



HAL
open science

Transfert de gènes non-viral à destination des muscles squelettiques par injection hydrodynamique via la veine saphène : pistes d'optimisations et mise en application chez la souris

Yann Le Guen

► **To cite this version:**

Yann Le Guen. Transfert de gènes non-viral à destination des muscles squelettiques par injection hydrodynamique via la veine saphène : pistes d'optimisations et mise en application chez la souris. Médecine humaine et pathologie. Université de Bretagne occidentale - Brest, 2019. Français. NNT : 2019BRES0108 . tel-03621300

HAL Id: tel-03621300

<https://theses.hal.science/tel-03621300v1>

Submitted on 28 Mar 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE
DE BRETAGNE OCCIDENTALE
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine,
Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et Biomatériaux

Par

Yann LE GUEN

Transfert de gènes non-viral à destination des muscles squelettiques par injection hydrodynamique *via* la veine saphène : pistes d'optimisations et mise en application chez la souris

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 18 décembre 2019

Unité de recherche : UMR INSERM 1078, Génétique, Génomique fonctionnelle et Biotechnologies

Rapporteurs avant soutenance :

Oumeya ADJALI Chargée de recherche, UMR INSERM 1089
Vincent MOULY Directeur de recherche, UMR CNRS 7215

Composition du Jury :

Président :	Philippe GUÉGAN	Professeur des universités, IPCM
Examineurs :	Patrick MIDOUX	Directeur de recherche, UPR CNRS 4301
	Philippe GUÉGAN	Professeur des universités, IPCM
	Oumeya ADJALI	Chargée de recherche, UMR INSERM 1089
	Vincent MOULY	Directeur de recherche, UMR CNRS 7215

Dir. de thèse : Tristan MONTIER
Co-dir. de thèse : Tony LE GALL

Professeur des universités-Praticien hospitalier, UMR INSERM 1078
Chargé de recherche, UMR INSERM 1078

« On ne se baigne jamais deux fois dans le même fleuve »

Héraclite

À mes parents

Remerciements

Je souhaiterais dans un premier temps remercier le Docteur Emmanuelle Génin et le Professeur Claude Férec de m'avoir accueilli au sein de l'unité de recherche INSERM 1078 de Brest. De même, je remercie nos financeurs dont l'Association Gaétan Saleün et tout particulièrement l'Association Française contre les Myopathies (AFM). Je remercie aussi le Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche qui m'a financé durant ces 3 années.

Je tiens à remercier le Docteur Oumeya Adjali et le Docteur Vincent Mouly d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. C'est un immense honneur que vous me faites de lire, d'apporter votre expertise, votre regard scientifique sur ces trois années de travaux. Je tiens à vous exprimer ma plus grande gratitude. Je souhaite de même exprimer mes remerciements les plus sincères aux Professeurs Patrick Midoux et Philippe Guégan pour avoir accepté de prendre parti à ce jury de thèse. C'est un privilège que de vous compter au sein de ce dernier et de bénéficier de vos points de vue scientifique sur le travail effectué. J'aimerais de même vous remercier pour les interactions et échanges enrichissants que j'ai eu la chance d'avoir avec vous durant ce doctorat.

J'aimerais dire merci au Docteur Serge Braun d'avoir accepté de participer et d'apporter son expertise quant à la review « Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations » rédigée au cours de ce travail de thèse. De même je tiens à le remercier de nous avoir gracieusement fourni les plasmides pTG11033 et pTG14860.

Je tiens à remercier les professeurs Thibaut Larcher et Pascal Loyer pour leur participation lors de mon comité de suivi individuel, ainsi que pour leurs points de vue, les discussions scientifiques et les conseils fournis.

Les prochains remerciements que j'effectue vont ici aux trois personnes qui m'ont pris sous leurs ailes et qui m'ont donné la chance d'apprendre le métier de chercheur à leurs côtés :

Tout d'abord, je remercie le Professeur Tristan Montier. Tristan, vous m'avez accueilli dans votre équipe, et porté jusqu'en thèse. Sans vous, ce travail n'aurait pas été effectué dans d'aussi bonnes conditions. Ce que je retiendrai surtout c'est que vous êtes une personne de confiance, compréhensive et profondément humaine. J'ai eu la chance de vous avoir comme directeur de thèse. J'ai énormément appris, en plus de m'être épanoui, merci Tristan.

Je remercie gracieusement le Docteur Tony Le Gall. J'ai eu la chance de t'avoir comme co-directeur pour ce travail de thèse et précédemment comme encadrant de stage. Tu m'as énormément appris tant sur les plans professionnel que personnel. Sans toi cette thèse n'aurait pas été la même. J'ai eu la chance d'avoir un co-directeur d'une grande humanité. Merci à toi de m'avoir permis de me hisser jusqu'ici. J'ai l'impression d'avoir drôlement « grandi » à tes côtés. Je te souhaite tout le meilleur. Merci Tony.

Je remercie énormément le Professeur Pierre Lehn. Pierre, la passion avec laquelle vous parlez de votre métier et vos anecdotes à travers lesquelles nous revivons un grand pan de l'histoire de la thérapie génique sont toujours riches d'enseignements. C'est une grande chance de vous avoir rencontré et de pouvoir échanger avec vous. Merci pour toutes les conversations qu'elles soient scientifiques ou non. Merci Pierre.

Rosy... pardon, Docteur Ghanem, je suis content d'avoir passé ces années de thèse en ta compagnie. Ta thèse sera géniale. Merci d'avoir supporté mon stress, mes doutes et mes blagues de mauvais goûts... Je pourrais en dire de même pour toi Tanguy, Monsieur Haute. Certaines séances de « broyats » n'auraient pas été les mêmes si tu n'avais pas été là pour m'aider. Je te remercie énormément. J'aimerais aussi remercier Julian Ravel, stagiaire avec qui j'ai eu la chance de travailler. De même, je remercie Daniela Ogoczyk-Makowska et Christophe Toussaint, je vous souhaite le meilleur pour les thèses que vous avez respectivement entamées. Je ne pourrais oublier ici Paul Langard, qui a aussi contribué à ce travail de thèse, en nous apportant ses compétences et son œil critique. Merci à toi. Enfin je remercie Pauline Mauger et Chloé Henry, auprès desquelles j'ai eu la chance de travailler pendant un an. Vous êtes superbes, ne changez rien. Merci à vous deux.

Une pensée aux autres stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer durant ces années, Jérôme, Brian, (les) François, Romane, Morgane, (les) Alexandre, Mathilde...

Je souhaite remercier les autres membres de l'équipe « Transfert de gènes et Thérapie génique » auprès desquels j'ai eu la chance d'évoluer. Merci à vous, Fred, Véro, Julie, Yann et Pierre-François.

Je ne peux que remercier le Professeur Paul-Alain Jaffrès et son équipe, pour les réunions « chimistes / biologistes » intéressantes et les idées en découlant. J'aimerais aussi les remercier pour l'accès à leur équipement. Je vous souhaite le meilleur.

J'aimerais exprimer ma gratitude aux « Corcos » (notamment Brigitte, Danielle, Tiffany et Marie) pour nous avoir permis d'accéder à leur matériel mais aussi et surtout pour leur grande sympathie et leur immense gentillesse. De même, je remercie l'ensemble des membres de l'unité INSERM 1078.

J'aimerais ici remercier le service d'anatomopathologie de l'hôpital Morvan de Brest, qui m'a permis de venir profiter de leurs expertises en histologie concernant le muscle.

Dans le même esprit, je souhaiterais émettre ma gratitude au Professeur Douraied Ben Salem ainsi qu'à son équipe pour leur expertise en termes d'IRM.

I would like to thank here the Professor Holger Schönherr from Siegen University and his group. By the same way, I would like to thank the Professor Ulrich Jonas, "Uli" and his team (especially Max, Thorben, Cleiton and Niklas) for the science done together but also and especially for all the great times we had.

Those next thanks for the Professor Jon A. Wolff, pioneer in the world of skeletal muscles gene transfer and inventor of the Hydrodynamic Limb Vein injection. To meet you during your stay in Brittany was a great honor.

J'aimerais dans ce paragraphe remercier mes amis, Jérémy, Vincent, Guillaume, Sébastien, Franck, Anaëlle, Andrea, Tony, Kévin, Paul, Luc et Mick pour : **(i)** votre soutien sans faille, **(ii)** les soirées passées à refaire le monde **(iii)** vos attentions et enfin, **(iv)** pour le fait d'être à mes côtés depuis tant d'années.

Je tiens maintenant à remercier ma petite sœur Maëlle. Tu m'as beaucoup aidé, tu ne t'en rends peut-être pas compte, mais je te l'assure. Je remercie tout particulièrement mes parents, Djamila et Thierry Le Guen. Bon sang, qui aurait crû que je serais un jour en train d'écrire ces lignes en « fin de doctorat », comme tu me le répètes souvent papa « fais confiance en la vie », et tu as raison. Je sais que c'est en très grosse partie grâce à vous, à votre soutien, votre amour, et parce que vous avez crû en moi. Merci à vous, de m'avoir permis de faire des études et d'en être arrivé là. Merci aussi à mes grands-parents et à mon parrain, vous avez participé plus que vous ne le pensez à ce travail.

Enfin, j'en viens à toi, Alix, entrée dans ma vie au tout début de cette thèse. Tu es la plus belle chose qui me soit arrivée. Je te remercie d'avoir été et d'être là, et ce malgré la distance.

Table des matières

Avant-propos : la thérapie génique, une épopée	2
I) Introduction	7
1) Le muscle squelettique.....	7
a) Généralités sur le muscle squelettique.....	7
b) Le myocyte, cellule contractile et majoritaire du muscle squelettique	8
c) Contraction et relaxation du muscle squelettique.....	11
d) Transmission des forces et maintien de l'intégrité du sarcolemme : la dystrophine une protéine clé.....	13
2) Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker	19
a) Les dystrophies de Duchenne et Becker, un point historique	22
b) Transmission et histoire naturelle des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker	24
c) Du génotype au phénotype	26
d) L'absence de la dystrophine : un défaut aux multiples conséquences	30
e) Les modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne : avantages et limites	37
3) Approches thérapeutiques actuelles et émergentes	42
Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques	43
4) La thérapie génique	54
a) La thérapie génique, généralités, principe et considérations éthiques	54
b) Les vecteurs pour le transfert de gènes.....	55
c) Les constructions d'acides nucléiques thérapeutiques pour la dystrophie musculaire de Duchenne	71
d) Les modes d'administrations et méthodes physiques de transfert de gènes pour cibler le muscle squelettique	74
Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations.....	77
II) Problématique : injection HLV et efficacité de transfection, quelles pistes d'optimisations ?.....	121
III) Matériel et Méthodes	123
1) Matériel.....	123
a) Plasmides et vecteurs	123
b) Lignées cellulaires et animaux	128
2) Méthodes	128
a) Transfection <i>in vitro</i>	128
b) Transfection <i>in vivo</i>	131
IV) Résultats.....	136
1) Affinement du protocole HLV chez la souris	136
a) Standardisation de l'incision chez la souris Swiss	136
b) Comparaison de deux systèmes de garrot.....	137
2) Injection HLV et franchissement du sarcolemme	140
a) Utilisation de vecteurs cationiques.....	140
Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery	141
b) Utilisation de copolymères tribloc amphiphiles neutres de type poloxamère	153

Non-viral gene transfer to skeletal muscles combining Hydrodynamic Limb Vein injection and poloxamers.....	154
c) Utilisation d'un copolymère tribloc amphiphile neutre original	172
3) Injection HLV et facilitation de l'import nucléaire par utilisation de « DTS »	177
DNA nuclear targeting sequences for enhanced non-viral gene transfer – An <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> study	178
V) Discussion et perspectives.....	244
VI) Conclusion.....	250
Bibliographie	252
Annexes	276
Travaux et réalisations effectués au cours de cette thèse	284

