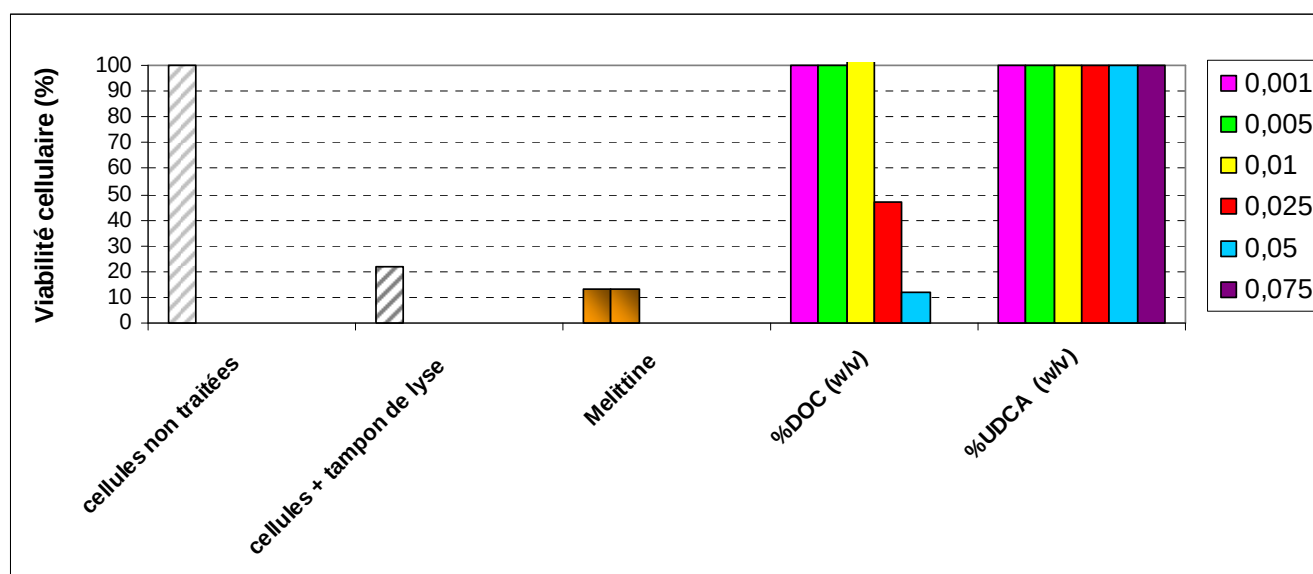


Figure 75 - Test de viabilité cellulaire sur les cellules HepG2

Les cellules HepG2 ont été transfectées en duplicat par le plasmide SMD₂-Luc_ΔITR (2 µg ADN/puits). 30 heures après transfection le surnageant est aspiré et les cellules sont incubées en présence de réactif MTT à 37°C. 3 heures après l'incubation, la réaction enzymatique est stoppée et l'absorbance est alors mesurée à 570 nm. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire comparé aux cellules non traitées. Les cellules traitées au tampon de lyse et à la melittine (10 µM et 20 µM) servent de contrôle positif pour la mortalité cellulaire.

Les cellules non traitées correspondent 100% de viabilité cellulaire. Les cellules traitées au tampon de lyse et à la mellitine possèdent une viabilité cellulaire inférieure à 15%. Les cellules traitées avec l'UDCA possèdent une viabilité comparable à celle des cellules non traitées. Les cellules traitées avec la gamme de DOC voient leur viabilité décroître subitement quand le pourcentage poids/volume atteint 0,025% pour arriver à une viabilité comparable à celle des contrôles positifs (tampon de lyse et melittine) à la concentration 0,05%.

Pour la même raison que celle décrite plus haut, nous avons terminé notre étude de perméabilisation *in vitro* par le test MTT sur les myotubes C2C12. Le test a été réalisé dans les mêmes conditions que pour les cellules HepG2. Les résultats sont présentés dans la figure ci-dessous.

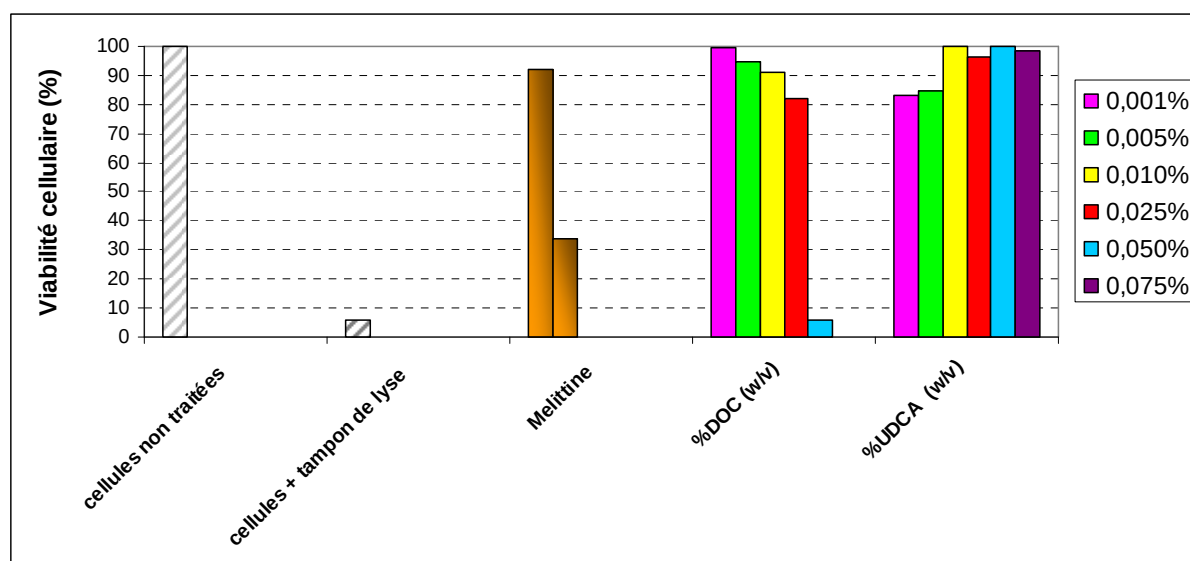


Figure 76 - Test de viabilité cellulaire sur les myotubes C2C12

Tout comme sur les cellules HepG2, seules les cellules traitées avec le DOC voient leur viabilité affaiblie voire nulle à partir d'une utilisation du DOC supérieure à la concentration 0,054% (p/v).

Conclusion sur les expériences de perméabilité *in vitro* :

Les expériences de perméabilité membranaire réalisées sur la lignée HepG2 et sur les myotubes C2C12 concordent quant à leur conclusion. Les tests LDH et MTT ont

permis de mettre en évidence qu'à partir d'une certaine concentration ($> 0,025\%$ p/v), le DOC était capable de perméabiliser les membranes. De plus, l'utilisation du DOC sur les cellules, au-delà de cette concentration, provoque une chute drastique de la viabilité cellulaire, ce qui nous permet d'affirmer que le DOC devient toxique pour les cellules.

b. Perméabilité membranaire *in vivo*

Comme les expériences *in vitro* ne permettent pas prédire ce qui se passe *in vivo*, nous avons cherché à savoir si ces propriétés de perméabilisation membranaire se retrouvaient *in vivo*. Pour cette étude, nous avons utilisé les propriétés du bleu Evans. En pratique, nous avons injecté à des souris Balb/c 100 μ l de bleu Evans par voie intrapéritonéale à J0. Puis, à J1, les souris ont reçu une injection de CMV_Luc mélangé au DOC à 0,025%. Enfin, les souris ont été sacrifiées et leurs muscles prélevés le lendemain (J2). Les résultats sont présentés dans la figure suivante (Figure 77)

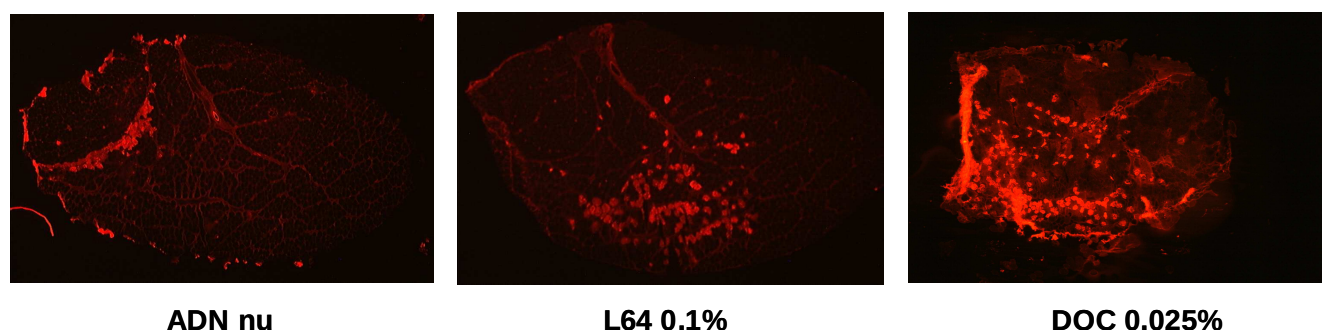


Figure 77 – Test de la perméabilisation *in vivo* du DOC via le bleu Evans

Les souris Balb/c ont été injectées à J0 avec 100 μ L de bleu Evans par voie intrapéritonéale. A J1, elles ont reçu le plasmide CMV_Luc couplé au L64 à 0,1% et au DOC à 0,025%. A J2, les souris ont été sacrifiées et les muscles prélevés. Des coupes histologiques transversales ont été réalisées. Afin de conserver les lames, un traitement à l'acétone refroidi a été pratiqué.

Nous avons utilisé l'ADN nu comme contrôle négatif que l'on peut observer sur la photo de gauche (Figure 77). Comme contrôle positif de perméabilisation membranaire *in vivo*, nous avons utilisé le L64 à 0,1%. (Figure 77, photo du milieu). Nos résultats confirment qu'après injection de DOC à 0,025%, il y a une perméabilisation

significative des fibres (comme révélé par la photo de droite (Figure 77) obtenue par microscopie à fluorescence).

Ainsi, les résultats obtenus pour le marquage Bleu Evans *in vivo* sont en accord avec les tests de perméabilité membranaire pratiqués *in vitro*.

III.2.3.4 Effet de l'électrotransfert couplé à l'acide déoxycholique DOC

Etant donné les propriétés voisines de l'acide déoxycholique, nous avons voulu savoir s'il était possible d'avoir une synergie entre DOC et l'électrotransfert.

Un contrôle ADN nu a été utilisé comme témoin. Chaque groupe de souris a reçu 10 µg de plasmide CMV_luc couplé ou non à 0,1% P105 ou 0,025% DOC. Suite à l'injection, l'électrotransfert a eu lieu dans les conditions standards (200 V/cm, 20 ms, 8 pls, 2 Hz). Les solutions de « complexes » ADN/P105 ont été diluées dans une solution de Tyrode et les ADN/DOC dans une solution de NaCl 150mM. L'efficacité de transfection est reportée dans la figure suivante :

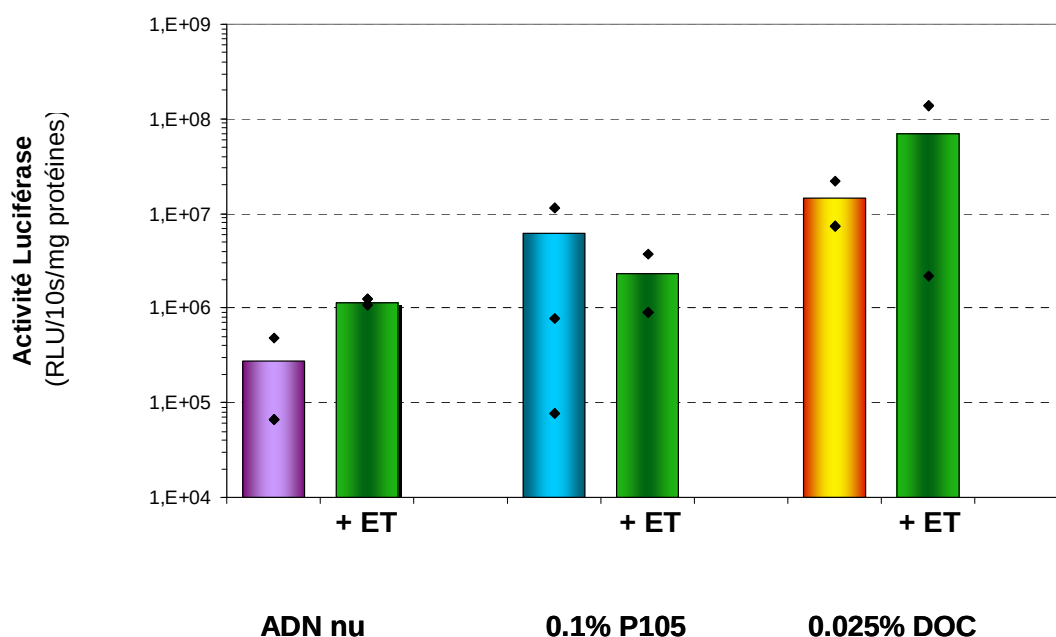


Figure 78 - Couplage DOC et électrotransfert

Les souris Balb/c ont été injectées dans le tibialis antérieur avec 10 µg de plasmide CMV_Luc préparé dans une solution de NaCl 150mM ou de Tyrode complexé à 0,1% P105 puis électroporé (200 V/cm, 8 pls, 20 ms, 2 Hz). 7 jours après injection, les muscles (n=2, représentés par des losanges) ont été prélevés et l'activité luciférase a été mesurée. Les histogrammes représentent les activités moyennes de luciférase obtenues. Les efficacités de transfection sont exprimées en activité luciférase par mg de protéine (RLU/10s/mg protéine).

Comme déjà vu précédemment, l'addition de DOC à 0,025% permet d'augmenter de près d'un facteur 100 l'efficacité de transfection comparé à l'ADN nu. L'addition de l'électrotransfert permet d'augmenter l'efficacité de transfection de l'ADN nu et du DOC à 0,025%. En fait, l'électrotransfert conjugué à l'injection du « complexe » ADN/DOC apporte, en moyenne, un gain de l'ordre d'un facteur 5.

Cependant, afin de vérifier la reproductibilité de cette synergie, il faudrait refaire l'expérience avec plus d'animaux.

III.2.3.5 Transfert de gène chez des souris dystrophiques mdx CV4 avec le gène rapporteur mSeAP

Les résultats obtenus avec le gène codant pour la luciférase étant prometteurs, nous avons voulu compléter nos analyses avec le gène rapporteur mSeAP.

Pour cela, 20 µg d'ADN plasmidique codant pour la mSeAP mélangé à l'acide déoxycholique à 0,025 et 0,05%, préparés dans une solution de NaCl 150 mM ont été injectés dans le *tibialis* antérieur de souris mdx^{CV4}. Les souris mdx^{CV4} sont des souris qui ont un codon stop prématuré dans l'exon 53 de la dystrophine, ce qui conduit à la formation d'une dystrophine tronquée de 71 exons. Les muscles injectés ont été prélevés 7 jours après l'injection et le niveau d'expression de l'alkaline phosphatase circulante a été mesuré.