Liste des figures

Figure 1 : La thérapie génique, du mythe à la réalité, enthousiasmes et déconvenues.....	4
Figure 2 : Le muscle squelettique et ses composants.....	7
Figure 3 : Coupe transversale d'un segment de fibre musculaire.....	9
Figure 4 : Le sarcomère et ses composants.....	10
Figure 5 : La jonction neuromusculaire et ses principaux acteurs.....	12
Figure 6 : Structure du gène de la dystrophine.....	14
Figure 7 : La dystrophine et ses domaines.....	15
Figure 8 : La dystrophine et le complexe dystrophine-glycoprotéines.....	17
Figure 9 : Myopathies, classes et origines pathologiques.....	19
Figure 10 : Répartitions des principales faiblesses musculaires en fonction du type de dystrophies.....	20
Figure 11 : Guillaume Duchenne et la dystrophie musculaire de Duchenne.....	22
Figure 12 : Le signe de Gowers.....	23
Figure 13 : Hérité récessive liée à l'X.....	24
Figure 14 : L'histoire naturelle simplifiée de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	25
Figure 15 : Fréquences relatives de mutations responsables de DMD.....	27
Figure 16 : Structure exonique du gène de la dystrophine.....	28
Figure 17 : Dystrophine tronquée de type Becker.....	29
Figure 18 : La perte de dystrophine, voies physiopathologiques et conséquences sur l'homéostasie calcique du myocyte.....	31
Figure 19 : La perte de dystrophine, conséquences et voies physiopathologiques du stress oxydatif.....	33
Figure 20 : La perte de dystrophine, conséquences inflammatoires et immunitaires.....	34
Figure 21 : Coupe transversale de muscle sein et de muscle d'un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne.....	36
Figure 22 : Espérance de vie relative de différents modèles de Dystrophie Musculaire de Duchenne comparativement à celle chez l'Homme.....	41

Figure 23 : Les différents types de stratégies de vectorisation utilisées en thérapie génique.....	54
Figure 24 : Les étapes du transfert de gènes par Adeno-Associated Virus (AAV) recombinant.....	57
Figure 25 : Structure générale typique d'un lipide cationique.....	59
Figure 26 : Représentations schématiques de l'organisation supramoléculaire de lipoplexes.....	61
Figure 27 : Structure chimique de la Poly-L-Lysine.....	62
Figure 28 : Structure chimique du chitosan.....	63
Figure 29 : Structures chimiques de dendrimères PAMAM de (A) 1 ^{ère} et (B) 2 ^{ème} génération.....	64
Figure 30 : Structures chimiques des polyéthylènimines linéaire (IPEI, A) et branchée (bPEI, B).....	65
Figure 31 : Les différentes étapes de la transfection d'un plasmide à l'aide de vecteurs cationiques.....	66
Figure 32 : Structures chimiques générales de Copolymères Tribloc Amphiphiles Neutres (CTAN) de type poloxamères (A-B-A) et « reverse » poloxamères (B-A-B).....	68
Figure 33 : Mécanisme de la formation de pore transitoire membranaire par un copolymère tribloc amphiphile neutre.....	70
Figure 34 : La dystrophine et ses formes optimisées pour la thérapie génique.....	72
Figure 35 : Carte simplifiée du plasmide pLo2 (aussi appelé p(3NF ₁ -Luc-3NF ₂)m).....	123
Figure 36 : Carte simplifiée du plasmide pGM144.....	124
Figure 37 : Carte simplifiée du plasmide pTG11033.....	125
Figure 38 : Carte simplifiée du plasmide pTG14860.....	126
Figure 39 : Structures chimiques des principaux composés utilisés dans les expériences de ce manuscrit.....	127
Figure 40 : Schéma illustrant la réaction chimique permettant l'évaluation de l'activité luciférase avec le kit Luciferase Assay System (Promega).....	129
Figure 41 : Réactions chimiques permettant l'évaluation de la quantité de protéines par échantillon avec le kit BCA protein assay reagent (Interchim).....	130
Figure 42 : Les matériels et étapes du protocole de bioluminescence <i>in vivo</i> normalisé.....	133

Figure 43 : Site d'injection standardisé pour l'injection hydrodynamique <i>via</i> la veine saphène chez la souris.....	136
Figure 44 : Injection HLV et systèmes de garrot.....	138
Figure 45 : Effet du polymère cationique bPEI 25 kDa sur l'efficacité du transfert de gènes du plasmide pGM144 codant la luciférase après injection HLV chez la souris Swiss.....	151
Figure 46 : Injection intramusculaire du plasmide pTG11033 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris Balb/c.....	172
Figure 47 : Signaux de luminescence <i>ex vivo</i> 7 jours après injection HLV du plasmide pTG11033 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris Swiss.....	173
Figure 48 : Fibres musculaires positives au transgène mini-dystrophine 6 jours après injection HLV de 200 µg de pTG14860 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris <i>mdx</i>	174
Figure 49 : Fibres musculaires positives au transgène mini-dystrophine après 3 administrations HLV de 500 µg de pTG14860 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris <i>mdx</i>	175
Figure 50 : Modèle de pré-criblage HLV pour le passage de la matrice extracellulaire.....	247
Figure 51 : Vue des membres inférieurs de souris Swiss par IRM.....	249
Liste des annexes	
Table 1 : Les dystrophies musculaires, diverses origines, divers modes de transmission.....	276
Figure 1 : Les étapes du transfert de gènes par HLV et liste non exhaustive des pistes d'optimisations explorées durant la thèse.....	280
Figure 2 : Diplôme en expérimentation animale, niveau concepteur et réalisateur de procédures.....	282
Figure 3 : Diplôme en expérimentation animale, initiation à la chirurgie expérimentale.....	283

Liste des abréviations

-A-

AAV: Adeno-Associated Virus
AAVsb : AAV simple brin
AAVsc : AAV "self complementary"
ABD : Actin Binding Domain
ACh : acétylcholine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN codant
ADNp : ADN plasmidique
AN : Acide Nucléique
ARNm : ARN messenger
AV : Adénovirus

-B-

BLI : Imagerie de Bioluminescence

-C-

CD : Cluster of Differentiation
CMC : Concentration Micellaire Critique
CMH : Complexe Majeur d'histocompatibilité
CTAN : Copolymères Tribloc-
-Amphiphiles Neutres

-D-

DAG : Dystroglycane
DGC : Complexe Dystrophine-Glycoprotéines
DMB : Dystrophie Musculaire de Becker
DMD : Dystrophie Musculaire de Duchenne
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DOPE : Dioleoylphosphatidylethanolamine
DOTMA : N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,-
-N-triméthylammonium chloride
DTN : Dystrobrévine
DTS : DNA nuclear Targeting Sequence

-G-

GFP : « Green Fluorescence Protein »

-H-

HLB : Balance Hydrophile / Lipophile
HLV : Hydrodynamic Limb Vein

-I-

IL-2: Interleukine-2

IM : Intramusculaire
IP : Intrapéritonéale

-J-

JNM : Jonction Neuromusculaire

-M-

MEC : Matrice Extracellulaire
MPTP : Pore de Transition de-
-Perméabilité Mitochondriale
MTI : Médicaments et Thérapeutique Innovante

-N-

NMD : « Nonsense Mediated mRNA Decay »
nNOs : No synthase neuronale
NOX : NADPH oxydase

-O-

O.C.T : « Optimal Cutting Temperature »

-P-

PA : Potentiel d'Action
PAMAM : Polyamidoamines
Pb : Paires de bases
PEG : Polyéthylène Glycol
PEI : Polyéthylènimines
PEO : Poly(éthylène oxide)
PLB : « Passive Lysis Buffer »
PLL : Poly-L-lysines
pMeOx : Poly(methyloxazoline)
PPO : Poly(propylène oxide)
pTHF : Polytétrahydrofuran

-R-

RLU : « Relative Light Unit »
ROS : Espèces Réactives de l'Oxygène
RS : Réticulum Sarcoplasmique
RSV : « Rous Sarcoma Virus »

-S-

SAC : « Stretch-Activated Channels »
SCID : Syndrome sévère d'immunodéficience
SGL : Sarcoglycane

SMA : Amyotrophie Spinale
SOC : « Super Optimal Broth »
SOCE « Store Operated Calcium Entry »
SPV : Papilloma virus de Shope
SSPN : Sarcospanes
STP : Syntrophines

-T-

TILs : Tumour-Infiltrating Lymphocytes
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRP : « Transcient Receptor Potential »
TRPC : « Transcient Receptor Potential
Canonical »

Nota Bene

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe « Transfert de gènes et Thérapie génique » de l'UMR INSERM 1078 « Génétique, Génomique fonctionnelle et Biotechnologies » de Brest.

Le présent manuscrit a pour but de fournir des éléments de compréhension, de justifier et d'appuyer le travail y étant rapporté. Il n'a pas la prétention de lister de manière exhaustive les travaux de recherches et mécanismes pathologiques mis en jeu dans les dystrophies, en particulier celle de Duchenne.

Pour une identification aisée des principales sections du document, un code couleur a été instauré.

Les figures de ce document ne comportant pas de mention « d'après » ou « modifié de » sont originales et ont été conçues au moyen des logiciels Microsoft Powerpoint©, Microsoft Excel©, Chemdraw©, Prism 7© et OsiriX©.

Par souci de clarté, les copolymères de type poloxamères ont uniquement été nommés sous cette appellation dans ce manuscrit. Il existe cependant des dénominations alternatives utilisant les termes tels que Pluronic©, Synperonic© ou Kolliphor© (par exemple, le poloxamère 407 est aussi nommé Pluronic© F-127).

Note de confidentialité et diffusion : La version de ce mémoire présente plusieurs articles sous forme de manuscrits en préparation et destinés à être publiés dans des journaux à comité de lecture. A ce titre, afin d'éviter tous problèmes de publication, ce mémoire ne devra pas être diffusé par l'université ou un tiers avant que les dits manuscrit n'aient été publiés.

Avant-propos : la thérapie génique, une épopée

Les maladies d'origine génétique sont longtemps demeurées incurables et c'est d'ailleurs malheureusement toujours le cas pour la plupart d'entre elles. Cependant, de nombreux progrès ont été réalisés les concernant, grâce à l'avènement de nouvelles approches thérapeutiques, comme la thérapie génique. Cette dernière, qui aujourd'hui aboutit en clinique, a pu naître par l'avancement concomitant de plusieurs disciplines scientifiques et, aux progrès de la recherche fondamentale et appliquée. Le siècle dernier correspond à l'avènement de la génétique « moderne ». L'histoire débute en 1944, lorsque Avery, MacLeod et McCarty identifie l'acide désoxyribonucléique (ADN) comme support de l'information génétique. Moins de dix années plus tard, en partie grâce aux travaux de Rosalind Franklin, Watson et Crick, décrivent la structure en double hélice de l'ADN (Watson and Crick 1953). Le concept de thérapie génique mûrit petit à petit. Au cours de la même période, en étudiant les échanges génétiques chez *Salmonella typhimurium*, Zinder et Lederberg découvrent un mécanisme différent de la recombinaison sexuée (Zinder and Lederberg 1952). Dans cette publication, les auteurs observent qu'en présence de ce qu'ils nomment « agents filtrables », différents caractères peuvent être transmis dans les bactéries étudiées. Cette transmission se fait à raison d'un caractère par bactérie, et celui-ci reste stable de génération en génération. L'agent responsable de ce phénomène de transfert de gènes est en réalité un bactériophage. Ce phénomène est nommé transduction (Zinder and Lederberg 1952). Par extension, les activités de recherche s'intéressent par la suite aux virus de cellules eucaryotes. Howard Temin découvre alors, en utilisant le Rous Sarcoma Virus (RSV), que des caractères peuvent être transmis chez les cellules eucaryotes de la même manière que pour les bactéries avec les bactériophages (Temin 1961). C'est par ailleurs à partir de ce même virus qu'est découverte un peu plus tard la reverse transcriptase des rétrovirus (Temin and Mizutani 1970; Baltimore 1970). Ceci vaudra à Howard Temin et à David Baltimore, le prix Nobel de physiologie ou médecine de 1975. Les preuves concernant la propriété des virus à introduire leur patrimoine génétique, au sein de celui de la cellule eucaryote, s'accumulent dans les années 1960. L'idée d'utiliser les virus à des fins de thérapie génique est alors évoquée par Edward Tatum, généticien américain, prix Nobel de physiologie ou médecine, dans un article intitulé « Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine » (Tatum 1966). Les progrès de la science fondamentale permettent alors de faire naître de nouveaux concepts thérapeutiques. La fin des années 1960 et le début de la décennie 1970 sont marquées par Rogers et Pfunderer qui établissent une preuve de principe de

transfert de gènes médié par un virus chez une race de tabac turque. Ce virus est celui de la mosaïque du tabac. Cinq années plus tard, Rogers et son équipe accomplissent ce qui peut être considéré comme la première tentative de thérapie génique chez l'Homme (Terheggen et al. 1975). Celle-ci a lieu chez trois patients souffrant d'un trouble du cycle de l'urée lié à un déficit en arginase. Rogers et al. décident alors de leur administrer le papilloma virus de Shope (SPV) par voie intraveineuse. Ce virus, connu pour induire des tumeurs épithéliales bénignes chez le lapin, est choisi en raison d'études antérieures relatant d'une activité arginase plus importante dans les cellules tumorales infectées. Il était donc soupçonné que le virus codait l'enzyme d'intérêt (Rogers 1959). Cet essai ne donnera pas de résultats concluants (Terheggen et al. 1975). Plusieurs années plus tard, il s'avérera que le génome du SPV ne contenait aucun gène codant l'arginase (Wirth, Parker, and Ylä-Herttuala 2013). Le premier protocole officiel de transfert de gènes chez l'Humain a finalement lieu fin 1988. Ce dernier n'est pas réalisé à des fins thérapeutiques mais pour suivre une population cellulaire appelée «tumeur-infiltrating lymphocytes» (TILs), grâce à l'introduction d'un gène codant la résistance à la néomycine (Rosenberg et al. 1990). Rosenberg et al. avaient en effet observé que la présence de ces TILs, accompagnés d'un traitement par administration d'interleukine 2 (Il-2), semblaient induire une régression des tumeurs dans le mélanome métastatique. La même population cellulaire sera par la suite transduite avec une cassette codant le « tumor necrosis factor » (TNF). Cet essai clinique, impliquant 181 patients, donna des résultats positifs, démontrant une absence de croissance des tumeurs traitées (Rosenberg et al. 1993). Durant la même période, un essai de thérapie génique d'une importance majeure est réalisé. Celui-ci débute fin 1990 et concerne le déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (SCID-ADA). Deux enfants atteints par cette pathologie sont traités grâce à une transduction, *ex vivo*, par vecteurs rétroviraux visant à rétablir la production d'adénosine désaminase au niveau des lymphocytes T. Chez un des patients, une réponse positive au traitement est observée (Blaese et al. 1995). Malgré cela, les années qui suivent jetteront le doute sur la thérapie génique en raison de la mort de Jesse Gelsinger. Cette personne est la première dont le décès est directement imputable à cette approche thérapeutique. Cet événement marquant se déroula lors d'un essai clinique portant sur une maladie métabolique lié à un déficit en ornithine transcarbamylase. Le transgène thérapeutique était vectorisé à l'aide d'un vecteur de type Adénovirus (AV). La mort de ce patient sera, par la suite, directement imputée à la quantité de vecteur administrée ainsi qu'à une réaction immunitaire majeure contre ce dernier (Wirth, Parker, and Ylä-Herttuala 2013). L'aspect immunitaire demeure d'ailleurs toujours un obstacle majeur à l'utilisation de vecteurs

viraux recombinants, notamment dans le cadre de ré-administration, même si de nombreuses avancées ont été réalisées. Ce qui deviendra plus tard « l'affaire Gelsinger » amènera à plus de régulations dans les essais de thérapie génique (Collins and Gottlieb 2018). Parallèlement, le projet génome humain, visant à séquencer le génome de l'Homo Sapiens, aboutit à la fin de la période 1990. Les résultats qui en découlent sont ainsi publiés en 2001. Cette connaissance mais aussi les avancées technologiques majeures ayant permis la finalisation du projet, font naître un enthousiasme nouveau à l'égard de la thérapie génique (misant sur le fait que ceci pourrait permettre de guérir potentiellement un grand nombre de maladies) (**figure 1**) (Kaemmerer 2018).

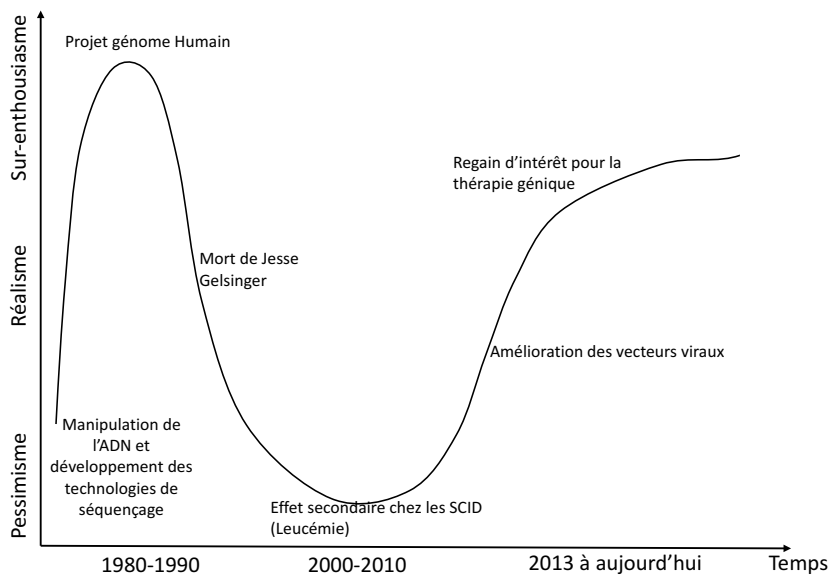


Figure 1 : La thérapie génique, du mythe à la réalité, enthousiasmes et déconvenues (d'après Kaemmerer 2018). Les différentes avancées scientifiques/technologiques ont permis de tester et d'améliorer la mise en pratique du concept de thérapie génique. Ceci a fait rentrer la communauté scientifique et financière ainsi que le grand public, dans différentes phases oscillantes entre pessimisme, réalisme et sur-enthousiasme à l'égard de cette approche potentiellement curative pour un grand nombre de maladies.

Le début des années 2000 est d'ailleurs marqué par ce qui peut être considéré comme le premier succès majeur de thérapie génique. Celui-ci fut obtenu chez des patients souffrants de syndrome d'immunodéficience sévère lié à l'X (SCID-X1). Cette pathologie hématopoïétique est due à un déficit en chaîne gamma de récepteurs à diverses interleukines nécessaires à la maturation des lymphocytes T. Pour cette maladie, différents essais cliniques comprenant notamment trente patients à l'hôpital Necker, ont depuis eu lieu sur une période s'étalant entre 1999 et

2009. L'essai de départ fut réalisé par Alain Fischer et Marina Cavazzana-Calvo. Ces derniers utilisèrent des vecteurs retroviraux pour le transduction *ex vivo* de progéniteurs hématopoïétiques positifs au « Cluster of Differentiation » 34 (CD34+) de neuf patients (Fischer, Hacein-Bey-Abina, and Cavazzana-Calvo 2010). L'essai fut concluant, malgré l'émergence d'effets secondaires, notamment sous forme de leucémie lymphoblastique aigüe. Apparue chez quatre patients, cette complication fut traitée avec succès chez trois d'entre eux. Un des malades y succomba malheureusement. Cependant, chez sept des huit patients restants de l'étude, l'instauration d'une numération satisfaisante en lymphocyte T fut observée. Celle-ci était toujours présente après neuf années de suivi (Hacein-Bey-Abina et al. 2010). Cette étude démontra qu'une correction phénotypique sur le long terme pouvait être conférée par thérapie génique.

Il est important de souligner que ces premiers succès ont tous été obtenus dans des maladies hématopoïétiques permettant un traitement *ex vivo* des cellules cibles. Les différents obstacles et barrières rencontrés classiquement *in vivo* n'étaient ainsi pas présents. Depuis, d'autres succès ont été obtenus, par thérapie génique *in vivo*, c'est notamment le cas du Luxturna®. Ce médicament a pour but de traiter une forme de dystrophie rétinienne héréditaire causée par des mutations du gène RPE65. Cette spécialité thérapeutique à base d'Adeno-Associated Virus (AAV), permet d'apporter des copies saines du gène d'intérêt dans les cellules rétiniennes de patients. Cette thérapie est aujourd'hui commercialisée et a permis d'améliorer de manière significative la vue des personnes traitées (Russell et al. 2017). D'autres avancées majeures ont été réalisées, notamment pour les amyotrophies spinales (SMA). Ces dernières sont des maladies génétiques rares, affectant les motoneurones. Il en résulte une faiblesse musculaire plus ou moins sévère (Mullard 2019). Il en existe cinq types, la SMA de type 0 étant la plus sévère avec une espérance de vie d'un mois en l'absence de traitements et la SMA de type 4 la plus légère (espérance de vie normale et apparition des symptômes à l'âge adulte)(Kolb and Kissel 2015). Récemment différents traitements innovants sont apparus dans l'arsenal thérapeutique de ces maladies dont le Spinraza® (Nusinersen), un oligonucléotide antisens mais aussi une thérapie génique utilisant des AAV (Zolgensma®). Ceci a permis de grandement améliorer la clinique chez les malades (Mendell et al. 2017; Aartsma-Rus 2017). Des thérapies géniques contre le cancer notamment les leucémies lymphoblastiques (Kymriah®) ou les lymphomes à grandes cellules B (Yescarta®) ont aussi été commercialisées (Kaemmerer 2018). Des essais prometteurs sont actuellement en cours concernant d'autres

pathologies comme la Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD), maladie qui sera abordée plus longuement dans l'introduction de cette thèse (Duan 2018). Comme il a pu être constaté, après de nombreuses déconvenues, le monde de la thérapie génique a connu plusieurs succès. Actuellement, c'est plus de 2600 essais cliniques de thérapie génique qui ont été ou sont menés (Ginn et al. 2018). Finalement, la thérapie génique fait aujourd'hui partie des Médicaments et Thérapeutiques Innovantes (MTI).

Ce travail de thèse s'inscrit dans ce contexte de succès/autorisations de mise sur le marché des premiers traitements par thérapie génique. Il porte sur l'optimisation d'une méthode d'administration permettant de transférer l'ensemble de la musculature d'un membre isolé par un garrot. Cette technique est appelée Hydrodynamic Limb Vein (HLV) injection. Elle a initialement été conçue à des fins de transfert de gènes non-viral, et c'est dans cet état d'esprit que nous l'avons employée. L'introduction de ce manuscrit a pour but de définir les différents éléments contextuels à l'injection HLV. Elle porte donc sur le muscle squelettique (principal tissu cible de la procédure HLV, ses pathologies, en particulier les dystrophies (pour lesquelles l'injection HLV est particulièrement appropriée). En raison de son incidence, une attention particulière sera portée sur la DMD. Enfin, les différents outils classiquement utilisés en transfert de gènes, et pouvant être couplés à l'administration HLV, notamment pour la DMD, sont décrits.