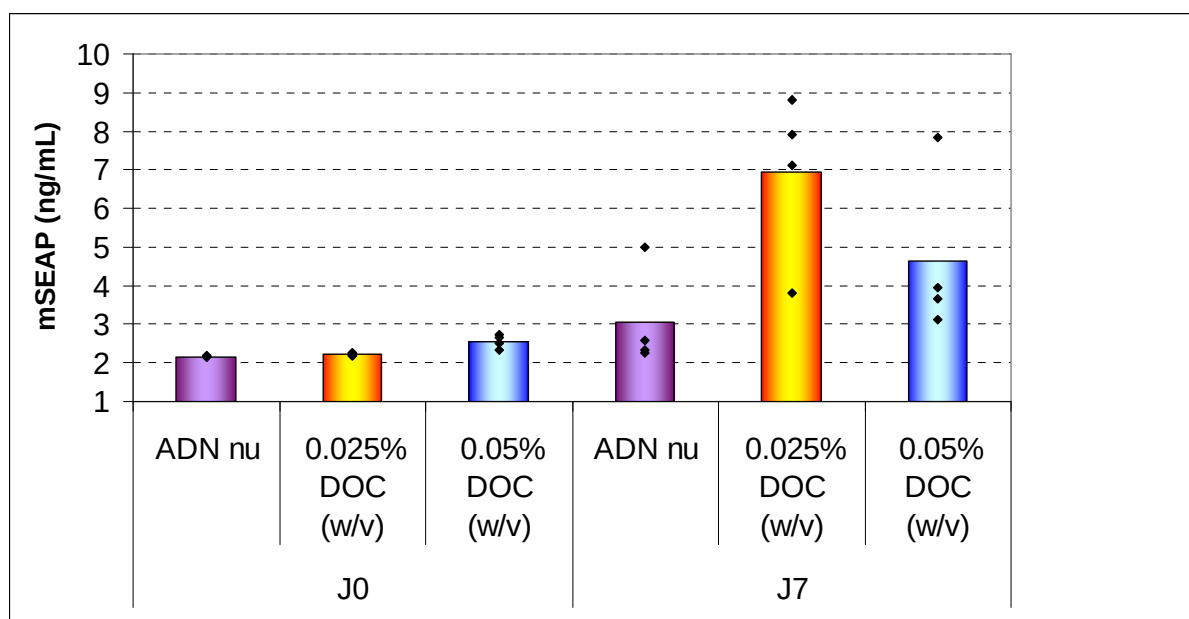


Figure 79 - Transfert de gène avec le gène rapporteur mSeAP

20 µg de plasmide codant pour la mSeAP sous le contrôle du promoteur CMV ont été préparés dans du NaCl 150 mM. Des prélèvements sanguins ont été prélevés avant l'injection (J0) et 7 jours après l'injection (J7) et le niveau de mSeAP a été mesuré. Les histogrammes représentent les activités moyennes de phosphatase alcaline en ng/mL. L'injection d'ADN nu a été utilisée comme point de référence et de comparaison.

La mesure de la concentration de mSeAP à J0 nous permet d'évaluer l'augmentation du niveau de cette enzyme suite à l'injection. L'utilisation du DOC à 0.025% permet d'augmenter le niveau d'expression de la phosphatase alcaline murine sécrétée d'un facteur 2 par rapport aux souris traitées avec la même quantité de plasmide.

III.2.3.6 Transfert de gènes sur des souris gamma-sarcoglycan -/-.

Afin de tester l'efficacité du DOC dans un autre modèle de souris dystrophique, nous avons réalisé une transfection *in vivo* sur des souris gamma-sarcoglycan -/- (γ -sarco). Les souris γ -sarco sont des souris atteintes d'une sarcoglynopathie, qui sont malades à l'état naturel et qui présentent une atteinte du muscle cardiaque assez sévère (168).

La transfection s'est réalisée comme suit :

10 µg d'ADN plasmidique CMV_Luc mélangé au DOC 0,025 et 0,05% préparés dans du NaCl 150 mM ont été injectés dans le *tibialis* antérieur de souris γ -sarco. Les souris ont été sacrifiées sept jours après l'injection et les muscles ont été prélevés. L'efficacité de transfection du DOC a été comparée à celle d'ADN. Les efficacités de transfert de gènes *in vivo* sont reportées dans la figure ci-dessous.

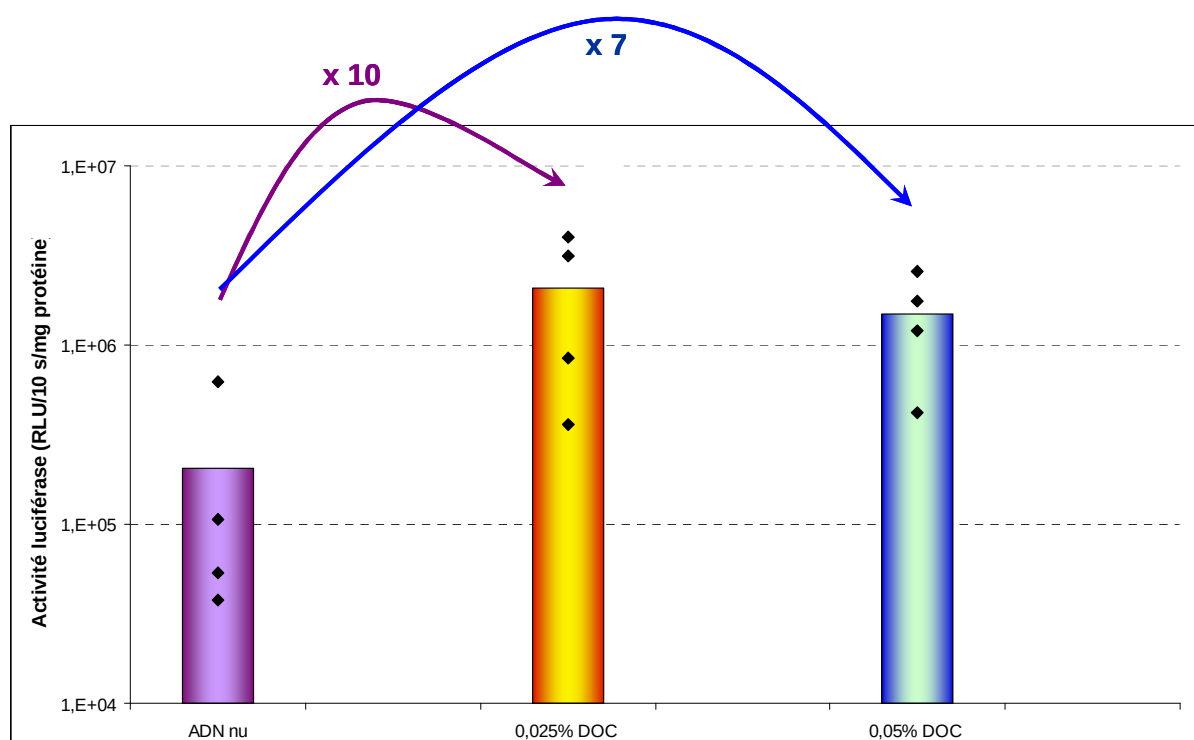


Figure 80 - Efficacité du DOC sur des souris gamma-sarco

L'addition de DOC 0,05% chez les souris malades permet d'améliorer l'efficacité de transfection d'un facteur 7. Le DOC 0,025% permet quant à lui d'améliorer le transfert de gène d'un facteur 10 comparé à l'injection d'ADN nu.

Ces résultats permettent de conclure que le DOC est donc capable d'augmenter de manière significative les niveaux d'un transgène dans une souris dystrophique de type γ -sarco.

III.2.3.7 Transfert de gène *in vivo* avec un gène fonctionnel

Nous avons testé l'efficacité de l'acide déoxycholique sur la souris modèle de la dystrophie musculaire de Duchenne, la souris mdx. Nous avons injecté 10 µg d'un plasmide codant pour une microdystrophine (obtenue de l'équipe de G. Dickson) mélangé ou non à 0,025% DOC. Le gène de la dystrophine a été délété de son extrémité C-terminale afin d'obtenir une microdystrophine (voir matériels et méthodes).

14 jours après l'injection, les muscles ont été prélevés et des coupes histologiques ont été réalisées. Un marquage de la dystrophine a été pratiqué afin de révéler les fibres positives à la dystrophine. En parallèle, un marquage de la laminine a été pratiqué afin de quantifier le nombre total de fibres. Les laminines sont des glycoprotéines qui forment la lame basale, présente sur chaque fibre musculaire.

Voici les résultats obtenus :

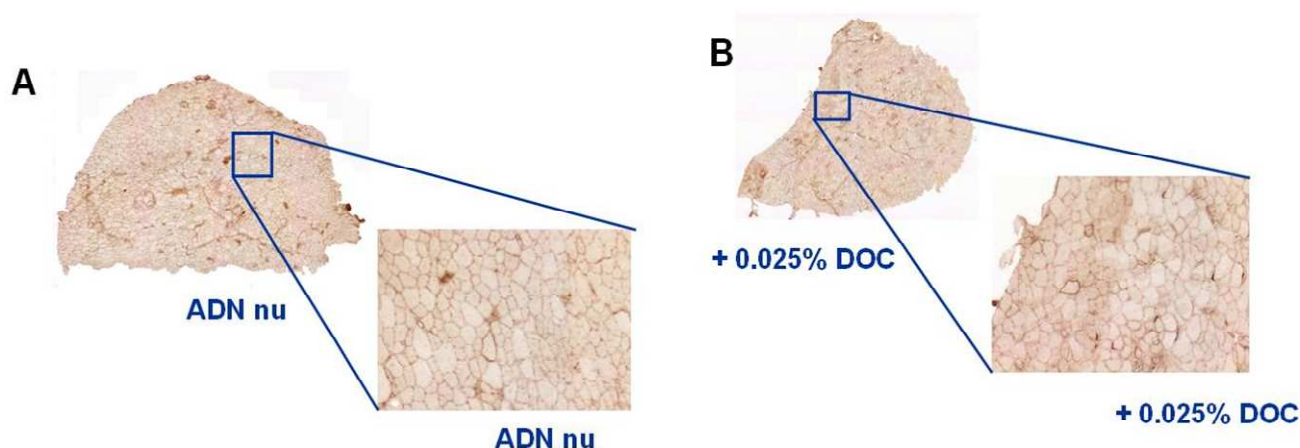


Figure 81 - Coupes histologiques obtenues suite à l'injection de microdystrophine

Des coupes de 8 µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat. Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps primaire anti-dystrophine NCL-Dys 2 (anticorps monoclonal de souris dirigé contre la dystrophine, dilué au 1 : 20 dans une solution de PBS, 2% SVF, Novacastra) pendant au moins 2 heures à température ambiante. Les coupes ont ensuite été incubées avec l'anticorps secondaire (pendant 1 heure à température ambiante en chambre humide et à l'obscurité). Après traitement à la DAB-péroxydase, les lames ont été montées à l'Eukitt (Fluka). Les coupes ont été observées au microscope (Nikon eclipse E600) et les images ont été capturées par une caméra CCD (Sony) avant d'être traitées par les logiciels Cartograph et Ellix (Microvision, Evry) pour estimer le nombre de fibres dystrophine positives.

Malheureusement, les résultats observés n'ont pas été à la hauteur de nos attentes. En effet, l'injection de microdystrophine couplée au DOC ne permet pas de restaurer la dystrophine. Le marquage ADN nu et ADN/DOC est très comparable : les quelques fibres marquées sont des fibres révertantes connues chez la souris mdx.

Conclusion :

L'acide déoxycholique est une molécule qui mérite notre attention. En effet, le DOC est capable d'améliorer le transfert de gène avec une efficacité égale, voire supérieure, à celle des poloxamères. Les tests effectués *in vitro* et *in vivo* donnent à penser que le DOC pourrait améliorer l'entrée de l'ADN dans les fibres grâce à une perméabilisation transitoire. Ceci reste cependant à être démontré plus clairement. Les résultats obtenus avec un gène rapporteur dans le modèle γ -sarco sont encourageants. Par contre, les résultats avec la cassette microdystrophine chez le modèle mdx sont décevants.

Des études plus poussées chez des modèles dystrophiques avec différentes cassettes d'expression « thérapeutiques » devront être réalisées afin de conclure quant au potentiel réel du DOC pour ce type d'approches. Enfin, il reste également à poursuivre des études mécanistiques afin de mieux comprendre son mode d'action.

Discussion et *Perspectives*

IV. Discussion et perspectives

Notre projet initial était d'utiliser l'électrotransfert pour transférer des gènes thérapeutiques chez la souris mdx. Cependant, nous avons rencontrés de nombreux obstacles dus à la défaillance du matériel. Tous les résultats générés avec l'ancien appareillage ont dû être répétés après l'acquisition du nouvel électroporateur BTX. Aussi, nous avons dû relancer une série d'expériences afin de vérifier le bon fonctionnement du nouvel appareil ainsi que son calibrage.

Dans un premier temps, nous avons voulu reproduire les résultats rapportés dans la littérature mais les gains que nous avons obtenus n'étaient pas comparables à ceux publiés. En effet, malgré l'utilisation du nouveau générateur et des nouvelles plaques, en utilisant le gène rapporteur codant pour la luciférase, sous les conditions suivantes d'électrotransfert : 200 V/cm, 8 pls, 20 ms, 2 Hz nous avons obtenu un facteur 10 fois supérieur à celui de l'ADN nu. La littérature décrit un facteur 100 à 1000. De plus, après analyse des coupes histologiques, nous avons observé de nombreux dommages tissulaires.

Aussi, avons-nous décidé de nous consacrer à l'étude de nouveaux systèmes de vectorisation non virale.

Pour commencer notre étude, nous avons évalué l'activité de plusieurs copolymères ainsi que d'acides biliaires. Nous discuterons dans un premier temps les résultats obtenus avec les acides biliaires.

Les résultats indiquent que les acides biliaires DOC et UDCA permettent de significativement augmenter les niveaux d'expression après injection intramusculaire. En effet, le DOC à la concentration 0,025% a permis d'améliorer l'efficacité de transfert de gène d'un facteur 70. Ces résultats sont proches de ceux obtenus avec l'électrotransfert d'après la littérature. Aussi, nous avons voulu tester si la combinaison de l'électrotransfert suite à l'injection du DOC mélangé à l'ADN nu permettait d'améliorer l'efficacité de transfection. Le fait d'ajouter l'électrotransfert à l'injection du « complexe » ADN/DOC a apporté un gain de l'ordre d'un facteur 5. Les résultats obtenus en combinant le DOC dilué dans le NaCl 150

mM avec le gène rapporteur luciférase sur des souris dystrophiques ont montré que l'efficacité de transfection était augmentée d'un facteur 10. Cependant, les résultats préliminaires obtenus suite à l'injection du gène thérapeutique codant pour la microdystrophine sur des souris mdx ont été décevants.