1) Introduction

1) Le muscle squelettique

a) Généralités sur le muscle squelettique

Le tissu musculaire squelettique représente à lui seul 40% de la masse musculaire et 60% des protéines du corps humain. (Frontera and Ochala 2015). Environ 600 muscles squelettiques sont par ailleurs dénombrés et répartis dans l'ensemble du corps. Ils sont reliés aux os par les tendons, et permettent d'assurer, par conversion d'énergie chimique en énergie mécanique, la fonction motrice de l'organisme. Ils permettent également le maintien de la posture et de la température du noyau interne ainsi que le stockage d'acides aminés pour d'autres organes (Frontera and Ochala 2015). Toutes ces fonctions sont permises par des particularités intrinsèques à ce tissu, notamment d'ordres anatomique et constitutif.

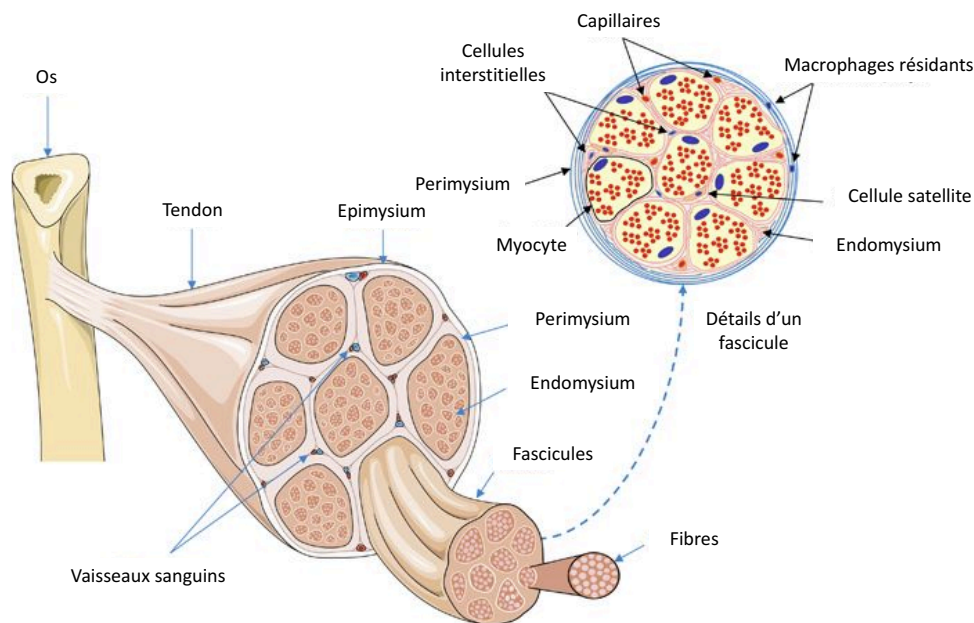


Figure 2 : Le muscle squelettique et ses composants (d'après Sciorati et al. 2016). Le muscle squelettique est une structure organisée. Ce dernier est recouvert par une aponévrose, ou épimysium, prolongée par des tendons reliés aux os. En position sous-jacente à l'épimysium, des faisceaux, fascicules de fibres musculaires sont retrouvées. Ces structures sont enveloppées par du périmysium. De manière individuelle, chaque fibre est entourée d'endomysium. On y retrouve notamment des capillaires et diverses cellules interstitielles. En périphérie des fibres, collées à ces dernières, sont retrouvées les cellules satellites.

D'un point de vue anatomique, le muscle squelettique peut être décomposé en plusieurs niveaux (**figure 2**). À son niveau le plus externe, le muscle est entouré par l'épimysium (ou aponévrose) aux extrémités duquel se trouvent les tendons. À un niveau intermédiaire, le pérимysium entoure des faisceaux de fibres musculaires. Enfin, à un niveau inférieur, se trouve une enveloppe de tissu conjonctif supplémentaire appelée endomysium entourant chaque fibre musculaire de manière individuelle (**figure 2**). Les muscles squelettiques sont par ailleurs richement vascularisés. Le réseau sanguin part d'artères nourricières et se termine par un réseau capillaire très dense (Korthuis 2011). Ces caractéristiques anatomiques permettent entre autres le transfert de gènes par injection HLV, mais constituent pour certaines d'entre elles des obstacles potentiels (**voir revue : « Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations »**).

Au niveau cellulaire, le muscle est majoritairement constitué de myocytes (le chapitre suivant sera d'ailleurs dédié à cette cellule). En parallèle de ces derniers, entre leur membrane plasmique et la lame basale, se trouve une autre population cellulaire hétérogène mononucléée : les cellules satellites (Mauro 1961). Ces cellules de petite taille sont les cellules souches du tissu musculaire. Leur capacité de prolifération et de fusion leur permet de se différencier en myocytes, participant à la croissance et à la régénération musculaire. De même, elles possèdent une activité de réparation en fusionnant avec les fibres endommagées (Dumont et al. 2015). Ces cellules sont activées sous l'effet de différents stimuli comprenant des stress mécaniques et lésionnels (Brack and Rando 2012). D'autres cellules souches / progénitrices sont aussi présentes au sein du muscle squelettique en périphérie des vaisseaux sanguins. Ces dernières ont un potentiel fibro ou adipogénique (Judson, Zhang, and Rossi 2013). D'ailleurs des fibroblastes se trouvent au niveau interstitiel, au sein de l'endo et du pérимysium. Ces cellules assurent la synthèse de matrice extracellulaire (MEC) et sont donc importantes pour le maintien de l'architecture du muscle (Chapman, Meza, and Lieber 2016).

b) Le myocyte, cellule contractile et majoritaire du muscle squelettique

Le muscle est composé de 75 à 90% de myocytes, aussi appelés fibres musculaires (**figure 3**). Ces cellules ont un diamètre de 10 à 100 μm pour une longueur de 100 μm à 30 cm. Elles sont riches en protéines, constituant 80% de leur poids sec (Frontera and Ochala 2015). Par ailleurs, les myocytes sont plurinucléés avec des noyaux en position périphérique. Ils sont donc sous le sarcolemme, membrane plasmique du myocyte, composée d'une bicouche lipidique (classique

de ces structures), doublée sur sa face externe d'une mince couche de glycocalix (Foulkes 2012).

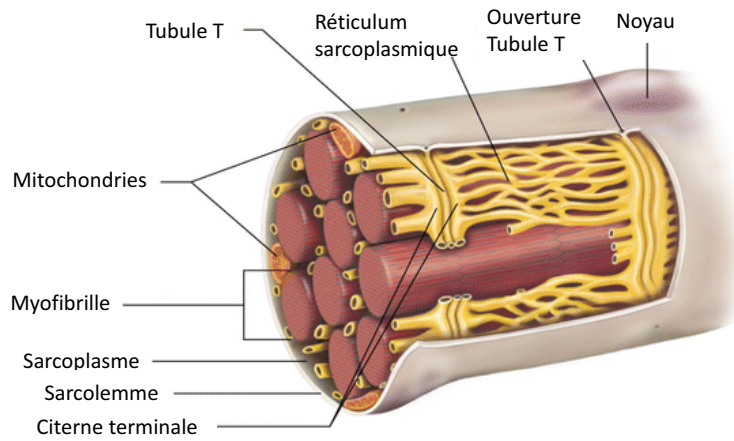


Figure 3 : Coupe transversale d'un segment de fibre musculaire (d'après Baechle and Earle 2008). Les principaux constituants d'une fibre musculaire sont représentés, à savoir le sarcolemme, membrane plasmique du myocyte, contenant des ouvertures se prolongeant par des invaginations appelées tubules T ou tubules transverses. Ces derniers se trouvent au sein du sarcoplasme riche en mitochondries, en réticulum sarcoplasmique (RS) et en myofibrilles. Le RS possède des citernes terminales en contact avec les tubules T. Les noyaux de ces cellules se trouvent en périphérie sous le sarcolemme.

Le sarcoplasme est le cytoplasme du myocyte (**figure 3**). Il est riche en mitochondries, véritables centrales énergétiques cellulaires. Ces organelles sont réparties dans toute la fibre musculaire y compris en périphérie du sarcolemme, là où l'oxygène est rapidement disponible à partir des capillaires. En plus de contenir des mitochondries, le sarcoplasme est riche en réticulum sarcoplasmique (RS), équivalent à du réticulum endoplasmique lisse. Ce dernier permet, le relargage et le stockage de Ca^{2+} , actions nécessaires à la contraction / relaxation musculaire, grâce à ses citernes terminales. Celles-ci sont en contact avec des structures appelées tubules transverses ou tubules T. Les tubules T sont des invaginations du sarcolemme, formant un véritable réseau, qui permettent la conduction rapide de signaux sous forme de potentiel d'action (PA) à l'intérieur du myocyte, malgré sa taille importante (Al-Qusairi and Laporte 2011). Le RS ainsi que les tubules transverses entourent des structures, mesurant 1 à 2 μm de diamètre, appelées myofibrilles. Elles donnent aux muscles squelettiques leur aspect

strié, et sont constituées de myofilaments. Ces derniers sont des protéines qui s'organisent en sarcomères, unités contractiles de la fibre musculaire.

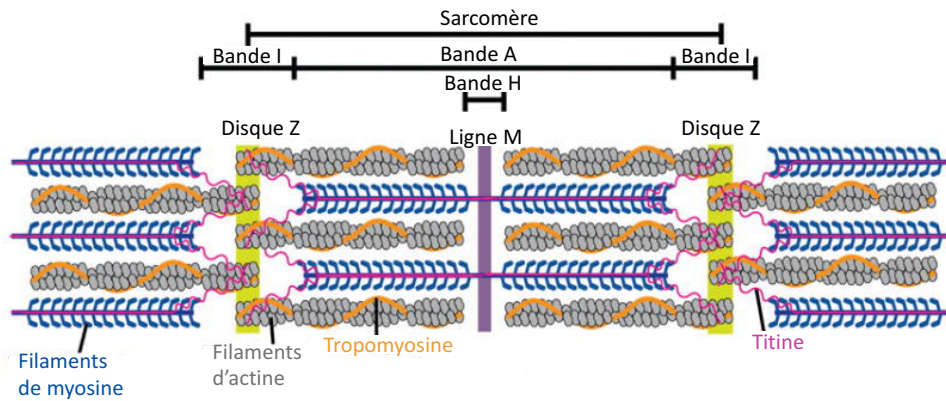


Figure 4 : Le sarcomère et ses composants (d'après Henderson et al. 2017). Le sarcomère constitue l'unité de base et l'unité contractile de la myofibrille. Un sarcomère se situe entre 2 disques Z (en jaune) et est constitué de filaments de myosine, dits filaments épais (en bleu) ; de filaments d'actine, dits filaments minces (en gris) ; de filaments de titine (en violet). D'autres protéines sont également présentes comme la tropomyosine. Différentes « bandes » sont ainsi formées. La bande I correspond aux régions adjacentes des disques Z. Celle-ci ne contient pas de myosine. La bande A correspond en longueur aux filaments de myosine. La bande H est une zone de la bande A qui ne contient pas d'actine, il en est de même pour la ligne M (en violet) qui se situe au sein de la bande H.