Afin de mieux comprendre le mode d'action des acides biliaires, nous nous sommes interrogés sur une éventuelle propriété de perméabilisation membranaire. Pour cela, deux essais différents *in vitro* ont été testés. Les résultats indiquent que le déoxycholate possède une activité perméabilisante quand il est utilisé à la concentration de 0,025%. Les expériences *in vivo* basées sur l'utilisation du marqueur Bleu Evans confirment les observations faites *in vitro*, à savoir qu'à la concentration utilisée pour la transfection d'ADN plasmidique, une faible perméabilisation est observée. Ces résultats ne permettent pas d'affirmer un rôle de déstabilisation membranaire mais ils suggèrent néanmoins qu'une faible perméabilisation doit être requise pour produire une expression du gène rapporteur supérieure à celle obtenue suite à l'injection d'ADN nu.

Maintenant, discutons des résultats que nous avons obtenus avec les copolymères amphipiles multi-bloc.

Récemment, il a été rapporté que les copolymères tri-blocs amphiphiles, comme les poloxamères, étaient capables d'augmenter significativement les niveaux d'expression d'un gène porté par un ADN plasmidique (101). Après ces résultats prometteurs, il est important de comprendre le mécanisme par lequel les copolymères agissent pour être capable d'améliorer davantage leur efficacité.

Dans ce travail de thèse, nous avons évalué l'activité *in vitro* et *in vivo* de plusieurs copolymères différant par leur poids moléculaire et/ou par leur balance hydrophile/hydrophobe. Les résultats indiquent que tous les poloxamères ont significativement augmenté les niveaux d'expression après injection intramusculaire. Puisque l'efficacité de tous les polymères est très semblable, cela suggère qu'il existe une flexibilité significative en termes de poids moléculaire et balance hydrophile/hydrophobe pour améliorer la transfection.

Il a été précédemment rapporté que la formulation d'ADN et de F68 dans une solution de Tyrode était capable d'améliorer l'efficacité de transfection (155). Dans

cette étude, nous montrons que c'est aussi le cas avec le copolymère P105. Les résultats obtenus en combinant le P105 dilué dans le Tyrode avec le gène rapporteur LacZ ont montré que plus de 30% des fibres musculaires exprimaient le transgène. De tels pourcentages permettent d'envisager des applications comme la production locale d'un facteur thérapeutique sécrété. Une des faiblesses du transfert de gène médié par les poloxamères comparé à l'électrotransfert est la grande variabilité des effets obtenus. En vue d'éventuels applications cliniques, il sera important d'améliorer la reproductibilité des résultats obtenus par cette approche.

Les faibles exigences structurales pour obtenir une augmentation de l'expression du transgène sont intrigantes et soulèvent la question du mode d'action des poloxamères. Plusieurs publications ont montré que les poloxamères étaient capables de déstabiliser les bicouches lipidiques membranaires (156, 169). Ainsi, nous nous sommes demandés si les copolymères amélioraient l'expression du transgène en perméabilisant la membrane cellulaire.

Afin de répondre à cette question, nous avons tout d'abord lancés deux essais différents *in vitro*. Les résultats indiquent que parmi les 12 copolymères testés, seuls le L64 et le 25R2 ont montré une certaine activité perméabilisante quand ils étaient utilisés aux concentrations efficaces pour le transfert de gène *in vivo* (c'est-à-dire 0,1% pour le L64 et 0,05% pour le 25R2). D'autre part, il doit être souligné que tous les poloxamères possèdent – aux concentrations les plus élevées testées (sauf le P85) - des propriétés perméabilisantes comme le montre le test LDH sur le myotubes C2C12. Les expériences *in vivo* basées sur l'utilisation du marqueur Bleu Evans confirment les observations faites *in vitro*, à savoir qu'aux concentrations utilisées pour la transfection d'ADN plasmidique, la perméabilisation est limitée à quelques fibres musculaires. Bien que ces résultats ne permettent pas d'exclure un rôle de déstabilisation membranaire dans le processus de transfection médiée par les poloxamères, ils suggèrent néanmoins que la perméabilisation doit être modérée afin de produire une expression du gène rapporteur supérieure à celle obtenue suite à l'injection d'ADN nu.

De précédents travaux ont montré que les poloxamères activaient les voies de signalisation du NF- κ B. Celui-ci agit à deux niveaux : il permet d'augmenter la transcription des gènes et d'améliorer la translocation nucléaire de l'ADN

plasmidique. Cependant, ces deux évènements sont dépendants de la présence de sites de liaison au NF- κ B sur l'ADN plasmidique.

Il reste toutefois une interrogation : pourquoi une administration simultanée d'ADN et de poloxamère est requise ? Ce dernier point mérite clairement de nouvelles études jusqu'à ce qu'une compréhension complète du mode d'action des poloxamères soit connu. Cette compréhension permettra d'optimiser ces composés afin d'obtenir des résultats encore plus efficaces que ceux que nous avons pu obtenir dans nos travaux de recherche.

Conclusion

V. Conclusion

Au cours de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence que le transfert de gène non viral avait sa place dans le monde de la thérapie génique. En effet, même s'il reste des améliorations à effectuer, les résultats obtenus avec les copolymères et les sels biliaries sont prometteurs et le potentiel pour une utilisation clinique vétérinaire et/ou humaine existe. Toutefois, pour y arriver, il reste encore à résoudre de nombreuses questions, auxquelles je l'espère, la communauté scientifique trouvera des réponses très prochainement.

Bibliographie

VI. Bibliographie

1. Kren, B. T., and Steer, C. J. 2002. The application of DNA repair vectors to gene therapy. *Curr Opin Biotechnol* **13**: 473.
2. Yin, W. X., Wu, X. S., Liu, G., Li, Z. H., Watt, R. M., Huang, J. D., Liu, D. P., and Liang, C. C. 2005. Targeted correction of a chromosomal point mutation by modified single-stranded oligonucleotides in a GFP recovery system. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 1032.
3. Muslimov, G. F. 2008. Role of epidermal growth factor gene in the development of pancreatic cancer and efficiency of inhibitors of this gene in the treatment of pancreatic carcinoma. *Bull Exp Biol Med* **145**: 535.
4. Malik, I., Garrido, M., Bahr, M., Kugler, S., and Michel, U. 2006. Comparison of test systems for RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* **341**: 245.
5. Ren, J., Jin, P., Wang, E., Marincola, F. M., and Stroncek, D. F. 2009. MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med* **7**: 20.
6. Meister, G., and Tuschl, T. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**: 343.
7. Goyenvalle, A., Vulin, A., Fougerousse, F., Leturcq, F., Kaplan, J. C., Garcia, L., and Danos, O. 2004. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**: 1796.
8. Wadman, M. 1998. Germline gene therapy 'must be spared excessive regulation'. *Nature* **392**: 317.
9. Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J. L., Bousso, P., Deist, F. L., and Fischer, A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* **288**: 669.
10. Mahato, R. I., Takakura, Y., and Hashida, M. 1997. Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **14**: 133.
11. Lechardeur, D., Sohn, K. J., Haardt, M., Joshi, P. B., Monck, M., Graham, R. W., Beatty, B., Squire, J., O'Brodivich, H., and Lukacs, G. L. 1999. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Ther* **6**: 482.
12. Mehier-Humbert, S., and Guy, R. H. 2005. Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells. *Adv Drug Deliv Rev* **57**: 733.
13. Mann, R., Mulligan, R. C., and Baltimore, D. 1983. Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell* **33**: 153.
14. El-Aneed, A. 2004. An overview of current delivery systems in cancer gene therapy. *J Control Release* **94**: 1.
15. Thomas, C. E., Ehrhardt, A., and Kay, M. A. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* **4**: 346.
16. Kay, M. A., Glorioso, J. C., and Naldini, L. 2001. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* **7**: 33.
17. Wei, C. M., Gibson, M., Spear, P. G., and Scolnick, E. M. 1981. Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* **39**: 935.

18. Fassati, A., Wells, D. J., Sgro Serpente, P. A., Walsh, F. S., Brown, S. C., Strong, P. N., and Dickson, G. 1997. Genetic correction of dystrophin deficiency and skeletal muscle remodeling in adult MDX mouse via transplantation of retroviral producer cells. *J Clin Invest* **100**: 620.
19. Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., and Verma, I. M. 1997. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet* **17**: 314.
20. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol* **15**: 871.
21. Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Cartaud, J., Briand, P., Kaplan, J. C., Perricaudet, M., and et al. 1993. Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* **361**: 647.
22. Green, N. K., and Seymour, L. W. 2002. Adenoviral vectors: systemic delivery and tumor targeting. *Cancer Gene Ther* **9**: 1036.
23. St George, J. A. 2003. Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors. *Gene Ther* **10**: 1135.
24. Athanasopoulos, T., Graham, I. R., Foster, H., and Dickson, G. 2004. Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther* **11 Suppl 1**: S109.
25. Donahue, B. A., McArthur, J. G., Spratt, S. K., Bohl, D., Lagarde, C., Sanchez, L., Kaspar, B. A., Sloan, B. A., Lee, Y. L., Danos, O., and Snyder, R. O. 1999. Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery. *J Gene Med* **1**: 31.
26. Linden, R. M., and Woo, S. L. 1999. AAVant-garde gene therapy. *Nat Med* **5**: 21.
27. During, M. J., Xu, R., Young, D., Kaplitt, M. G., Sherwin, R. S., and Leone, P. 1998. Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector. *Nat Med* **4**: 1131.
28. Li, S., and Huang, L. 2000. Nonviral gene therapy: promises and challenges. *Gene Ther* **7**: 31.
29. Hengge, U. R., Chan, E. F., Foster, R. A., Walker, P. S., and Vogel, J. C. 1995. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nat Genet* **10**: 161.
30. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**: 1465.
31. Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., and Jani, A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* **1**: 363.
32. Levy, M. Y., Barron, L. G., Meyer, K. B., and Szoka, F. C., Jr. 1996. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Ther* **3**: 201.
33. Selmaj, K., Kowal, C., Walczak, A., Nowicka, J., and Raine, C. S. 2000. Naked DNA vaccination differentially modulates autoimmune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* **111**: 34.
34. Krieg, A. M. 1999. Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy. *J Gene Med* **1**: 56.
35. Krieg, A. M., Yi, A. K., and Hartmann, G. 1999. Mechanisms and therapeutic applications of immune stimulatory cpG DNA. *Pharmacol Ther* **84**: 113.

36. Lu, Q. L., Bou-Gharios, G., and Partridge, T. A. 2003. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther* **10**: 131.
37. Mahato, R. I. 1999. Non-viral peptide-based approaches to gene delivery. *J Drug Target* **7**: 249.
38. Houk, B. E., Martin, R., Hochhaus, G., and Hughes, J. A. 2001. Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat. *Pharm Res* **18**: 67.
39. Davis, H. L., Whalen, R. G., and Demeneix, B. A. 1993. Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* **4**: 151.
40. Scherman, D., Bessodes, M., Cameron, B., Herscovici, J., Hofland, H., Pitard, B., Soubrier, F., Wils, P., and Crouzet, J. 1998. Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells. *Curr Opin Biotechnol* **9**: 480.
41. Byk, G., Dubertret, C., Escriou, V., Frederic, M., Jaslin, G., Rangara, R., Pitard, B., Crouzet, J., Wils, P., Schwartz, B., and Scherman, D. 1998. Synthesis, activity, and structure--activity relationship studies of novel cationic lipids for DNA transfer. *J Med Chem* **41**: 229.
42. Pitard, B., Aguerre, O., Airiau, M., Lachages, A. M., Boukhnikachvili, T., Byk, G., Dubertret, C., Herviou, C., Scherman, D., Mayaux, J. F., and Crouzet, J. 1997. Virus-sized self-assembling lamellar complexes between plasmid DNA and cationic micelles promote gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 14412.
43. Remy, J. S., Sirlin, C., Vierling, P., and Behr, J. P. 1994. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjug Chem* **5**: 647.
44. Farhood, H., Serbina, N., and Huang, L. 1995. The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochim Biophys Acta* **1235**: 289.
45. Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., Scherman, D., Crouzet, J., and Pitard, B. 1999. Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res* **27**: 3792.
46. Pitard, B., Oudrhiri, N., Vigneron, J. P., Hauchecorne, M., Aguerre, O., Toury, R., Airiau, M., Ramasawmy, R., Scherman, D., Crouzet, J., Lehn, J. M., and Lehn, P. 1999. Structural characteristics of supramolecular assemblies formed by guanidinium-cholesterol reagents for gene transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2621.
47. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M., and Danielsen, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 7413.
48. Voinea, M., and Simionescu, M. 2002. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs. *J Cell Mol Med* **6**: 465.
49. Boussif, O., Delair, T., Brua, C., Veron, L., Pavirani, A., and Kolbe, H. V. 1999. Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro. *Bioconjug Chem* **10**: 877.
50. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. 1995. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7297.
51. Abdallah, B., Hassan, A., Benoist, C., Goula, D., Behr, J. P., and Demeneix, B. A. 1996. A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine. *Hum Gene Ther* **7**: 1947.
52. Boletta, A., Benigni, A., Lutz, J., Remuzzi, G., Soria, M. R., and Monaco, L. 1997. Nonviral gene delivery to the rat kidney with polyethylenimine. *Hum Gene Ther* **8**: 1243.

53. Lemkine, G. F., Goula, D., Becker, N., Paleari, L., Levi, G., and Demeneix, B. A. 1999. Optimisation of polyethylenimine-based gene delivery to mouse brain. *J Drug Target* **7**: 305.
54. Mahato, R. I., Monera, O. D., Smith, L. C., and Rolland, A. 1999. Peptide-based gene delivery. *Curr Opin Mol Ther* **1**: 226.
55. Kichler, A., Pages, J. C., Leborgne, C., Druillennec, S., Lenoir, C., Coulaud, D., Delain, E., Le Cam, E., Roques, B. P., and Danos, O. 2000. Efficient DNA transfection mediated by the C-terminal domain of human immunodeficiency virus type 1 viral protein R. *J Virol* **74**: 5424.
56. Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. 2000. Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers* **55**: 4.
57. Zhou, X., and Huang, L. 1994. DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action. *Biochim Biophys Acta* **1189**: 195.
58. Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., and Welsh, M. J. 1995. Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem* **270**: 18997.
59. Labat-Moleur, F., Steffan, A. M., Brisson, C., Perron, H., Feugeas, O., Furstenberger, P., Oberling, F., Brambilla, E., and Behr, J. P. 1996. An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines. *Gene Ther* **3**: 1010.
60. Zuhorn, I. S., Kalicharan, R., and Hoekstra, D. 2002. Lipoplex-mediated transfection of mammalian cells occurs through the cholesterol-dependent clathrin-mediated pathway of endocytosis. *J Biol Chem* **277**: 18021.
61. Matsui, H., Johnson, L. G., Randell, S. H., and Boucher, R. C. 1997. Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells. *J Biol Chem* **272**: 1117.
62. Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., and Verkman, A. S. 2000. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* **275**: 1625.
63. Luo, D., and Saltzman, W. M. 2000. Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol* **18**: 33.
64. Escriou, V., Carriere, M., Bussone, F., Wils, P., and Scherman, D. 2001. Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. *J Gene Med* **3**: 179.
65. Pollard, H., Remy, J. S., Loussouarn, G., Demolombe, S., Behr, J. P., and Escande, D. 1998. Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells. *J Biol Chem* **273**: 7507.
66. Zauner, W., Brunner, S., Buschle, M., Ogris, M., and Wagner, E. 1999. Differential behaviour of lipid based and polycation based gene transfer systems in transfecting primary human fibroblasts: a potential role of polylysine in nuclear transport. *Biochim Biophys Acta* **1428**: 57.
67. Wells, D. J. 2004. Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods. *Gene Ther* **11**: 1363.
68. Capecchi, M. R. 1980. High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells. *Cell* **22**: 479.
69. Gordon, J. W., Scangos, G. A., Plotkin, D. J., Barbosa, J. A., and Ruddle, F. H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 7380.
70. Gordon, J. W., and Ruddle, F. H. 1983. Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection. *Methods Enzymol* **101**: 411.

71. Fynan, E. F., Webster, R. G., Fuller, D. H., Haynes, J. R., Santoro, J. C., and Robinson, H. L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11478.
72. Klein, R. M., Wolf, E. D., Wu, R., and Sanford, J. C. 1992. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987. *Biotechnology* **24**: 384.
73. Larregina, A. T., Watkins, S. C., Erdos, G., Spencer, L. A., Storkus, W. J., Beer Stolz, D., and Falo, L. D., Jr. 2001. Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells. *Gene Ther* **8**: 608.
74. Deng, C. X., Sieling, F., Pan, H., and Cui, J. 2004. Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol* **30**: 519.
75. Huber, P. E., Mann, M. J., Melo, L. G., Ehsan, A., Kong, D., Zhang, L., Rezvani, M., Peschke, P., Jolesz, F., Dzau, V. J., and Hynynen, K. 2003. Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery. *Gene Ther* **10**: 1600.
76. Lu, Q. L., Liang, H. D., Partridge, T., and Blomley, M. J. 2003. Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther* **10**: 396.
77. Herweijer, H., and Wolff, J. A. 2003. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther* **10**: 453.
78. Qiao, C., Li, J., Zheng, H., Bogan, J., Li, J., Yuan, Z., Zhang, C., Bogan, D., Kornegay, J., and Xiao, X. 2008. Hydrodynamic limb vein injection of AAV8 canine myostatin propeptide gene in normal dogs enhances muscle growth. *Hum Gene Ther*.
79. Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, P. H. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1**: 841.
80. Belehradek, J., Jr., Orlowski, S., Ramirez, L. H., Pron, G., Poddevin, B., and Mir, L. M. 1994. Electroporation of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin. *Biochim Biophys Acta* **1190**: 155.
81. Belehradek, M., Domenge, C., Lubinski, B., Orlowski, S., Belehradek, J., Jr., and Mir, L. M. 1993. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I-II trial. *Cancer* **72**: 3694.
82. Titomirov, A. V., Sukharev, S., and Kistanova, E. 1991. In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* **1088**: 131.
83. Heller, R., Jaroszeski, M., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R., Wands, J., and Nicolau, C. 1996. In vivo gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett* **389**: 225.
84. Mir, L. M., Bureau, M. F., Rangara, R., Schwartz, B., and Scherman, D. 1998. Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C R Acad Sci III* **321**: 893.
85. Aihara, H., and Miyazaki, J. 1998. Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* **16**: 867.
86. Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., and Teissie, J. 1998. In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* **16**: 168.
87. Suzuki, T., Shin, B. C., Fujikura, K., Matsuzaki, T., and Takata, K. 1998. Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation. *FEBS Lett* **425**: 436.
88. Bettan, M., Emmanuel, F., Darteil, R., Caillaud, J. M., Soubrier, F., Delaere, P., Branelec, D., Mahfoudi, A., Duverger, N., and Scherman, D. 2000. High-level protein

- secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol Ther* **2**: 204.
89. Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., and Scherman, D. 1999. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 4262.
 90. Bureau, M. F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L. M., and Scherman, D. 2000. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim Biophys Acta* **1474**: 353.
 91. Scherman, D., Bigey, P., and Bureau, M. F. 2002. Applications of plasmid electrotransfer. *Technol Cancer Res Treat* **1**: 351.
 92. Mathiesen, I. 1999. Electroporabilization of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Ther* **6**: 508.
 93. Teissie, J., and Rols, M. P. 1993. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporabilization. *Biophys J* **65**: 409.
 94. Faurie, C., Golzio, M., Moller, P., Teissie, J., and Rols, M. P. 2003. Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer. *DNA Cell Biol* **22**: 777.
 95. Valic, B., Golzio, M., Pavlin, M., Schatz, A., Faurie, C., Gabriel, B., Teissie, J., Rols, M. P., and Miklavcic, D. 2003. Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment. *Eur Biophys J* **32**: 519.
 96. Faurie, C., Phez, E., Golzio, M., Vossen, C., Lesbordes, J. C., Delteil, C., Teissie, J., and Rols, M. P. 2004. Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1665**: 92.
 97. Ohashi, S., Kubo, T., Kishida, T., Ikeda, T., Takahashi, K., Arai, Y., Terauchi, R., Asada, H., Imanishi, J., and Mazda, O. 2002. Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation. *Biochem Biophys Res Commun* **293**: 1530.
 98. Hartikka, J., Sukhu, L., Buchner, C., Hazard, D., Bozoukova, V., Margalith, M., Nishioka, W. K., Wheeler, C. J., Manthorp, M., and Sawdey, M. 2001. Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther* **4**: 407.
 99. Durieux, A. C., Bonnefoy, R., Busso, T., and Freyssen, D. 2004. In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage. *J Gene Med* **6**: 809.
 100. Mumper, R. J., Duguid, J. G., Anwer, K., Barron, M. K., Nitta, H., and Rolland, A. P. 1996. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res* **13**: 701.
 101. Lemieux, P., Guerin, N., Paradis, G., Proulx, R., Chistyakova, L., Kabanov, A., and Alakhov, V. 2000. A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* **7**: 986.
 102. Pitard, B., Pollard, H., Agbulut, O., Lambert, O., Vilquin, J. T., Cherel, Y., Abadie, J., Samuel, J. L., Rigaud, J. L., Menoret, S., Anegon, I., and Escande, D. 2002. A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther* **13**: 1767.
 103. Sriadibhatla, S., Yang, Z., Gebhart, C., Alakhov, V. Y., and Kabanov, A. 2006. Transcriptional activation of gene expression by pluronic block copolymers in stably and transiently transfected cells. *Mol Ther* **13**: 804.
 104. Yang, Z., Zhu, J., Sriadibhatla, S., Gebhart, C., Alakhov, V., and Kabanov, A. 2005. Promoter- and strain-selective enhancement of gene expression in a mouse skeletal muscle by a polymer excipient Pluronic P85. *J Control Release* **108**: 496.

105. Batrakova, E. V., and Kabanov, A. V. 2008. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *J Control Release* **130**: 98.
106. Kabanov, A. V., Batrakova, E. V., and Alakhov, V. Y. 2002. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* **82**: 189.
107. Breuzard, G., Tertilt, M., Goncalves, C., Cheradame, H., Geguan, P., Pichon, C., and Midoux, P. 2008. Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res* **36**: e71.
108. Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M., and Reich, Z. 2001. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol Ther* **3**: 653.
109. Yang, Z., Sahay, G., Sriadibhatla, S., and Kabanov, A. V. 2008. Amphiphilic block copolymers enhance cellular uptake and nuclear entry of polyplex-delivered DNA. *Bioconjug Chem* **19**: 1987.
110. Tyler, K. L. 2003. Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy". *Muscle Nerve* **28**: 402.
111. Baccari, M. C., Nistri, S., Vannucchi, M. G., Calamai, F., and Bani, D. 2007. Reversal by relaxin of altered ileal spontaneous contractions in dystrophic (mdx) mice through a nitric oxide-mediated mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **293**: R662.
112. Emery, A. E. 2002. Muscular dystrophy into the new millennium. *Neuromuscul Disord* **12**: 343.
113. Emery, A. E. 2002. The muscular dystrophies. *Lancet* **359**: 687.
114. Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., and Kunkel, L. M. 1986. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **323**: 646.
115. Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., and Kunkel, L. M. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* **50**: 509.
116. Jacobs, P. A., Hunt, P. A., Mayer, M., and Bart, R. D. 1981. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet* **33**: 513.
117. Davies, K. E., Pearson, P. L., Harper, P. S., Murray, J. M., O'Brien, T., Sarfarazi, M., and Williamson, R. 1983. Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res* **11**: 2303.
118. Koenig, M., and Kunkel, L. M. 1990. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem* **265**: 4560.
119. Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M. 1988. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**: 219.
120. Yoshida, M., Suzuki, A., Yamamoto, H., Noguchi, S., Mizuno, Y., and Ozawa, E. 1994. Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur J Biochem* **222**: 1055.
121. Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., and Davies, K. E. 2002. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev* **82**: 291.

122. Chen, Y. W., Zhao, P., Borup, R., and Hoffman, E. P. 2000. Expression profiling in the muscular dystrophies: identification of novel aspects of molecular pathophysiology. *J Cell Biol* **151**: 1321.
123. Sander, M., Chavoshan, B., Harris, S. A., Iannaccone, S. T., Stull, J. T., Thomas, G. D., and Victor, R. G. 2000. Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13818.
124. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., and Moore, K. J. 1984. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**: 1189.
125. Ryder-Cook, A. S., Sicinski, P., Thomas, K., Davies, K. E., Worton, R. G., Barnard, E. A., Darlison, M. G., and Barnard, P. J. 1988. Localization of the mdx mutation within the mouse dystrophin gene. *Embo J* **7**: 3017.
126. Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., and Barnard, P. J. 1989. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* **244**: 1578.
127. Muntoni, F., Mateddu, A., and Serra, G. 1991. Passive avoidance behaviour deficit in the mdx mouse. *Neuromuscul Disord* **1**: 121.
128. Valentine, B. A., Cooper, B. J., Cummings, J. F., and deLahunta, A. 1986. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol* **71**: 301.
129. Nguyen, F., Cherel, Y., Guigand, L., Goubault-Leroux, I., and Wyers, M. 2002. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *J Comp Pathol* **126**: 100.
130. Collins, C. A., and Morgan, J. E. 2003. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol* **84**: 165.
131. Drachman, D. B., Toyka, K. V., and Myer, E. 1974. Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet* **2**: 1409.
132. DeSilva, S., Drachman, D. B., Mellits, D., and Kuncl, R. W. 1987. Prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. Long-term benefit. *Arch Neurol* **44**: 818.
133. Biggar, W. D., Politano, L., Harris, V. A., Passamano, L., Vajsaar, J., Alman, B., Palladino, A., Comi, L. I., and Nigro, G. 2004. Deflazacort in Duchenne muscular dystrophy: a comparison of two different protocols. *Neuromuscul Disord* **14**: 476.
134. Gaud, A., Simon, J. M., Witzel, T., Carre-Pierrat, M., Wermuth, C. G., and Segalat, L. 2004. Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul Disord* **14**: 365.
135. St-Pierre, S. J., Chakkalakal, J. V., Kolodziejczyk, S. M., Knudson, J. C., Jasmin, B. J., and Megeney, L. A. 2004. Glucocorticoid treatment alleviates dystrophic myofiber pathology by activation of the calcineurin/NF-AT pathway. *Faseb J* **18**: 1937.
136. Duboc, D., Meune, C., Pierre, B., Wahbi, K., Eymard, B., Toutain, A., Berard, C., Vaksman, G., Weber, S., and Becane, H. M. 2007. Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *Am Heart J* **154**: 596.
137. Anderson, C. L., De Repentigny, Y., Cifelli, C., Marshall, P., Renaud, J. M., Worton, R. G., and Kothary, R. 2006. The mouse dystrophin muscle promoter/enhancer drives expression of mini-dystrophin in transgenic mdx mice and rescues the dystrophy in these mice. *Mol Ther* **14**: 724.
138. Yue, Y., Li, Z., Harper, S. Q., Davisson, R. L., Chamberlain, J. S., and Duan, D. 2003. Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein

- complex and improves sarcolemma integrity in the mdx mouse heart. *Circulation* **108**: 1626.
139. Gregorevic, P., Allen, J. M., Minami, E., Blankinship, M. J., Haraguchi, M., Meuse, L., Finn, E., Adams, M. E., Froehner, S. C., Murry, C. E., and Chamberlain, J. S. 2006. rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med* **12**: 787.
 140. Gussoni, E., Pavlath, G. K., Lanctot, A. M., Sharma, K. R., Miller, R. G., Steinman, L., and Blau, H. M. 1992. Normal dystrophin transcripts detected in Duchenne muscular dystrophy patients after myoblast transplantation. *Nature* **356**: 435.
 141. Tremblay, J. P., Malouin, F., Roy, R., Huard, J., Bouchard, J. P., Satoh, A., and Richards, C. L. 1993. Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant* **2**: 99.
 142. Karpati, G., Ajdukovic, D., Arnold, D., Gledhill, R. B., Guttmann, R., Holland, P., Koch, P. A., Shoubridge, E., Spence, D., Vanasse, M., and et al. 1993. Myoblast transfer in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* **34**: 8.
 143. Huard, J., Cao, B., and Qu-Petersen, Z. 2003. Muscle-derived stem cells: potential for muscle regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* **69**: 230.
 144. Rodriguez, A. M., Pisani, D., Dechesne, C. A., Turc-Carel, C., Kurzenne, J. Y., Wdziekonski, B., Villageois, A., Bagnis, C., Breitmayer, J. P., Groux, H., Ailhaud, G., and Dani, C. 2005. Transplantation of a multipotent cell population from human adipose tissue induces dystrophin expression in the immunocompetent mdx mouse. *J Exp Med* **201**: 1397.
 145. Abmayr, S., Gregorevic, P., Allen, J. M., and Chamberlain, J. S. 2005. Phenotypic improvement of dystrophic muscles by rAAV/microdystrophin vectors is augmented by Igf1 codelivery. *Mol Ther* **12**: 441.
 146. Benabdallah, B. F., Bouchentouf, M., Rousseau, J., Bigey, P., Michaud, A., Chapdelaine, P., Scherman, D., and Tremblay, J. P. 2008. Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice. *Cell Transplant* **17**: 337.
 147. Li, X., Eastman, E. M., Schwartz, R. J., and Draghia-Akli, R. 1999. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol* **17**: 241.
 148. Gregorevic, P., Blankinship, M. J., Allen, J. M., and Chamberlain, J. S. 2008. Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol Ther* **16**: 657.
 149. Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J. C., and Monsigny, M. 1998. Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug Chem* **9**: 260.
 150. Maher, S., Feighery, L., Brayden, D. J., and McClean, S. 2007. Melittin as a permeability enhancer II: in vitro investigations in human mucus secreting intestinal monolayers and rat colonic mucosae. *Pharm Res* **24**: 1346.
 151. Maher, S., Feighery, L., Brayden, D. J., and McClean, S. 2007. Melittin as an epithelial permeability enhancer I: investigation of its mechanism of action in Caco-2 monolayers. *Pharm Res* **24**: 1336.
 152. Chattopadhyay, A., and London, E. 1984. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal Biochem* **139**: 408.