Ainsi, les sarcomères sont des structures multi-protéiques dynamiques majoritairement constituées de 3 types de myofilaments (**figure 4**) : **(i)** les filaments d'actine (minces), **(ii)** les filaments de myosine (épais) et **(iii)** les filaments de titines (Henderson et al. 2017). La myosine est considérée comme le « moteur » moléculaire du sarcomère ; elle convertit l'ATP, forme d'énergie chimique de la cellule, en énergie mécanique (Cooper 2000). Les filaments de myosine et d'actine s'entrecroisent au niveau des bandes A (pour anisotropique) et interagissent notamment lors des contractions musculaires (**figure 4**). Des protéines, associées à l'actine, permettent de réguler ces interactions : la tropomyosine et la troponine. Ainsi, en condition basale la tropomyosine couvre les sites de liaison de l'actine pour la myosine. Pour découvrir les sites d'interactions entre les deux myofilaments, une augmentation en Ca^{2+} intracellulaire est nécessaire (le phénomène de contraction est abordé dans la partie suivante) (Frontera and Ochala 2015).

Le troisième type de myofilaments, constitués de titine, protéine géante de 3000 kDa, joue également un rôle important. En effet, la titine grâce à sa capacité d'allongement/rétrécissement, confère aux sarcomères leur élasticité (Tskhovrebova and Trinick 2010). Elle se retrouve au niveau des filaments de myosine et a pour point d'ancrage des disques Z. Cette région particulière est entourée par la bande I (isotrope) (**figure 4**). La titine participe à la stabilisation et à l'alignement des filaments de myosine (Frontera and Ochala 2015). En revanche, lors des contractions musculaires les forces produites par les têtes de myosines étant asymétriques, un déséquilibre est créé. La titine ne peut à elle seule, malgré son rôle de ressort moléculaire, contrebalancer ce dernier (Lange et al. 2019). La stabilisation structurelle du sarcomère est donc complétée par une structure transverse et médiale constituée de protéines M et de myomésines : la ligne M (**figure 4**) (Lange et al. 2019; Agarkova and Perriard 2005). À l'instar des lignes M se retrouvent, à chaque extrémité des sarcomères, les disques Z (Henderson et al. 2017). Ces assemblages protéiques complexes, impliqués dans diverses voies de signalisations, permettent la stabilité mécanique sarcomérique mais assurent aussi un rôle de mécano-transduction (Knöll, Buyandelger, and Lab 2011). On y retrouve l' α -actinine, protéine liant les filaments d'actine aux disques Z ainsi que la « muscle LIM protéin », elle aussi impliquée dans la mécano-transduction et mécano-sensitivité sarcomérique (Rashid et al. 2015).

c) Contraction et relaxation du muscle squelettique

Naturellement, pour assurer leurs fonctions et déclencher la contraction musculaire par raccourcissement des sarcomères, les muscles squelettiques sont innervés. Chaque myocyte est ainsi connecté à un motoneurone au niveau d'une structure appelée jonction neuromusculaire (JNM) (**figure 5**). Celle-ci est constituée (**i**) d'une partie présynaptique constituée par le motoneurone, (**ii**) d'une fente synaptique et (**iii**) d'une partie post-synaptique, en l'occurrence, la membrane post-synaptique du myocyte.

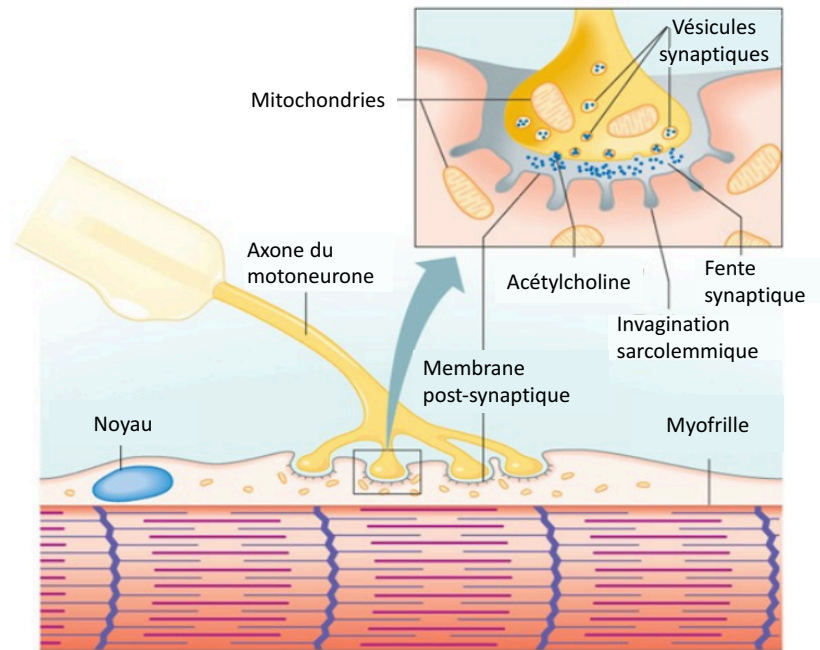


Figure 5 : La jonction neuromusculaire et ses principaux acteurs (d'après Shier, Butler, and Lewis 2014). La jonction neuromusculaire est une structure composée **(i)** d'une partie présynaptique, constituée par le motoneurone et son axone, **(ii)** une fente synaptique et **(iii)** une membrane post-synaptique. L'encadré correspond à un grossissement sur un bouton terminal de l'axone du motoneurone. Des vésicules synaptiques contenant de l'acétylcholine (ACh) migrent vers la membrane bouton terminal afin de relarguer leur contenu dans la fente synaptique. L'ACh peut alors se fixer à des récepteurs nicotiniques se situant au niveau de la membrane post-synaptique pour y déclencher une cascade physiologique menant à la contraction musculaire.

La JNM permet la transmission du signal électrique véhiculé par les nerfs au myocyte par l'intermédiaire d'un messager chimique : l'acétylcholine (ACh). Celle-ci est délivrée dans la fente synaptique *via* exocytose contrôlée, par la partie présynaptique, sous le stimulus d'un PA (Jimshelishvili, Marwaha, and Sherman 2019). La fente synaptique contient par ailleurs de l'acétylcholinestérase, enzyme dégradant l'ACh, permettant de faire revenir à l'état de repos la partie post-synaptique (Omar, Marwaha, and Bollu 2019).

Le phénomène de contraction a lieu lorsqu'un stimulus nerveux est envoyé au myocyte. L'ACh relâchée, depuis l'intérieur de vésicules dans la fente synaptique, se fixe à des récepteurs nicotiniques. Ces derniers entraînent l'ouverture de canaux ioniques permettant l'entrée de Na^+ au niveau cellulaire. Le potentiel de membrane passe alors de -90 à -45 mV. La dépolarisation se propage sous forme de PA le long du sarcolemme et a lieu par l'intermédiaire des tubules T (Jimshelishvili, Marwaha, and Sherman 2019; Omar, Marwaha, and Bollu 2019). Une libération importante de Ca^{2+} a lieu depuis les citernes terminales du RS. Ce phénomène active

alors la troponine, déplaçant la tropomyosine, les sites actiniques de liaison à la myosine sont ainsi disponibles (Frontera and Ochala 2015). Les têtes de myosine entrent ensuite en interaction avec les filaments d'actine. L'activité hydrolase de l'ATP de la myosine entraîne de ce fait un changement de conformation de ses têtes. Un mouvement de glissement des filaments d'actine vers la bande M est créé. Il en résulte un raccourcissement des sarcomères. Les mécanismes décrits entraînent à grande échelle la contraction musculaire (Betts et al. 2013). Le phénomène de relaxation, suivant la contraction, se produit lorsque les stimuli nerveux cessent au niveau de la JNM. Des pompes calciques ATP dépendantes permettent alors la réabsorption du Ca^{2+} par le RS. La tropomyosine retrouve sa conformation initiale masquant les sites de liaisons de la myosine à l'actine.

- d) Transmission des forces et maintien de l'intégrité du sarcolemme : la dystrophine une protéine clé

Pour une contraction efficace, la transmission des forces générées par les sarcomères à l'échelle du muscle est nécessaire. De même, le maintien de l'intégrité du sarcolemme lors de ces événements apparaît critique. Une protéine joue un rôle clé dans ces processus : la dystrophine. Celle-ci est codée par le gène du même nom, qui avec ses 2,5 millions de paires de bases (pb), est le plus grand du génome Humain. Il est situé sur le chromosome X en position xp21.2 et occupe 1,5% du chromosome complet (Muntoni, Torelli, and Ferlini 2003). Le gène de la dystrophine s'organise en 79 exons et possède plusieurs promoteurs tissus spécifiques (**figure 6**). Ces derniers ont été nommés en fonction de la localisation principale de l'isoforme de dystrophine exprimé avec, B et B3 pour « brain » ou cerveau, M pour muscle, P pour cellule de Purkinje, R pour rétine, S pour les cellules de Schwann et G pour général (Blake et al. 2002; Douglas and Wood 2013). C'est cependant au niveau des muscles, en particulier squelettiques, que l'expression du gène de la dystrophine est la plus importante. Sa transcription, à partir du promoteur M, nécessite 16h et l'ARN messager (ARNm) en résultant a une taille de 14 kb (Tennyson, Klamut, and Worton 1995). Sa traduction aboutie à l'isoforme musculaire de la dystrophine, celui dont il est essentiellement question dans ce manuscrit de thèse.

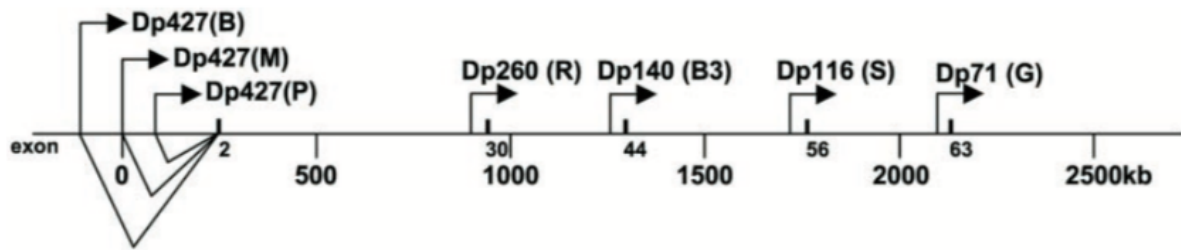


Figure 6 : Structure du gène de la dystrophine (d'après Blake et al. 2002). Le gène de la dystrophine a une longueur totale de 2,5 millions de paires de bases (pb). Il comporte 7 différents promoteurs (Dp) chacun représenté par une flèche noire. Le chiffre qui suit chaque « Dp » indique la masse moléculaire de l'isoforme codé en kDa. Chaque lettre entre parenthèses indique le tissu où ce dernier est exprimé, avec B et B3 pour « brain » ou cerveau ; M pour muscle ; P pour cellule de Purkinje ; R pour rétine ; S pour les cellules de Schwann et G pour général (ou ubiquitaire). Les masses moléculaires des isoformes résultantes de la traduction des ARNm obtenus sont indiquées en Kda.

Ainsi la protéine dystrophine présente dans le muscle strié squelettique est constituée de 3865 acides aminés pour un poids moléculaire de 427 kDa. Elle se trouve en position subsarcolemmique au niveau du myocyte (Gao and McNally 2015). C'est en effectuant un lien entre les sarcomères, *via* l'actine cytoplasmique (protéine située au niveau des disques Z), et la MEC qu'elle permet la transmission des forces latérales générées par les sarcomères (Les forces longitudinales ne comptent en effet que pour 20 à 30% (Bloch and Gonzalez-Serratos 2003)). Enfin, c'est pas par ses nombreux partenaires protéiques qu'elle permet le maintien de l'intégrité du sarcolemme (Zhao et al. 2016; Kyrychenko et al. 2017). Toutes ces propriétés sont attribuables aux spécificités structurelles de cette protéine ainsi qu'à ces nombreux sites d'interactions qui seront abordés plus en détail dans les parties suivantes.

d.1 Structure

D'un point de vue structural, la dystrophine est une protéine composée de quatre domaines, à savoir, **(i)** un domaine N-terminal **(ii)** un domaine tige en position centrale, **(iii)** un domaine riche en cystéines et enfin **(iv)** un domaine C-terminal (**figure 7**).