153. Lee, M. J., Cho, S. S., Jang, H. S., Lim, Y. S., You, J. R., Park, J., Suh, H., Kim, J. A., Park, J. S., and Kim, D. K. 2002. Optimal salt concentration of vehicle for plasmid DNA enhances gene transfer mediated by electroporation. *Exp Mol Med* **34**: 265.
154. Rols, M. P., and Teissie, J. 1998. Electroporabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration. *Biophys J* **75**: 1415.
155. Bello-Roufai, M., Lambert, O., and Pitard, B. 2007. Relationships between the physicochemical properties of an amphiphilic triblock copolymers/DNA complexes and their intramuscular transfection efficiency. *Nucleic Acids Res* **35**: 728.
156. Gau-Racine, J., Lal, J., Zeghal, M., and Auvray, L. 2007. PEO-PPO block copolymer vectors do not interact directly with DNA but with lipid membranes. *J Phys Chem B* **111**: 9900.
157. Hartikka, J., Bozoukova, V., Jones, D., Mahajan, R., Wloch, M. K., Sawdey, M., Buchner, C., Sukhu, L., Barnhart, K. M., Abai, A. M., Meek, J., Shen, N., and Manthorpe, M. 2000. Sodium phosphate enhances plasmid DNA expression in vivo. *Gene Ther* **7**: 1171.
158. Wang, M., Orsini, C., Casanova, D., Millan, J. L., Mahfoudi, A., and Thuillier, V. 2001. MUSEAP, a novel reporter gene for the study of long-term gene expression in immunocompetent mice. *Gene* **279**: 99.
159. Collins, J. M., Despa, F., and Lee, R. C. 2007. Structural and functional recovery of electroporabilized skeletal muscle in-vivo after treatment with surfactant poloxamer 188. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1238.
160. Lee, R. C., River, L. P., Pan, F. S., Ji, L., and Wollmann, R. L. 1992. Surfactant-induced sealing of electroporabilized skeletal muscle membranes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 4524.
161. Batrakova, E. V., Li, S., Alakhov, V. Y., Miller, D. W., and Kabanov, A. V. 2003. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **304**: 845.
162. Chiappetta, D. A., and Sosnik, A. 2007. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm* **66**: 303.
163. Mata, J. P., Majhi, P. R., Guo, C., Liu, H. Z., and Bahadur, P. 2005. Concentration, temperature, and salt-induced micellization of a triblock copolymer Pluronic L64 in aqueous media. *J Colloid Interface Sci* **292**: 548.
164. Roques, C., Bouchemal, K., Ponchel, G., Fromes, Y., and Fattal, E. 2009. Parameters affecting organization and transfection efficiency of amphiphilic copolymers/DNA carriers. *J Control Release*.
165. Kim, Y. H., Gihm, S. H., Park, C. R., Lee, K. Y., Kim, T. W., Kwon, I. C., Chung, H., and Jeong, S. Y. 2001. Structural characteristics of size-controlled self-aggregates of deoxycholic acid-modified chitosan and their application as a DNA delivery carrier. *Bioconj Chem* **12**: 932.
166. Lee, K. Y., Kwon, I. C., Kim, Y. H., Jo, W. H., and Jeong, S. Y. 1998. Preparation of chitosan self-aggregates as a gene delivery system. *J Control Release* **51**: 213.
167. Ajmani, P. S., Attia, S., Osifchin, M., Regen, S., and Hughes, J. A. 1999. A spermine-deoxycholic acid conjugate based lipid as a transfecting agent. *Pharmazie* **54**: 191.
168. Hack, A. A., Ly, C. T., Jiang, F., Clendenin, C. J., Sigrist, K. S., Wollmann, R. L., and McNally, E. M. 1998. Gamma-sarcoglycan deficiency leads to muscle membrane defects and apoptosis independent of dystrophin. *J Cell Biol* **142**: 1279.

169. Demina, T., Grozdova, I., Krylova, O., Zhirnov, A., Istratov, V., Frey, H., Kautz, H., and Melik-Nubarov, N. 2005. Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers. *Biochemistry* **44**: 4042.
170. Romero, N. B., Braun, S., Benveniste, O., Leturcq, F., Hogrel, J. Y., Morris, G. E., Barois, A., Eymard, B., Payan, C., Ortega, V., Boch, A. L., Lejean, L., Thioudellet, C., Mourot, B., Escot, C., Choquel, A., Recan, D., Kaplan, J. C., Dickson, G., Klatzmann, D., Molinier-Frenckel, V., Guillet, J. G., Squiban, P., Herson, S., and Fardeau, M. 2004. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **15**: 1065.
171. Zhang, G., Ludtke, J. J., Thioudellet, C., Kleinpeter, P., Antoniou, M., Herweijer, H., Braun, S., and Wolff, J. A. 2004. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **15**: 770.
172. Mason, A. J., Leborgne, C., Moulay, G., Martinez, A., Danos, O., Bechinger, B., and Kichler, A. 2007. Optimising histidine rich peptides for efficient DNA delivery in the presence of serum. *J Control Release* **118**: 95.
173. Brissault, B., Kichler, A., Leborgne, C., Jarroux, N., Cheradame, H., and Guis, C. 2007. Amphiphilic poly[(propylene glycol)-block-(2-methyl-2-oxazoline)] copolymers for gene transfer in skeletal muscle. *ChemMedChem* **2**: 1202.
174. Pomel, C., Leborgne, C., Cheradame, H., Scherman, D., Kichler, A., and Guegan, P. 2008. Synthesis and evaluation of amphiphilic poly(tetrahydrofuran-b-ethylene oxide) copolymers for DNA delivery into skeletal muscle. *Pharm Res* **25**: 2963.
175. Straub, V., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S., and Campbell, K. P. 1997. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* **139**: 375.
176. Alexandridis, P., Holzwarth, J. F., and Hatton, T. A. 1994. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules* **27**: 2414–2425.
177. Wanka, G., Hoffmann, H., and Ulbricht, W. 1994. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromolecules* **27**: 4145–4159.

Communications scientifiques

VII. Communications scientifiques

Posters :

- Debborah Alimi, Christian Leborgne, Daniel Scherman, Antoine Kichler. *Evaluation de polymères tri-blocs pour le transfert de gènes dans le muscle squelettique*. Société Française de Thérapie Cellulaire et Génique, 15-17 juin 2008, Presqu'île de Giens, France.

- Debborah Alimi, Blandine Brissault, Christian Leborgne, Christine Guis, Daniel Scherman, Antoine Kichler, *Influence of the chemical composition of amphiphilic triblock copolymers on muscle gene transfer*, European Society of Gene and Cell Therapy, 13-16 novembre 2008, Brugge, Belgique

Communication orale:

- Debborah Alimi, Blandine Brissault, Christian Leborgne, Christine Guis, Daniel Scherman, Antoine Kichler, *Influence of the chemical composition of amphiphilic triblock copolymers on muscle gene transfer*, American Society of Gene and Cell Therapy 11th annual meeting, 28 mai-1 juin 2008, Boston, Etats Unis.

Publication

VIII. Publication

Evaluation of the muscle gene transfer activity of a series of amphiphilic triblock copolymers

Deborah Alimi-Guez¹, Christian Leborgne¹, Gaëlle Pembouong², Laetitia Van Wittenberghe¹, Nathalie Mignet², Daniel Scherman^{1,2}, Antoine Kichler^{1,2*}

¹FRE3087 CNRS-Genethon, BP60, 91002 Evry cedex, France; ²Laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique U640 INSERM - UMR 8151 CNRS, Faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 75270 Paris Cedex 06, France

*Correspondence to: Antoine Kichler, FRE3087 CNRS-Genethon, 1bis rue de l'Internationale, BP 60, 91002 Evry cedex, France. Email: akich@genethon.fr.

Keywords: Gene transfer; non viral; triblock copolymers; skeletal muscle; permeabilization

Running title: Amphiphilic copolymers for muscle gene transfer

Abstract

Background: It has been recently shown that amphiphilic triblock copolymers such as the polyethylene oxide-polypropylene oxide-polyethylene oxide L64 (PEO₁₃-PPO₃₀-PEO₁₃) significantly increase transgene expression after injection of DNA/polymer mixtures into skeletal muscles. In order to better understand the way such copolymers act, we studied in vitro and in vivo the behaviour of different poloxamers, including L64.

Methods: The in vitro and in vivo transfection activity of five copolymers that differ either by their molecular weight or by their hydrophilic/hydrophobic balance was evaluated. Further, we have also studied the membrane permeabilizing properties of the poloxamers.

Results: Our results indicate that after intramuscular administration of DNA/poloxamer formulations, all five compounds were able to significantly increase the expression levels of luciferase as compared to the injection of naked DNA. Using a LacZ expression cassette, we found that up to 30% of the muscle fibers expressed the reporter gene. Furthermore, we show that the effect can be obtained using different promoters. Finally, we document that all five poloxamers possess, to some extent, membrane permeabilizing properties.

Conclusions: Taken together, our results show that there is a large flexibility in terms of molecular weight and EO/PO ratio for obtaining increased levels of transgene expression in vivo.

Introduction

In 1990, Jon Wolff and colleagues obtained the surprising result that without any delivery system, detectable levels of transgene expression were obtained in muscle after intramuscular injection of plasmid DNA [(30)]. This important finding seemed to be the promise for a rapid development of new treatments for both genetic diseases and innovative vaccines. Indeed, naked DNA is a highly interesting drug candidate since it meets many of the criteria important for industrial development: its production is easy and scalable, it has a low toxicity, and it is simple to handle. In addition, intramuscular injection is a particularly interesting way of administration [(36)]. Indeed, muscle tissue is easily accessible and constitutes about 30% of the normal adult body mass; it has an abundant blood vascular supply, thus providing an efficient transport system for the secretion of proteins into the circulation; muscle fibers are terminally differentiated cells that can persist for long period of times. Finally, skeletal muscle is an important target for gene therapy approaches since many genetic diseases affect this tissue.

More than ten years after Wolff's publication, a first gene-based clinical trial for Duchenne muscular dystrophy using a plasmid encoding the full-length human dystrophin gene was initiated. In this trial, a low level of dystrophin expression was detected in muscle fibers in six of nine patients [(170)]. These results, although representing a first step towards gene therapy of muscular diseases, also highlighted the necessity for a more efficient plasmid delivery. A very important research effort was dedicated to the development of synthetic cationic DNA carriers but this family of compounds is unable to promote muscle transfection. It is only in the late 90's that several techniques able to significantly improve reporter gene expression in muscle compared to naked DNA appeared. These methods can be divided into two groups: physical methods such as electrotransfer [(89)] and intra-arterial injections [(171)], and methods using the properties of neutral or poorly charged polymers. The first polymer

described to enhance muscle gene transfer was polyvinyl pyrrolidone (PVP) [(100)]. Water-soluble triblock copolymers composed of hydrophilic polyethylene oxide (PEO) and hydrophobic polypropylene oxide (PPO) blocks linked together in the sequence PEO-PPO-PEO (Figure 1) have been developed under the trademark Pluronic (by BASF Chemicals) and under the generic name poloxamers. Pluronics have been shown to possess a higher transfection potential than PVP [(101, 102)]. Importantly in view of clinical use, some poloxamers are listed in the US and European Pharmacopeia as inactive excipients and they are widely used by the industry as solubilizing, wetting, and emulsifying agents.

A mechanism has been proposed – and to some extent demonstrated - for explaining the enhanced expression after intramuscular injection of a DNA/Pluronic formulation, consisting in a EOx-POy-EOx transcription activation effect, in part through activation of NF- κ B signaling pathways [(103, 104)]. This is supported by: i- a promoter dependence which suggests transcriptional activation [(104)]; ii- an increase of the level of reporter gene after addition of Pluronics to stably transfected cells [(103)]; iii- the lack of response to Pluronic P85 in the athymic nude mouse which has a defective immune system [(104)].

An interesting “side-effect” of the activation of NF- κ B signaling pathways by the poloxamers could be an increased nuclear transport of the plasmid DNA. Indeed, several investigators have shown that a plasmid DNA containing NF- κ B binding sites is more efficiently transported into the nucleus probably through the NF- κ B transport [(107-109)]. However, a full understanding of the mechanism of action of poloxamers still lacks. For example, the fact that the potency of Pluronic P85 is considerably reduced when DNA and P85 are administered separately, even at short intervals between the injections, raises several questions [(104)].

The aim of the present study was to better understand the relation between structure of the triblock copolymers and their capacity to promote muscle gene transfer. To this end, we

evaluated the in vitro and in vivo properties of 5 poloxamers that differ either by their molecular weight or by their hydrophilic/hydrophobic balance. Since it has been shown that some poloxamers are able to destabilize membrane bilayers [(156, 169)], we also evaluated the membrane permeabilizing properties of the five copolymers.

Materials and Methods

Materials

CMV-Luc (7.6 kb), EF1-Luc (6 kb), C5-12-Luc (6.9 kb) and SV40-Luc (5 kb) are expression plasmids encoding the firefly *luciferase* gene under the control of the human cytomegalovirus (CMV) immediate-early promoter, the human elongation factor 1 alpha (EF1) promoter, the synthetic C5-12 and SV40 promoter, respectively. The copolymers P105 and P104 were from Fluka, F127 was obtained from Sigma and L64 and P123 were from Aldrich. The polymers were used without further purification and they were all diluted at 1 or 2 % (w/v) in water. The stock solutions were stored at 4°C. 1,6- Diphenyl- 1,3,5-hexatrien (DPH) was purchased from Aldrich. Tetrahydrofuran (THF) was purchased from Carlo Erba SDS.

Determination of the critical micellar concentration (CMC)

The CMC was determined using the DPH fluorescence method [(152)]. Briefly, DPH (3 µL, 1.5 mM in THF) was added to increasing amounts of Pluronics dissolved in a volume of 200 µL of aqueous solution. The mixtures were stirred, transferred into a black 96-well plate and left in the dark for 1 h either at room temperature (~25°C) or at 37°C. The wavelengths used for fluorescence measurements were 358 nm for the excitation and 430 nm for the emission. The excitation and emission slits were set at bandwidths of 1.5 and 20, respectively. A Varian Cary Eclipse spectrophotometer was used for the fluorescence measurements. All the experiments were done in triplicate and the average of the CMCs is given in Table 2.

DNA retardation assay

DNA binding was studied by means of agarose gel retardation assays. Briefly, plasmid DNA (1 µg) and increasing amounts of copolymer were each diluted in 25 µl of 150 mM NaCl and mixed. After a period of 15 min, samples (20 µl) were electrophoresed through a 1% agarose

gel using Tris-borate-EDTA buffer and DNA was visualised after SYBR Safe (Invitrogen) staining.

Cell culture

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Gibco-BRL) was supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% of fetal calf serum (FCS). Human hepatocarcinoma cells (HepG2 cells; American Type Culture Collection) were used for the transfection and permeabilization experiments. C2C12, a subclone of the C2 mouse myoblast cell line was obtained from ATCC. The cells were routinely propagated in DMEM supplemented with 20% (v/v) foetal calf serum and 50 µg/mL gentamicin. The differentiation into myotubes was induced by using for one week culture medium containing 5% horse serum.