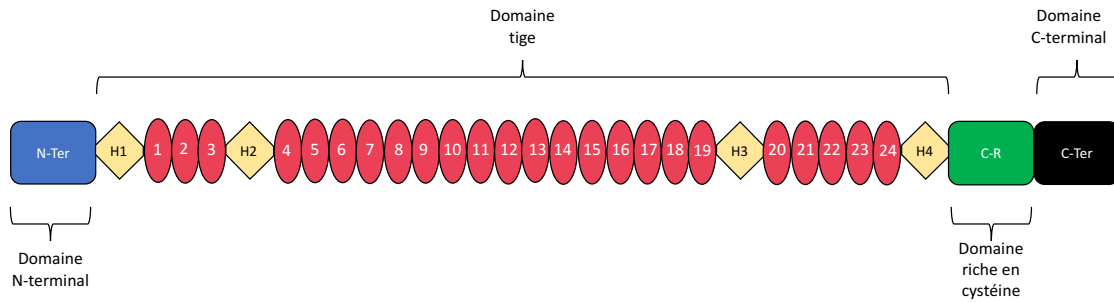


Figure 7 : La dystrophine et ses domaines. La dystrophine est constituée de 4 domaines. Le premier domaine est le N-terminal (N-ter), représenté ici en bleu, suivi par le domaine tige, le plus grand de la protéine. Celui-ci comprend 4 charnières symbolisées ici par des losanges jaunes, (« H » pour « hinge », charnière en anglais). L'avant dernier domaine est riche en cystéines, ici représenté par un rectangle vert avec C-R pour « cysteine rich ». Enfin, peut être cité le domaine C-terminal (C-Ter).

Le domaine N-terminal (**figure 7**) a un poids moléculaire de 30 kDa et correspond aux acides aminés 14 à 246 de la protéine (Ben Yaou et al. 2016). Il est codé par les exons 1 à 8 du gène de la dystrophine (Le Rumeur 2015). Aussi appelé ABD 1 pour « actin binding domain 1 », celui-ci interagit avec l'actine cytoplasmique liée au sarcomère par le disque Z.

Le second domaine, dit « tige » est le plus grand de la dystrophine (**figure 7**), il correspond aux acides aminés 247 à 3045 de la protéine et est codé par les exons 8 à 61 (Le Rumeur 2015; Ben Yaou et al. 2016). Il est constitué de 24 répétitions d'unités « spectrin-like », chacune constituée d'hélices alpha d'environ 110 acides aminés formant une tige d'un diamètre de 5 nm (Gao and McNally 2015). Le domaine tige est entrecoupé par 4 zones charnières ou « hinge », riche en prolines, conférant de la flexibilité à la dystrophine. Les deux premières charnières se trouvent du côté proximal de la dystrophine **(i)** entre le domaine N-terminal et le premier résidu « spectrin-like » et **(ii)** les résidus 3 et 4. Les deux dernières charnières sont retrouvées du côté distal de la protéine et se situent entre **(i)** les résidus « spectrin-like » 19 et 20 ainsi qu'entre **(ii)** le résidu 24 et le domaine riche en cystéines. Le domaine tige de la dystrophine comporte plusieurs sites permettant des interactions avec divers partenaires protéiques. Ainsi, un deuxième domaine d'interaction avec l'actine appelé ABD 2, se trouve

dans cette région au niveau des résidus spectrine 11 à 17. Ce second domaine d'interaction collabore avec la région ABD 1 citée plus haut. Enfin les répétitions 20 à 23 de spectrine sont nécessaires pour l'organisation des microtubules sub-sarcolemmiques (Belanto et al. 2014; Gao and McNally 2015).

Le troisième domaine de la dystrophine, dit riche en cystéine (**figure 7**) permet son ancrage au niveau sub-sarcolemmique, par interaction avec une protéine appelée ankyrine B (Ilsley, Sudol, and Winder 2002; Gao and McNally 2015). Ce domaine est constitué par les acides aminés 3080 à 3360 de la protéine et est codé par les exons 62 à 69 du gène de la dystrophine (Ben Yaou et al. 2016). Il permet aussi les interactions avec les dystroglycanes (DAG) (Hnia et al. 2007).

Le domaine C-terminal (**figure 7**), codé par les exons 70 à 79, correspondant aux acides aminés 3080 à 3360 de la protéine (Ben Yaou et al. 2016). Il possède des interactions avec l' α -dystrobrevine (DTN) et les syntrophines (STP) (voir « le complexe dystrophine-glycoprotéines) (Sadoulet-Puccio, Rajala, and Kunkel 1997).

d.2 Le complexe dystrophine glycoprotéines

La dystrophine en raison ses nombreux domaines d'interaction, se trouve au cœur d'un assemblage d'un complexe protéique au niveau du sarcolemme : le complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) (**figure 8**). C'est finalement en autorisant l'assemblage de ce dernier, que la dystrophine permet les interactions entre sarcomère, sarcolemme et MEC. Ainsi assure-t-elle la stabilisation du sarcolemme et la transmission des forces générées lors des contractions. Ce complexe multi-protéique est de plus impliqué dans plusieurs voies de signalisation (Cerecedo 2017; Bhat et al. 2018). Le complexe DGC est lui-même constitué de sub-complexes protéiques dont les composants peuvent, selon leurs localisations, être divisés en trois classes : **(i)** extracellulaires, **(ii)** transmembranaires ou **(iii)** cytoplasmiques (Lapidos Karen A., Kakkar Rahul, and McNally Elizabeth M. 2004).

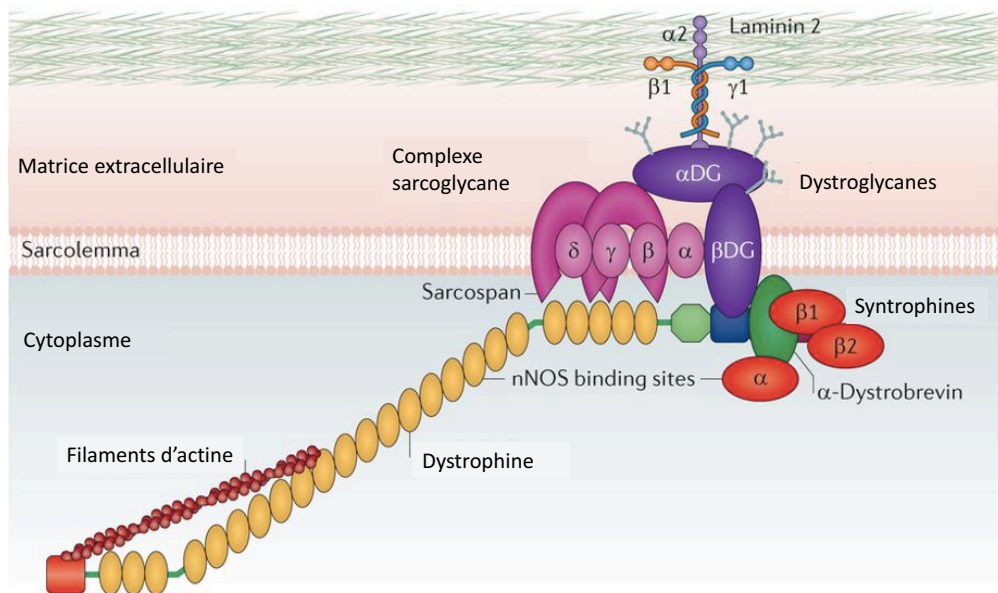


Figure 8 : La dystrophine et le complexe dystrophine-glycoprotéines (d'après Fairclough, Wood, and Davies 2013). La dystrophine est une protéine centrale de la région sarcolemmique. Elle permet l'organisation du complexe dystrophine-glycoprotéines qui joue un rôle clé au sein du myocyte.

Les DAG sont des protéines situées aux niveaux extracellulaire (α -DAG) et transmembranaire (β -DAG) du myocyte (**figure 8**). Ils jouent à la fois un rôle dans l'adhésion cellulaire et permettent d'effectuer une connexion entre les protéines du cytosquelette et celles de la MEC. Les DAG établissent donc, *via* le complexe DGC, un lien entre les milieux intra et extra cellulaires. L' α -DAG interagit avec les constituants de la MEC (laminines, agrine et perlecanes) tandis que le β -DAG interagit directement avec le domaine C-terminal de la dystrophine (Allen, Whitehead, and Froehner 2016; Bhat et al. 2018; Peter, Marshall, and Crosbie 2008).

Au niveau transmembranaire, plusieurs protéines sont retrouvées dont les sarcoglycane (SGL). Ils forment un complexe protéique, conservé au cours de l'évolution, constitué par les SGL α , β , γ , et δ (**figure 8**) (Gao and McNally 2015). Ils renforcent les interactions entre DAG et entre le β -DAG et la dystrophine. Ils jouent ainsi un rôle important dans la stabilisation du sarcolemme (Constantin 2014). Les SGL sont associés à d'autres acteurs transmembranaires du complexe DGC : les sarcospanes (SSPN) (Gao and McNally 2015). Les SSPN permettent une stabilisation du complexe DGC tout en étant impliqués dans des phénomènes de survie et de régénération cellulaire (Gao and McNally 2015).

Au niveau intracellulaire, le DGC comporte une nouvelle fois, plusieurs protéines clés (**figure 8**). Parmi elles, l' α -DTN. Située au niveau de la face intracellulaire du sarcolemme, elle permet sa stabilisation. Elle interagit avec les STP (Ehmsen, Poon, and Davies 2002). Les STP sont en interaction directe avec la dystrophine. Elles sont impliquées dans diverses voies de signalisations cellulaires dont certaines en lien avec l'homéostasie calcique du myocyte. Enfin, les STP permettent la localisation d'un membre important du DGC : la No synthase neuronale (nNOs). Cette dernière interagit de manière directe avec la dystrophine, au niveau de son domaine tige. La nNos catalyse la transformation de L-arginine en oxide nitrique qui, en raison de son effet vasodilatateur, permet une augmentation du débit sanguin musculaire (Nichols, Takeda, and Yokota 2015; Guiraud et al. 2015).

En conclusion, le tissu musculaire squelettique est présent dans l'ensemble du corps et est une structure organisée et complexe. Le myocyte, type cellulaire majeur du muscle strié squelettique, est une cellule particulière du fait de sa physionomie et son fonctionnement. Elle possède ainsi certaines caractéristiques comme la pluri-nucléation ou encore la présence de myofibrilles et de sarcomères. Le muscle squelettique peut en outre, par ses spécificités, être affecté par un ensemble de pathologies et c'est en partie pour cette raison qu'il sera la cible de l'injection HLV.

2) Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker

Diverses pathologies peuvent affecter le tissu musculaire squelettique. Elles sont regroupées sous le terme de myopathies. Ces maladies peuvent-être d'origine génétique ou acquise et se caractérisent par des atteintes musculaires qui peuvent-être structurelle, fonctionnelle, légère ou grave. Elles peuvent débuter à un âge précoce comme se déclarer à l'âge adulte. Une grande hétérogénéité des origines pathologiques peut être constatée.