In vitro transfection

Transfection formulations were prepared as follows: 4 µg of plasmid DNA and the desired amount of polymer were each diluted into 100 µl of 150 mM NaCl and then gently mixed. After 15 min of incubation, the solution was diluted with serum-free culture medium to a final volume of 1 ml. A volume of 0.5 ml of the serum-free transfection medium was then put in each well of the duplicate. After 2 h of incubation with HepG2 cells at 37°C, the medium was replaced with fresh one containing 10% serum. The luciferase assay was performed 30 h post-transfection as previously described [(172)]. Luciferase background was subtracted from each value and the transfection efficiency was expressed as total light units/10 s/mg. Protein content was measured by using the BioRad protein assay (Bradford).

In vivo experiments using the *luciferase* gene as reporter plasmid

Animal experiments were performed according to institutional guidelines for animal care and use. DNA complexes were generated either in 150 mM NaCl or in Tyrode solution (140 mM NaCl, pH 7.4; 6 mM KCl; 3 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 10 mM Hepes; 10 mM Glucose). DNA and the copolymer were each diluted in 20 µL and then gently mixed. After incubation at room temperature for about 15 min, 35 µL of polymer/10 µg DNA solution were slowly injected into the tibialis anterior of female Balb/C mice (8 weeks old, Charles River Laboratories) using a syringe with a small 30 gauge needle. Mice were sacrificed 7 days post-administration and muscles were dissected and snap-frozen in liquid nitrogen. For the measurement of luciferase levels in muscle, the following protocol was used: lysis buffer (500 µL) containing a cocktail of protease inhibitors (Sigma) was added to the collected organs. Each organ was then homogenized for about 30 s with an Ultra-turrax (Ika), and the homogenate was centrifuged for 10 min at 8000 g at 4°C. A 5 µL aliquot of the supernatant was used for the luciferase assay. Protein content was measured by using the BioRad (Bradford) protein assay. Luciferase background was subtracted from each value and the transfection efficiency is expressed as total light units/10 s/mg protein.

Quantification of mSeAP

Blood samples were obtained by retro-orbital puncture of anesthetized animals at day 7 after intramuscular injection of 20 µg CMV-mSeAP/35 µL NaCl 150 mM or 20 µg CMV-mSeAP/0.1% P105/35 µL Tyrode solution. Detection of alkaline phosphatase activity was carried out with the Phospha-Light kit (Tropix Perkin-Elmer) following the manufacturer's instructions. Luminescent reactions were analyzed in a Victor luminometer (Wallac, Perkin Elmer).

X-Gal staining

Tibialis muscle was injected with either 20 µg CMV-LacZ/35 µL NaCl 150 mM or 20 µg CMV-LacZ/0.1% P105/35 µL Tyrode solution. 5 days after injection, muscles were harvested and analyzed for LacZ expression. Briefly, cryosections (8 mm thickness) were prepared from frozen muscles and the tissue sections were fixed in 0.5% glutaraldehyde and incubated at 37°C for 4 to 6 hours with X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside).

In vitro cell permeabilization assay using propidium iodide

The cell membrane permeabilizing activity of the copolymers was assessed in vitro by using flow cytometry as described previously [(149)]. Briefly, HepG2 cells were plated in 24-well plates one day before use. Increasing amounts of copolymer were incubated at 37°C for 2 h with HepG2 cells in serum-free media supplemented with 3 µg/mL of propidium iodide. Cells were then washed twice with PBS, harvested with a trypsin/PBS mixture and analyzed by flow cytometry (FACScalibur, Becton Dickinson).

Lactate Dehydrogenase (LDH) Assay

Membrane permeabilization activity was further evaluated in vitro by measuring the leakage of LDH from the cells. Briefly, poloxamers were added to HepG2 or C2C12 myotubes in serum-free media. For the C2C12, 5.10^4 cells/well were plated in 24 well-plates and differentiation into myotubes was induced for one week. After incubation at 37°C for about 2 h, an aliquot of the supernatant of each well was used for the measurement of the LDH activity. The assay was performed using a commercially available kit (CytoTox-ONE™ membrane integrity assay from Promega). Untreated cells were used as control while the 100% leakage value was obtained by treating the cells with a lysis buffer.

Evans blue-based assay for in vivo permeabilization assessment

Mice were injected intraperitoneally with the Evans blue dye (EBD; 1 mg/g of body weight). The following day, animals were injected intramuscularly into shaved tibialis anterior muscles at one site with DNA +/- copolymer. As positive control for muscle permeabilization, we used the electrotransfer technique [(89)]. The day after, mice were sacrificed and muscles were removed and quickly frozen in liquid nitrogen-cooled isopentane. Cryosections (8 mm thickness) were prepared from frozen muscles. Transverse tissue sections were processed for hematoxylin and eosin histological staining. Evans blue-positive fibers were revealed by fluorescence excitation at 633 nm.

Results

The five poloxamers that we selected to conduct our study (see Table 1) consist of ethylene oxide (EO) and propylene oxide (PO) blocks arranged in an EO_x–PO_y–EO_x structure (Figure 1). This arrangement results in an amphiphilic copolymer, in which the number of hydrophilic EO and hydrophobic PO units can be varied. Copolymers with various lengths of EO and PO are characterized by distinct hydrophilic/hydrophobic balance.

Gel mobility shift assay and in vitro transfection

We started our study by investigating whether the copolymers are able to interact with plasmid DNA. Therefore, we mixed increasing amounts of copolymer (from 0.01 to 1 % (w/v)) with 1 µg of DNA and we tested whether the presence of the polymers alters the migration of DNA toward the cathode during agarose gel electrophoresis. The results show that none of the compounds was able to change the migration profile of DNA, even at the highest concentration tested (data not shown). Next, we evaluated the in vitro transfection efficiency of each polymer. Concentrations of copolymers ranging between 0.01 and 1 % (w/v) were tested on human hepatocytes (HepG2 cells) with 2 µg/well of a plasmid encoding the *luciferase* gene. The expression level of luciferase 30 h after transfection indicates that none of the polymers could promote gene transfer in vitro (data not shown).

Taken together, these results are similar than those reported with other neutral amphiphilic copolymers such as poly(2-methyl-2-oxazoline)-PPO- poly(2-methyl-2-oxazoline) copolymers [(173)] or PEO-Poly(tetrahydrofuran)-PEO [(174)]. Also in agreement with this, a study conducted with L64 could not demonstrate an interaction between the copolymer and DNA by using gel electrophoresis, nor did the authors find that the polymer mediated gene transfer in vitro [(102)]. The absence of interactions between L64 and DNA has been further

confirmed by Gau-Racine and colleagues using small angle neutron and light scattering [(156)].

In vivo gene transfer

We started the in vivo gene transfer study with copolymer P105. Therefore, 10 µg of plasmid DNA encoding the *luciferase* gene were mixed with increasing concentrations of polymer and injected into the tibialis anterior of Balb/c mice. The muscles were harvested 7 days after injection, and the luciferase activity was measured. The results show that addition of the polymer significantly increases the level of luciferase compared to naked DNA (Figure 2A). Under the optimal conditions, namely 0.1% (w/v) the expression efficacy was found to be increased by a factor of 75-fold over naked DNA. Notably, in a separate experiment a concentration of P105 above 0.1% has also been tested (i.e. 0.5%; w/v) but it resulted in lower levels of luciferase than 0.1% (data not shown).

After having determined for each polymer the optimal in vivo concentration (data not shown), we compared all five copolymers in the same experiment. As with P105, 10 µg of CMV-Luc were formulated in 150 mM NaCl with the desired polymer and reporter gene expression was measured at day 7. The results revealed that the efficiency of all 5 compounds is very similar (Figure 2B). In this experiment only P123 was slightly less efficient than the four other polymers.

Evaluation of P105 with different promoters

It was previously reported that the gene transfer activity of poloxamer P85 is promoter-dependent [(104)]. To check whether this was also the case for P105, we used 3 other reporter constructs in which the luciferase gene was under the control of the human elongation factor 1-alpha (EF1), the synthetic muscle-specific C5-12 promoter [(147)], and the viral SV40

promoter, respectively. Seven days after intramuscular injection of DNA +/- 0.1% P105, the luciferase levels in muscles were determined. As shown in Figure 3, the results indicate that P105 was able to increase the luciferase levels with all 3 constructs. Notably however, there were some differences in the effect between the promoters: the increase with the construct containing the SV40 promoter was lower than with the two other promoters. This is in line with a previous report using P85 that revealed that the effect with an SV40 driven gene was much lower than with a construct containing a CMV promoter [(104)].

Effect of buffer on the transfection activity

It is known that the salt composition of the plasmid formulation can affect the transfection efficiency. For example, it was recently reported that formulation of plasmid DNA with the copolymer EO₇₅-PO₃₀-EO₇₅ in Tyrode (140 mM NaCl, 6 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 10 mM glucose, pH 7.4) resulted in higher luciferase levels in muscle as compared to a saline-based formulation [(155)]. The results shown in Figure 4 indicate that Tyrode increased in average by 10-fold the levels of reporter gene expression in P105-mediated transfection in vivo.

Gene transfer using mSeAP and LacZ as reporter genes

Next, we determined the efficiency of gene transfer by using as reporter gene lacZ. The X-Gal staining of the muscle, which was injected with 20 µg CMV-LacZ/0.1% P105/35 µl Tyrode five days before, revealed that about 30% of fibers expressed the transgene (Figure 5A, left muscle section). This percentage is significantly above the results obtained with naked DNA in 150 mM NaCl (Figure 5A, right muscle section). Notably, the muscle did not appear to be affected by the copolymer as observed in histology analysis.

We also used, in a similar protocol, a secreted reporter gene derived from a natural murine alkaline phosphatase enzyme [(158)]. This reporter gene not only avoids immune response in mice experiments against the transgenic protein but it presents also the advantage to have a higher thermostability as compared to the endogenous phosphatases, thus allowing its specific detection in an easy and highly sensitive assay with a low background. The results indicate that at day 7 after injection, the levels of circulating mSeAP are 18-fold higher when animals received 20 µg of CMV-mSeAP formulated with 0.1% P105 in Tyrode than the mice treated with the same amount of DNA diluted in 150 mM of sodium chloride (Figure 5B).

Evaluation of the membrane permeabilizing activity

To determine whether there may be a relation between the detergent-like properties of the amphiphiles and the transfection activity, we performed different assays to characterize the membrane permeabilizing properties of the 5 polymers. We started this study by using a fluorescent method [(149)]. The permeabilization of the plasma membrane of HepG2 cells was measured by flow cytometry using propidium iodide, a non-fluorescent and poorly membrane-permeant molecule, which enters the cells after membrane permeabilization and becomes strongly fluorescent upon binding to DNA. HepG2 cells incubated in the presence of both propidium iodide (PI) and copolymer in the 0.01% - 1% range became strongly labelled only when treated with L64 at a concentration above 0.1% (75% PI positive cells at 1%; Figure 6A). A percentage of PI positive cells that remained below 20% was observed with the 4 other polymers used in the same range of concentrations (data not shown). We made also use of another assay which consists in measuring the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from the cytoplasm into the surrounding culture medium. The results shown in Figure 6B are in good agreement with those obtained with propidium iodide assay, namely that L64 displays a significant membranolytic activity above 0.1%. The 4 other copolymers had only minor

permeabilizing properties even at 0.5%. The LDH assay was also performed on C2C12 myotubes and it gave roughly the same results (Figure 6C). One difference, however, was that at 0.5% P123 and P104 became slightly permeabilizing. Another observation that can be made is that all poloxamers started to induce membrane permeabilization when used at 1%. This underscores that all five copolymers have the potential to interact with and destabilize lipid bilayers.

To go one step further, we studied *in vivo* the permeabilizing properties of the copolymers. This was done by using the properties of the Evans blue dye (EBD). EBD is a membrane-impermeant molecule that is widely used for studying sarcolemmal permeability in dystrophic muscle fibers [(175)]. The intracellular accumulation of the dye in muscle fibers indicates loss of membrane integrity. As a positive control, we made use of the electrotransfer technique which was described to cause cell membrane permeabilization [(89)]. Our results confirm that after application of the electrotransfer technique, a significant amount of fibers of the treated muscle is strongly positive for EBD (Figure 7). Using the same experimental conditions, we could show that injection of the CMV-Luc/copolymer formulations described in Figure 2B resulted in a poor staining of the muscle (Figure 7 and data not shown). In contrast, injection of L64 at 1% strongly permeabilized the membranes as revealed by the microscopy study (Figure 7). Thus, the results of the *in vivo* EBD experiment are in good agreement with the *in vitro* assays.

Relation between CMC and transfection activity

Amphiphilic copolymers have the ability to self-assemble into micelles in aqueous solutions. As the pluronic CMC values reported in the literature often differ [(106, 161, 176, 177)] and temperature is often lacking, we chose to determine them in the conditions of temperature and media we were interested in. This, in turn, allows to investigate whether there is a relation

between transfection activity and self-assembly of the polymers. The critical micellar concentration was determined using the DPH method. The DPH fluorescence was measured for each poloxamer/DPH mixture and the DPH intensity plotted against the logarithm of polymer concentration. Hence, when increasing the poloxamer concentration, the fluorescence intensity remains at the background level then starts to rise, indicating that DPH is in a different environment, which corresponds to copolymer organisation.

The measurements were performed in 150 mM of sodium chloride at two different temperatures. As shown in Table 2, the CMC decreases when the temperature is increased from 25°C to 37°C. This is in good agreement with previous reports [(162)]. Since CMC are described to vary with the salt concentration [(163)], we made the same measurements with P105 diluted in the Tyrode solution. Interestingly, the results indicate that the CMCs in Tyrode at 25°C and 37°C are similar to those found when P105 is diluted in 150 mM of NaCl. Further, the results shown in Table 2 indicate that the CMC: firstly, decreases with the size of the EO block (P123 has the lowest CMC and the lowest % of EO); and secondly, at a fixed percent of EO the CMC decreases when the molecular weight of the copolymer increases (see L64 versus P104 for example). Finally, if we compare the optimal concentration for muscle transfection and the CMC in NaCl 150 mM at 37°C, one can note that for all the compounds the biological activity is obtained near (L64) or above the CMC.

Discussion

Naked plasmid DNA injected into skeletal muscle can be taken up by the myofibers and it results in detectable transgene expression. However, the levels of expression are insufficient to ensure a therapeutic effect for most applications. Thus, the development of delivery systems that improve the efficiency of DNA delivery is necessary. Recently, it has been reported that amphiphilic triblock copolymers such as poloxamers significantly increase the levels of expression of a gene carried by a plasmid DNA [(101, 102)]. Following these promising results it is important to understand the mechanism by which the copolymers act in order to be able to further improve their efficacy.

In the present study, we evaluated the *in vitro* and *in vivo* activity of five EOx-POy-EOx copolymers differing by their molecular weight and/or by their hydrophilic/hydrophobic balance. The results indicate that all 5 polymers significantly enhanced the levels of expression after intramuscular injection. Since the efficiency of all the polymers is very similar, it suggests that there is a significant flexibility in terms of molecular weight and hydrophilic/hydrophobic balance for obtaining an increased transfection.

It has been previously reported that formulation of DNA and F68 in Tyrode solution results in a further improvement of the efficiency [(155)]. Here, we show that it is also the case with copolymer P105. Notably, the results obtained with P105 mixed in Tyrode with a LacZ reporter plasmid showed that up to 30% of fibers express the transgene. Such percentages allow to envisage applications such as for local production of a therapeutic secreted factor. One weakness of Pluronic-mediated gene transfer as compared for example to the electrotransfer technique is the considerable variability of the effect as shown for example in Figure 4. In view of clinical applications, it will be important to increase the reproducibility of the approach.

The “poor” structural requirements for obtaining an enhanced transgene expression are intriguing and raise the question of how poloxamers act. Notably, several publications have shown that poloxamers are able to destabilize membrane bilayers [(156, 169)]. Therefore, we asked whether the copolymers improve transgene expression by permeabilizing the cell membrane. To address this point, we first used two different assays *in vitro*. The results indicate that among the 5 polymers, only L64 displayed significant permeabilizing activities when used at concentrations efficient for *in vivo* transfection (i.e. 0.1%). On the other hand, it must be underscored that all polymers do possess membrane permeabilizing properties, as shown with the LDH assay on C2C12 myotubes. The *in vivo* assay based on the use of the Evans blue dye confirmed the observations made *in vitro*, namely that at the concentrations used for DNA transfection, the permeabilization is limited to a few number of muscle fibers. Although these results do not allow to exclude a role of membrane destabilization in the Pluronic-mediated transfection process, they suggest at least that permeabilization has to be moderate in order to generate higher reporter gene expression than injection of naked DNA. Previous reports have shown that EOx-POy-EOx copolymers activate the NF- κ B signaling pathways. This, in turn, acts at two levels, namely an enhanced transcription of the genes and an increased nuclear transport of the plasmid DNA. Notably however, both events are dependent on the presence of NF- κ B binding sites on the plasmid. One remaining question is why administration at the same time of Pluronic and DNA is required. This latter point clearly deserves further studies since only a complete understanding of how poloxamers act can help to a rationale design of compounds that are even more efficient than those used in this study.

Acknowledgements

We would like to thank the Bioexperimentation group from Genethon for their assistance with the *in vivo* experiments. This work was performed with the financial support of the Association Française contre les Myopathies (AFM) and the ANR-PCV06-139888.

References

- 1 Wolff JA *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; **247**: 1465-1468.
- 2 Lu QL, Bou-Gharios G, Partridge TA. Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory. *Gene Ther* 2003; **10**: 131-142.
- 3 Romero NB *et al.* Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 1065-1076.
- 4 Mir LM *et al.* High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 4262-4267.
- 5 Zhang G *et al.* Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* 2004; **15**: 770-782.
- 6 Mumper RJ *et al.* Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res* 1996; **13**: 701-709.
- 7 Lemieux P *et al.* A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle. *Gene Ther* 2000; **7**: 986-991.
- 8 Pitard B *et al.* A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 1767-1775.
- 9 Sriadibhatla S *et al.* Transcriptional activation of gene expression by pluronic block copolymers in stably and transiently transfected cells. *Mol Ther* 2006; **13**: 804-813.
- 10 Yang Z *et al.* Promoter- and strain-selective enhancement of gene expression in a mouse skeletal muscle by a polymer excipient Pluronic P85. *J Control Release* 2005; **108**: 496-512.

- 11 Breuzard G *et al.* Nuclear delivery of NFkappaB-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res* 2008; **36**: e71.
- 12 Mesika A, Grigoreva I, Zohar M, Reich Z. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol Ther* 2001; **3**: 653-657.
- 13 Yang Z, Sahay G, Sriadibhatla S, Kabanov AV. Amphiphilic block copolymers enhance cellular uptake and nuclear entry of polyplex-delivered DNA. *Bioconjug Chem* 2008; **19**: 1987-1994.
- 14 Demina T *et al.* Relationship between the structure of amphiphilic copolymers and their ability to disturb lipid bilayers. *Biochemistry* 2005; **44**: 4042-4054.
- 15 Gau-Racine J, Lal J, Zeghal M, Auvray L. PEO-PPO block copolymer vectors do not interact directly with DNA but with lipid membranes. *J Phys Chem B* 2007; **111**: 9900-9907.
- 16 Chattopadhyay A, London E. Fluorimetric determination of critical micelle concentration avoiding interference from detergent charge. *Anal Biochem* 1984; **139**: 408-412.
- 17 Mason AJ *et al.* Optimising histidine rich peptides for efficient DNA delivery in the presence of serum. *J Control Release* 2007; **118**: 95-104.
- 18 Midoux P *et al.* Membrane permeabilization and efficient gene transfer by a peptide containing several histidines. *Bioconjug Chem* 1998; **9**: 260-267.
- 19 Brissault B *et al.* Amphiphilic poly[(propylene glycol)-block-(2-methyl-2-oxazoline)] copolymers for gene transfer in skeletal muscle. *ChemMedChem* 2007; **2**: 1202-1207.
- 20 Pomel C *et al.* Synthesis and evaluation of amphiphilic poly(tetrahydrofuran-b-ethylene oxide) copolymers for DNA delivery into skeletal muscle. *Pharm Res* 2008; **25**: 2963-2971.

- 21 Li X, Eastman EM, Schwartz RJ, Draghia-Akli R. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol* 1999; **17**: 241-245.
- 22 Bello-Roufai M, Lambert O, Pitard B. Relationships between the physicochemical properties of an amphiphilic triblock copolymers/DNA complexes and their intramuscular transfection efficiency. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: 728-739.
- 23 Wang M *et al.* MUSEAP, a novel reporter gene for the study of long-term gene expression in immunocompetent mice. *Gene* 2001; **279**: 99-108.
- 24 Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol* 1997; **139**: 375-385.
- 25 Alexandridis P, Holzwarth JF, Hatton TA. Micellization of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions: Thermodynamics of Copolymer Association. *Macromolecules* 1994; **27**: 2414–2425.
- 26 Batrakova EV *et al.* Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; **304**: 845-854.
- 27 Kabanov AV, Batrakova EV, Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. *J Control Release* 2002; **82**: 189-212.
- 28 Wanka G, Hoffmann H, Ulbricht W. Phase Diagrams and Aggregation Behavior of Poly(oxyethylene)-Poly(oxypropylene)-Poly(oxyethylene) Triblock Copolymers in Aqueous Solutions. *Macromolecules* 1994; **27**: 4145–4159.

- 29 Chiappetta DA, Sosnik A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **66**: 303-317.
- 30 Mata JP *et al.* Concentration, temperature, and salt-induced micellization of a triblock copolymer Pluronic L64 in aqueous media. *J Colloid Interface Sci* 2005; **292**: 548-556.

Figure legends

Figure 1. Structure of poloxamers with an EO_x-PO_y-EO_x arrangement.

Figure 2. In vivo evaluation of the poloxamers.

(A) 10 µg of a CMV-Luc plasmid were mixed in 150 mM NaCl with a given amount of copolymer P105. 35 µL of the solution were then slowly injected into tibialis anterior muscles and 7 days later, the luciferase levels were measured from the processed muscles. The following concentrations of P105 were tested: 0.01%, 0.05% and 0.1% (w/v). Each filled diamond represents one muscle (n=7) and the bar indicates the average luciferase activity per condition. Differences between naked DNA and DNA/0.1% P105 were determined using the Student test: *p<0.05. (B) The optimal concentration of each copolymer was tested (n=6) using the same experimental conditions as those described for (A).

Figure 3. Evaluation of different luciferase expression vectors.

Complexes were generated as described in legend of Figure 2. Briefly, 10 µg of either EF1-Luc, C5-12-Luc or SV40-Luc in 150 mM NaCl were injected alone or formulated with 0.1% of P105. Seven days post-administration, muscles were harvested and luciferase levels were measured. Each filled diamond represents one muscle and the bar indicates the average luciferase activity/condition.

Figure 4. Influence of the buffer on the gene transfer activity.

10 µg of CMV-Luc/0.1% P105 were formulated in either 150 mM NaCl or Tyrode. Seven days post-administration, muscles were harvested and luciferase levels were measured. Each filled triangle represents one muscle and the bar indicates the average luciferase activity/condition. *p<0.05

Figure 5. Evaluation of the transfection efficiency using LacZ and mSeAP as reporter genes.

(A) 20 µg of a plasmid encoding the LacZ gene under the CMV promoter were diluted either in 150 mM of NaCl or formulated with 0.1% of P105 in 35 µl of Tyrode. Five days after administration into the tibialis, the treated muscle was isolated, and expression of the transgene was revealed after X-Gal staining. (B) 20 µg of a plasmid encoding the mSeAP gene under the CMV promoter were either diluted in 150 mM of NaCl or formulated with 0.1% of P105 in 35 µl of Tyrode. Before and seven days after injection, blood samples were obtained and the levels of mSeAP were measured.

Figure 6. In vitro cell membrane permeabilization activity of the copolymers.

(A) HepG2 cells in 24-well plates were incubated in the presence of propidium iodide for 2 h in serum-free conditions with increasing amounts of copolymer. Cells were then harvested and analysed using flow cytometry. The experiment has been done in duplicates. (B) HepG2 cells and (C) C2C12 myotubes in 24-well plates were incubated for 2 h in serum-free conditions with increasing amounts of copolymer. The LDH activity present in the supernatant was then measured by using the CytoTox-ONE™ kit. The 100% lysis value was obtained by treating the cells with a lysis buffer.

Figure 7. In vivo cell membrane permeabilization.

Mice were injected intraperitoneally with the Evans blue dye. The following day, animals were injected intramuscularly into tibialis anterior muscles with DNA +/- copolymer. As positive control for muscle permeabilization, we used the electrotransfer technique. The day

after, muscles were recuperated and tissue sections were analyzed for Evans blue staining by fluorescence microscopy.

Table 1. List and structure of the 5 Pluronics.

Structure	Pluronic Nomenclature^a	Molecular Weight	% in weight of the EO block
(EO)13-(PO)30-(EO)13 ^b	L64	2900	40
(EO)23-(PO)52-(EO)23	P104	5000	40
(EO)20-(PO)70-(EO)20	P123	5800	30
(EO)34-(PO)52-(EO)34	P105	6000	50
(EO)95-(PO)65-(EO)95	F127	12000	70

^a see <http://www2.basf.us/performancechemical/bcperfnomenclature.html>

^b PO block = Polypropylene oxide; EO block = Polyethylene oxide

Table 2. Values of the CMCs.

Copolymer	CMC (%) in 150 mM NaCl		CMC (%) in Tyrode	
	25°C	37°C	25°C	37°C
P104	0,08 ± 0,004	0,007 ± 0,0006		
P105	0,98 ± 0,09	0,032 ± 0,002	0,83 ± 0,01	0,032 ± 0,003
F127	0,3 ± 0,006	0,014 ± 0,003		
P123	0,014 ± 0,002	0,004 ± 0,0002		
L64	1,5 ± 0,07	0,25 ± 0,02		