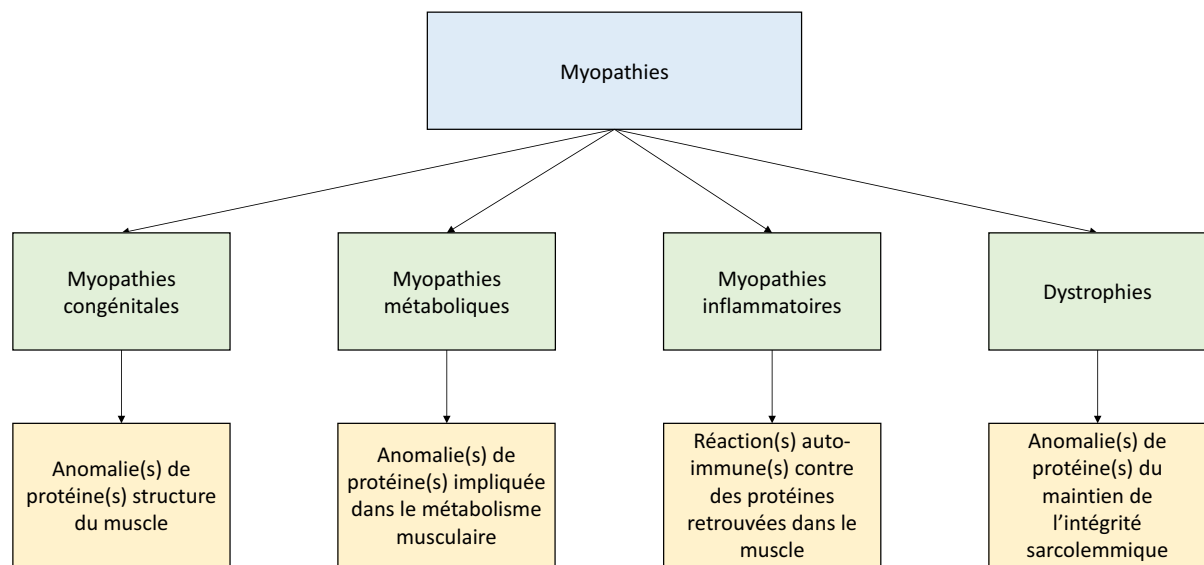


Figure 9 : Myopathies, classes et origines pathologiques (d'après "Myopathies ou maladies neuromusculaires" 2016). Les myopathies (bleu) sont des maladies hétérogènes et peuvent-être classées en plusieurs sous-groupes (en vert). Ces derniers sont constitués par les **(i)** myopathies congénitales, **(ii)** myopathies métaboliques, **(iii)** myopathies inflammatoires et **(iv)** dystrophies. Pour chaque groupe, une étiologie succincte est précisée en jaune.

Traditionnellement, les myopathies sont classées en sous-groupes, à savoir **(i)** les myopathies congénitales, **(ii)** les myopathies métaboliques, **(iii)** les myopathies inflammatoires et **(iv)** les dystrophies musculaires (**figure 9**). Les myopathies congénitales sont causées par des anomalies génétiques affectant les protéines de structure du muscle (Cassandrini et al. 2017). C'est par exemple le cas des myopathies à bâtonnets. Les myopathies métaboliques sont des maladies elles aussi d'origine génétique. Les atteintes concernent cette fois-ci différentes voies métaboliques qui permettent aux muscles de stocker, d'utiliser, de mobiliser certains substrats pour générer de l'énergie (**figure 9**) (Lilleker et al. 2018). Un exemple typique de ces maladies est constitué par les myopathies mitochondriales. Les myopathies inflammatoires (**figure 9**)

sont pour la plupart du temps idiopathiques et très différentes les unes des autres. Elles peuvent aussi résulter de l'utilisation de certains traitements. Aussi appelées myosites, ces maladies découlent de réactions immunitaires dirigées contre des protéines présentes dans le muscle (Lundberg et al. 2016). C'est par exemple le cas des dermatomyosites. Pour finir, viennent enfin les dystrophies (**figure 9**).

Le terme de « dystrophie » regroupe un ensemble de maladies hétérogènes qui affectent généralement de manière directe ou indirecte le sarcolemme et ses protéines de structures (**annexes, table 1**) (Cardamone, Darras, and Ryan 2008). Ces pathologies se caractérisent par une faiblesse musculaire progressive (Mercuri and Muntoni 2013). Cette faiblesse résulte de changements au niveau histologique (lésions diverses). Selon le type de dystrophie, de la même manière que pour les myopathies au sens large, la survenue et la gravité des symptômes peuvent varier. Dans certaines formes, la symptomatique est présente dès la naissance tandis que pour d'autres, les signes n'apparaissent qu'à l'âge adulte (Mercuri and Muntoni 2013).

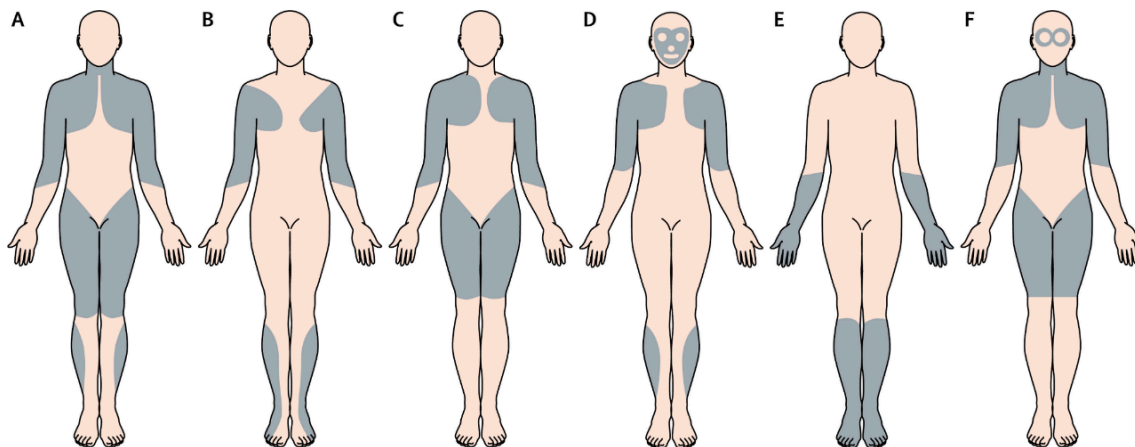


Figure 10 : Répartitions des principales faiblesses musculaires en fonction du type de dystrophies (d'après Emery 1998). Les aires grisées représentent les principales zones musculaires atteintes dans les dystrophies de Becker et Duchenne (A), dans les dystrophies d'Emery-Dreifuss (B), dans les dystrophies musculaires des ceintures (C), dans les dystrophies facio-scapulo-humérales (D), dans les dystrophies distales (E) et dans la dystrophie oculopharyngée (F).

De surcroît, selon le type de dystrophie, différents groupes de muscles sont affectés par la faiblesse musculaire (**figure 10**) (Emery 2002). Un dénominateur commun entre ces entités est l'atteinte systématique des membres de façon proximale et/ou distale. Les modes de transmission sont eux aussi variables, pouvant être liés à l'X, autosomiques, dominants ou récessifs (**annexes, table 1**). Enfin, il existe une certaine hétérogénéité en termes de prévalence entre ces différentes entités pathologiques. Ainsi, la DMD est la plus fréquente des dystrophies dont la symptomatologie débute au stade infantile (Theadom et al. 2014). La présente partie de ce manuscrit y est consacrée. La dystrophie musculaire de Becker (DMB), partageant la même étiologie, y sera aussi abordée.

Du fait de l'atteinte musculaire des membres dans toutes les dystrophies, l'approche de transfert de gènes par injection HLV est particulièrement intéressante pour ce groupe de pathologies. Pour la DMD, ce type d'administration ne permet malheureusement pas de traiter les principales causes de mortalité des patients (voir « transmission et histoire naturelle des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker »). En revanche, une transfection efficace de la musculature des membres par procédure HLV, permettrait aux patients de conserver leur motricité et leur autonomie. L'impact positif sur leur qualité de vie serait alors non négligeable. À terme, cette technique pourrait d'ailleurs être adaptée à des muscles d'importances critiques comme le cœur et le diaphragme. Enfin, elle pourrait être utilisée en tant que soutien à une transduction d'un transgène dystrophine *via* vecteur AAV par voie systémique.

Les premières descriptions de la DMD découlent d'observations macroscopiques et les connaissances acquises, relatées dans les parties suivantes de ce mémoire, résultent d'une longue « aventure » scientifique. Le chapitre suivant a pour vocation de décrire succinctement les chemins qui ont été empruntés. Il relate les premières observations rapportées de patients dystrophiques et DMD jusqu'à l'identification du gène incriminé.

a) Les dystrophies de Duchenne et Becker, un point historique

Les premières descriptions cliniques de formes de dystrophies sont recensées au 19^{ème} siècle. Ainsi, Sir Charles Bell en 1830, fait état du cas d'un patient âgé de dix-huit ans souffrant d'une faiblesse musculaire progressive affectant le bas du corps (Tyler 2003). Six années plus tard, G.Conte et L.Gioja rapportent la clinique de deux frères affectés par une maladie musculaire. Le plus jeune présente une « hypertrophie » de la langue et des muscles des membres inférieurs, quant au plus vieux, il est décédé de ce qui semble être une cardiomyopathie dilatée (Nigro 2008; Tyler 2003; Conte and Gioja 1836).

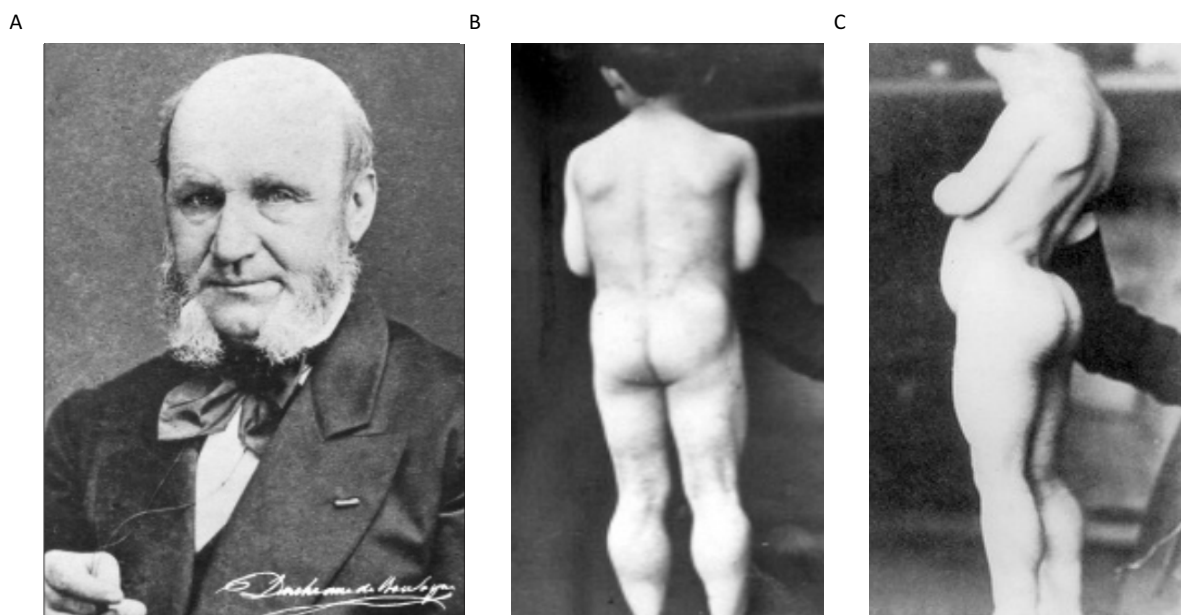


Figure 11 : Guillaume Duchenne et la dystrophie musculaire de Duchenne (d'après Duchenne 1862). (A) Photographie de Guillaume Duchenne datant de 1860. (B et C) Premières photographies d'un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne. Il s'agit ici de Joseph Sarasin alors âgé de sept ans. En B, la fausse hypertrophie des mollets est à noter. En C, la lordose est marquée.