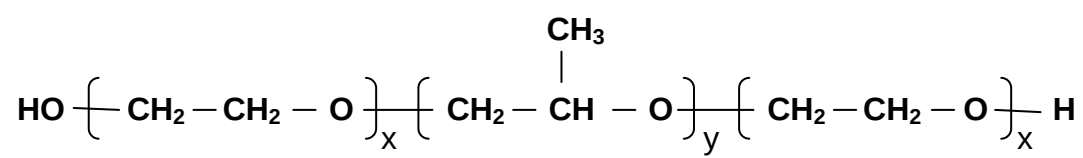


Figure 1

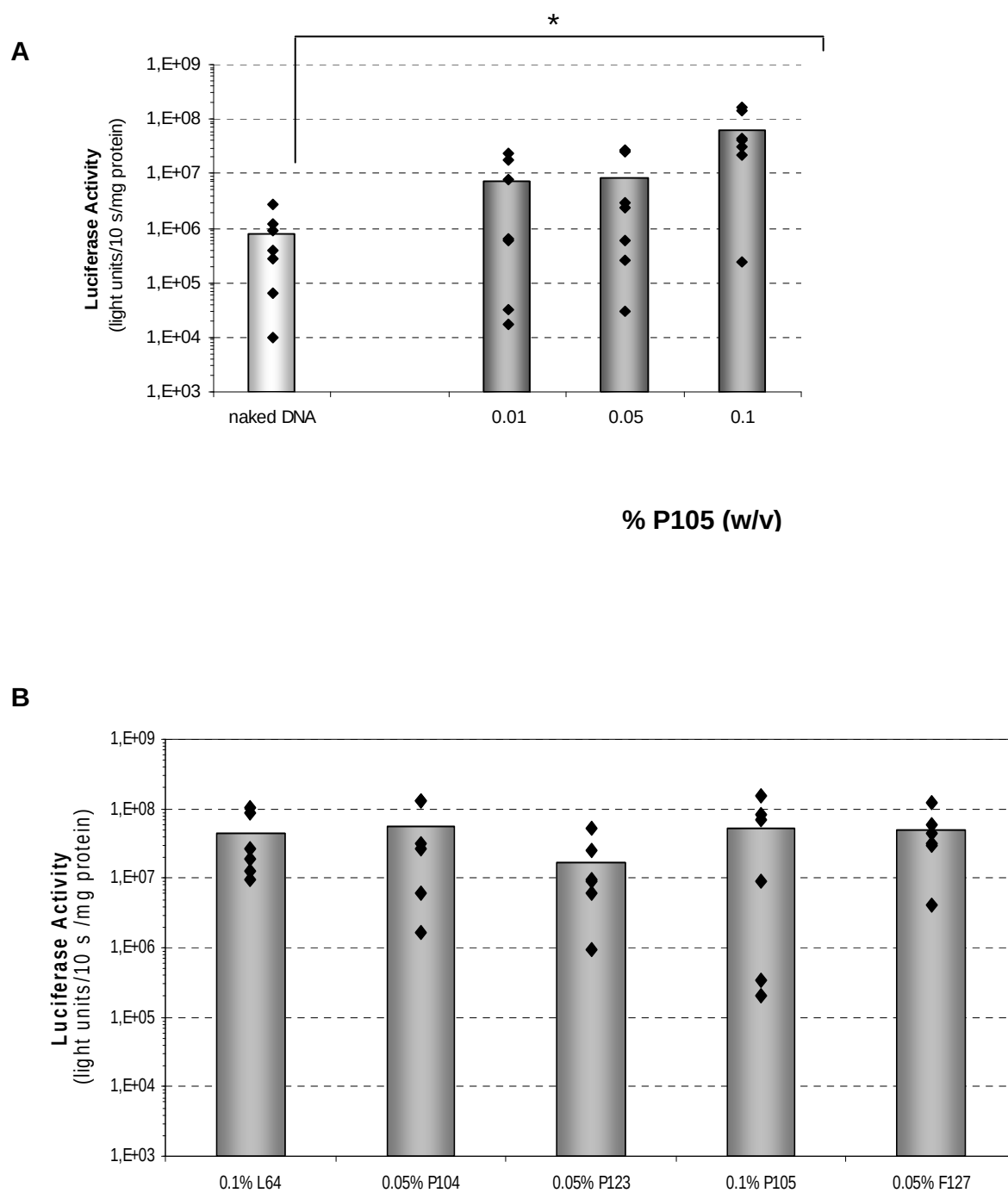


Figure 2

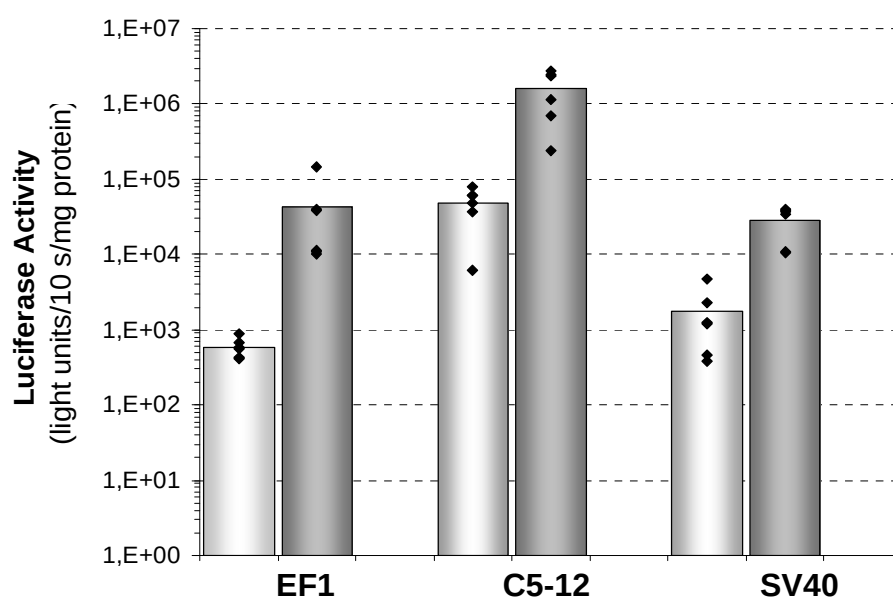


Figure 3

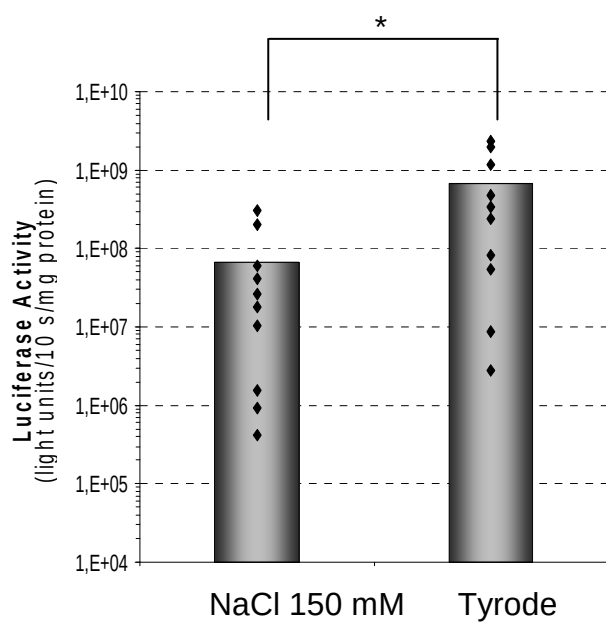


Figure 4

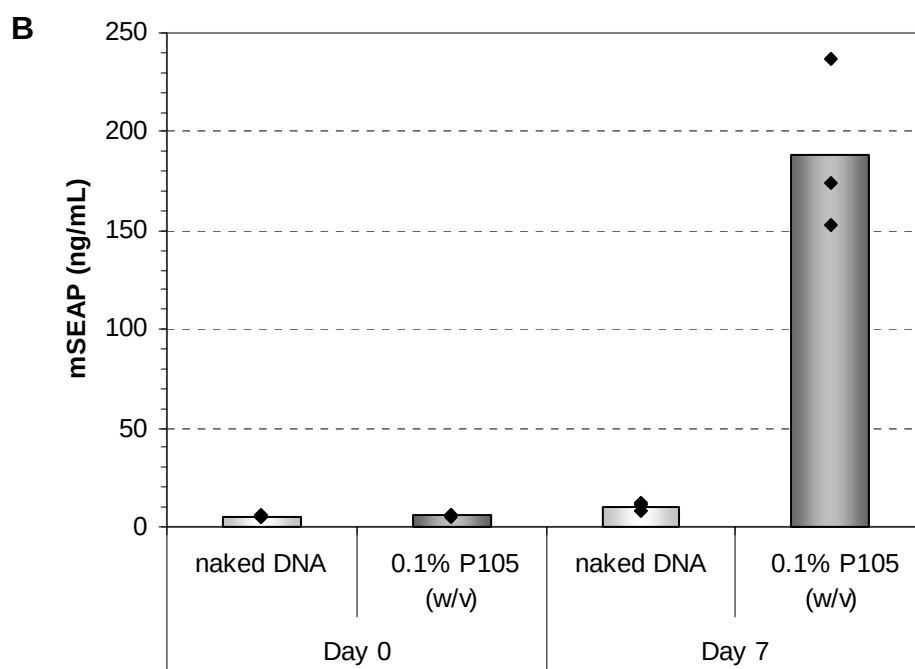
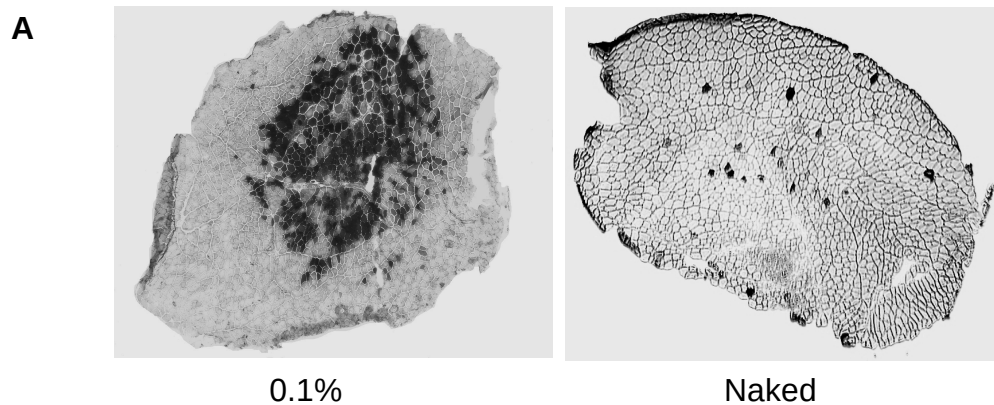


Figure 5

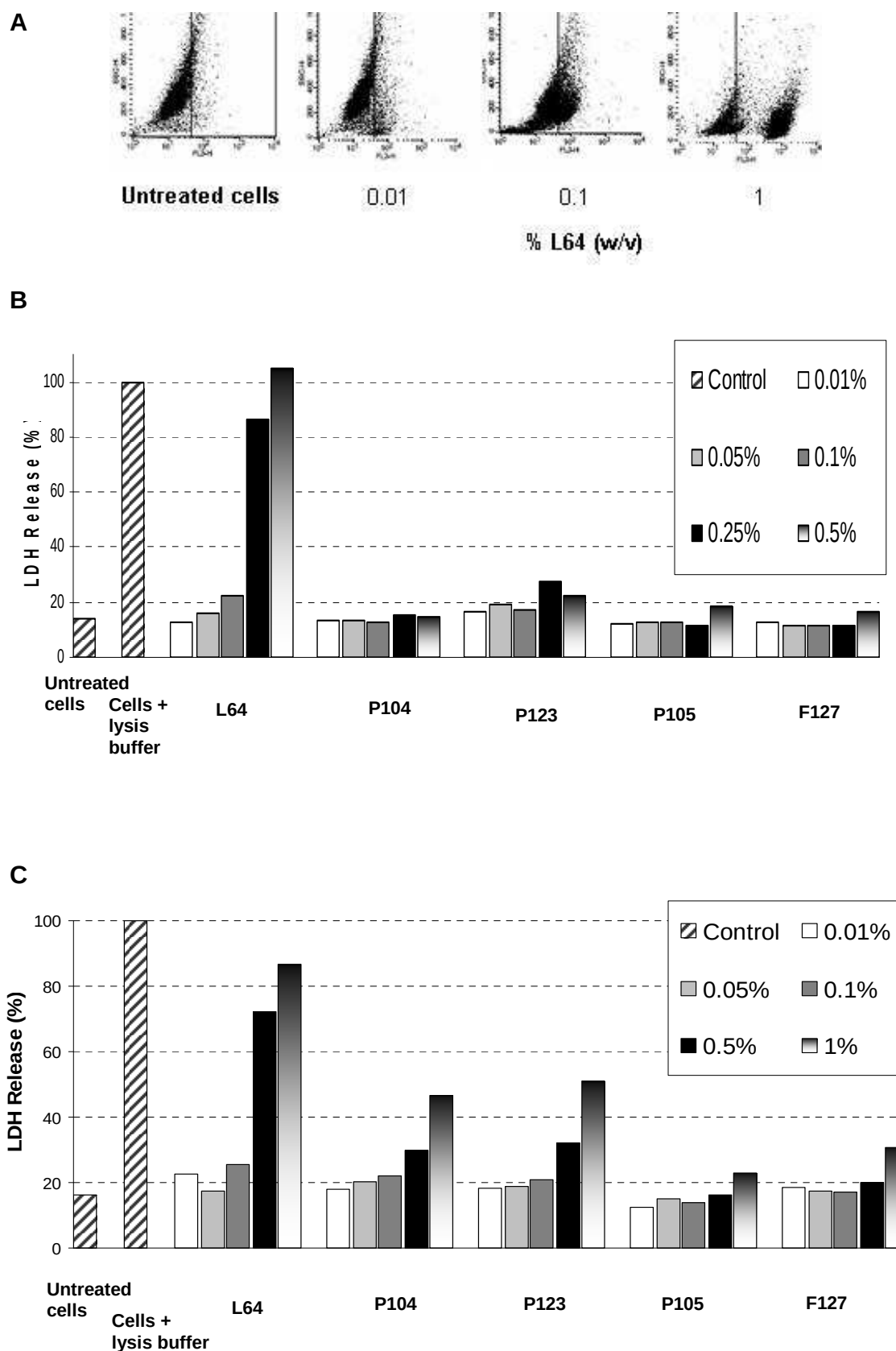


Figure 6

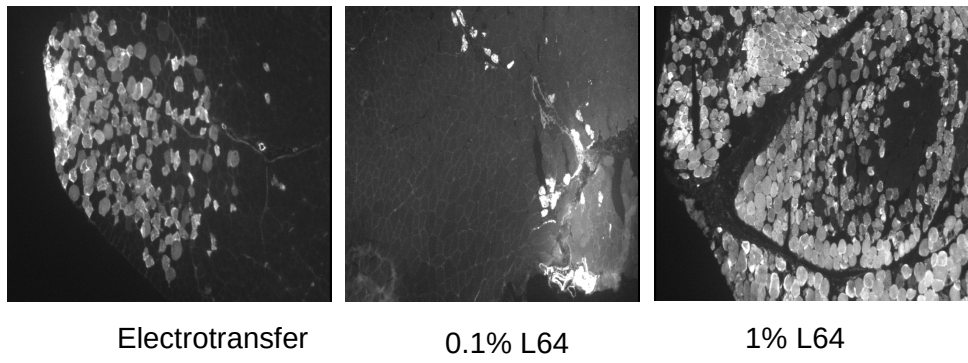


Figure 7

Résumé

RÉSUMÉ

La thérapie génique consiste à délivrer des acides nucléiques dans des cellules afin d'obtenir un effet thérapeutique. Les techniques de vectorisation d'ADN qui ont été développées au cours de ces 2 dernières décennies peuvent être divisées en deux grandes catégories, à savoir les vecteurs viraux et les approches non virales. Parmi les stratégies non virales, on peut distinguer celles basées sur des techniques physiques (électroporation, biolistique, injection sous pression...), celles utilisant des molécules non chargées, et celles qui sont les plus utilisées, à savoir les approches utilisant des composés cationiques.

Au cours de notre travail de thèse, nous avons tout d'abord examiné l'efficacité du transfert de gène médié par la technique d'électrotransfert d'ADN plasmidique. Les résultats que nous avons obtenus n'étaient pas du niveau de ceux publiés. Par conséquent, compte-tenu des nombreux obstacles qui se sont présentés à nous à cause de la défaillance du matériel, nous avons décidé de nous consacrer à l'étude de nouveaux systèmes de vectorisation non virale.

Récemment, il a été montré que des copolymères amphiphiles non chargés, constitués de motifs oxyde de polyéthylène (POE) et oxyde de polypropylène (PPO), sont capables d'améliorer l'efficacité de transfection dans le muscle. Afin de mieux comprendre quelles propriétés sont requises pour avoir un transfert de gènes efficace, nous avons décidé de faire une étude structure-activité. Pour cela, nous avons testé l'activité *in vivo* de plusieurs copolymères qui diffèrent par leur poids moléculaire et/ou par leur équilibre hydrophile/hydrophobe. En employant la luciférase comme gène rapporteur, nous avons montré que tous les poloxamères testés augmentent l'expression au niveau musculaire de manière significative comparé à l'injection d'ADN nu. Ceci montre qu'il n'existe pas un composé unique POE-PPO-POE pour améliorer le transfert de gène dans le muscle mais qu'il existe, en fait, une grande flexibilité en termes de poids moléculaire et de rapport hydrophile/hydrophobe. En parallèle, des études ont été menées *in vitro* afin d'une part, d'évaluer la cytotoxicité de ces produits, et d'autre part de mieux comprendre le mécanisme d'action de ces molécules. Nos résultats indiquent que ces polymères sont peu toxiques et qu'ils n'améliorent pas le transfert de gènes en perméabilisant la membrane des cellules musculaires.

Enfin, nous nous sommes intéressés à l'étude des acides biliaires dans le transfert de gènes. En effet, l'acide déoxycholique est capable d'améliorer le transfert de gène avec une efficacité égale, voire supérieure, à celle des poloxamères. Les tests effectués *in vitro* et *in vivo* donnent à penser que le DOC pourrait améliorer l'entrée de l'ADN dans les fibres grâce à une perméabilisation transitoire. Ceci reste cependant à être démontré plus clairement. Des études plus poussées chez des modèles dystrophiques avec différentes cassettes d'expression « thérapeutiques » devront être réalisées afin de conclure quant au potentiel réel du DOC pour ce type d'approches. Enfin, il reste également à poursuivre des études mécanistiques afin de mieux comprendre son mode d'action.

Mots clés : transfert de gènes non viral ; copolymères amphiphiles ; muscle squelettique ; perméabilisation membranaire