C'est en 1847 que Richard Patridge publie la première description d'un possible cas de DMD. Edward Meryon, cinq ans plus tard, indique le caractère familial de ce qui sera nommée DMD. Il mentionne que les patients sont tous de sexe masculin et remarque que le sarcolemme des fibres musculaires est endommagé (Meryon 1852; Emery 2001). L'histoire suivant son cours, en 1858, Guillaume Duchenne rencontre son premier sujet atteint par la DMD. Il s'agit d'un patient alors âgé de sept ans répondant au nom de Joseph Sarasin (**figure 11**). Il présente des troubles locomoteurs accompagnés d'une hypertrophie et d'un durcissement des muscles.

Une biopsie est effectuée et démontre l'origine musculaire des symptômes (Duchenne 1858). Guillaume Duchenne fournit, dix ans plus tard, une description détaillée de la pathologie observée (Duchenne 1868). Cette publication rapporte des éléments typiques de l'histoire naturelle de la DMD comme l'établissement d'une faiblesse musculaire progressive démarrant par les membres inférieurs, ou encore la présence d'une lordose (Tyler 2003; Kakulas 2008; Duchenne 1868). Finalement, le Professeur Jean Martin Charcot, éminent neurologue français auprès duquel Guillaume Duchenne travaille, propose d'appeler l'entité décrite « myopathie de Duchenne » (Parent 2005). En 1879, Sir William Richard Gowers décrit ce qui est désormais appelé le « signe de Gowers » (**figure 12**), signe clinique typique des myopathies, dont la DMD (Chang and Mubarak 2012).

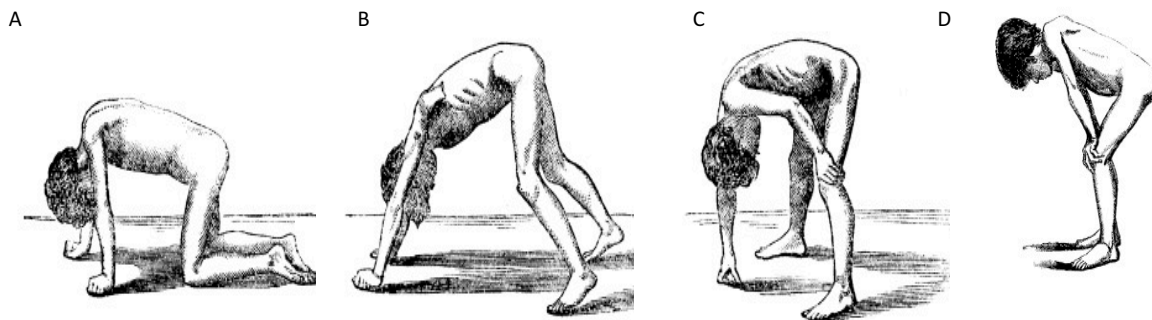


Figure 12 : Le signe de Gowers (d'après Gowers 1879). Lorsque l'enfant atteint de dystrophie musculaire de Duchenne doit passer de la position agenouillée à debout, celui-ci a besoin pour se relever de s'aider de ses bras. Ce signe n'est pas spécifique à la myopathie de Duchenne mais se retrouve classiquement dans cette pathologie.

Le 20^{ème} siècle est marqué par la description de la DMB, celle-ci est similaire à la DMD sur la plan clinique mais avec une histoire naturelle moins sévère (Becker and Kiener 1955). Enfin, le gène de la dystrophine est identifié en 1986. Sa découverte est annoncée lors du congrès « Myology » de Tours par Anthony Monaco. La publication associée à ce fait scientifique d'envergure paraît dans « Nature » le 16 octobre 1986 (Monaco et al. 1986). Peu de temps après, le l'ADN codant (ADNc) est publié par Burghes et al., et son produit, la dystrophine, identifié et publié la même année par Eric P. Hoffman et al. (Burghes et al. 1987; Hoffman, Brown, and Kunkel 1987). Depuis, de nombreuses mutations causant la DMD ont été identifiées.

b) Transmission et histoire naturelle des dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker

Les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker sont des maladies génétiques récessives liées à l’X. Les patients concernés ne sont donc que des garçons (**figure 13**).

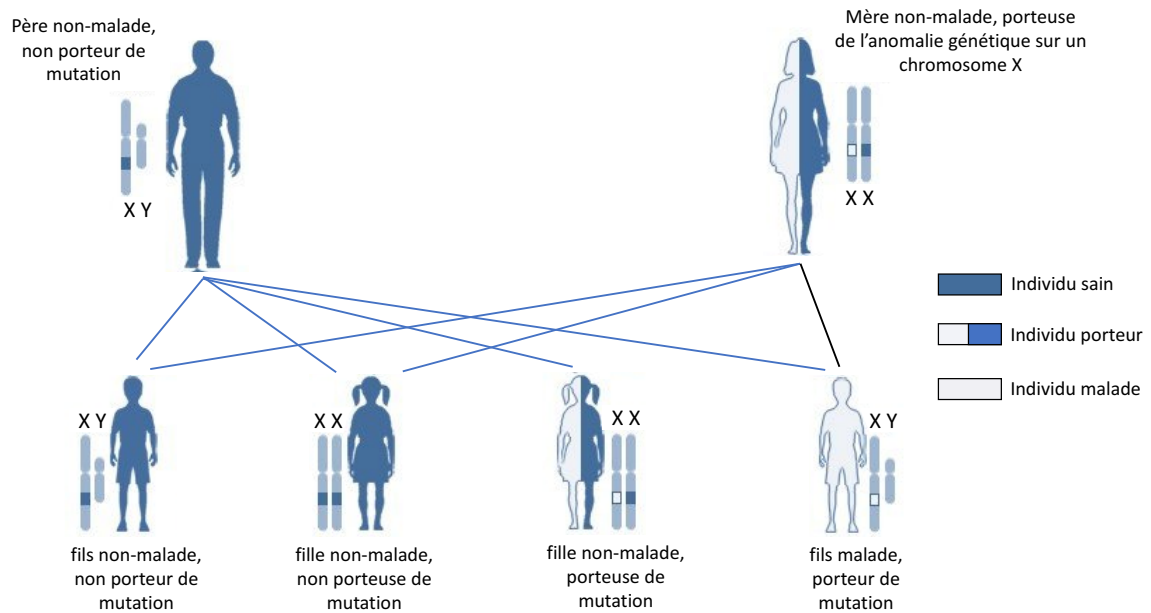


Figure 13 : Hérité récessive liée à l’X (d’après Anonyme 2019). La mère porteuse de la mutation sur un seul de ces chromosomes X n’exprime pas la maladie (ou seulement un phénotype léger). Dans ce cadre, la probabilité d’avoir un garçon malade ou une fille porteuse de l’anomalie génétique est de 25 % chaque tandis qu’elle est 50% d’avoir un garçon ou une fille exempt de l’anomalie génétique.

La DMD concerne 1/ 3500 à 5000 naissances masculines, tandis que, la DMB moins fréquente, concerne 1/ 18000 à 31000 enfants de sexe masculin (Walmsley et al. 2010). Ces deux pathologies tirent leurs origines de mutation(s) du gène de la dystrophine. L’histoire naturelle de la DMD (**figure 14**) peut être divisée en différentes phases (Bushby et al. 2010) :

La première est qualifiée de pré-symptomatique. L’enfant atteint ne présente pas ou peu de symptômes et le diagnostic est rarement établi à ce stade.

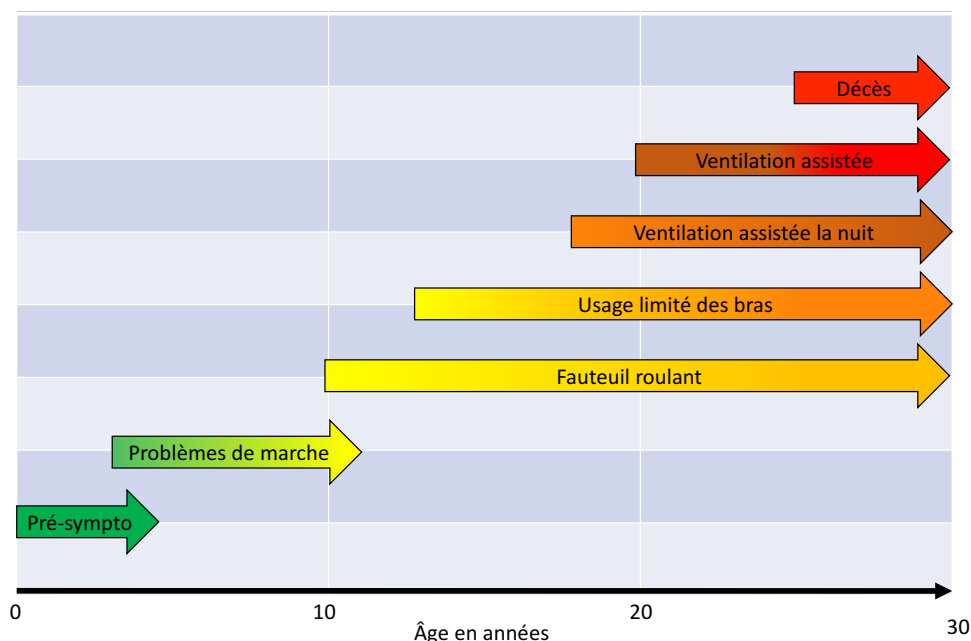


Figure 14 : L'histoire naturelle simplifiée de la dystrophie musculaire de Duchenne. Le gradient de couleur du vert au rouge illustre l'aggravation des symptômes des patients atteints par la myopathie de Duchenne. « Pré-sympto » est utilisé pour pré-symptomatique. La maladie débute par des difficultés à la marche, la faiblesse musculaire des membres inférieurs s'aggrave progressivement obligeant les patients à être en fauteuil roulant vers l'âge de 12 ans. Les symptômes s'aggravent, affectant les membres supérieurs. Une ventilation assistée nocturne est mise en place vers l'âge de dix-sept ans avant d'être étendue à la totalité de la journée. Le décès des patients survient généralement avant trente ans (Blake et al., 2002; Boulay and Chabrol, 2007).

La seconde phase est qualifiée de stade ambulateur précoce. Il correspond aux premiers symptômes de la DMD qui surviennent généralement vers l'âge de trois ans (Liang et al. 2018). Les premières manifestations cliniques sont constituées par des troubles psychomoteurs, avec une acquisition de la marche réalisée dans les limites supérieures de la normale (Desguerre and Laugel 2016). La faiblesse musculaire s'installe de manière proximale au niveau des membres inférieurs. La démarche des patients est dandinante et une pseudo hypertrophie des mollets est constatée (liée à la présence de fibrose et d'infiltrat graisseux). Ces enfants chutent plus fréquemment que leurs camarades du même âge non atteints. Ils présentent de plus un signe de Gowers et des contractures (Peverelli et al. 2015). À la vue de ses éléments, le diagnostic clinique de la maladie est généralement établi vers l'âge de cinq ans. Ce dernier est confirmé par une recherche de mutation(s) au sein du gène de la dystrophine et peut être complété par une biopsie musculaire (Bushby et al. 2010; Birnkrant et al. 2018).

La troisième phase est dite ambulatoire avancée. Elle se traduit cliniquement par la difficulté croissante à marcher et à se relever. La perte de la marche survient vers l'âge de douze ans (Liang et al. 2018).

La perte de la motricité correspond au début de la phase non-ambulatoire précoce, marquée par la nécessité d'utilisation d'un fauteuil roulant. La faiblesse musculaire s'étend, notamment aux membres supérieurs, une insuffisance respiratoire s'installe. Les patients ont alors des difficultés à tousser et expectorer, pouvant poser des soucis de clairance du mucus. Une cardiomyopathie peut potentiellement débiter à ce stade de la maladie. Enfin, le tableau clinique est complété par la présence quasiment systématique d'une scoliose (Desguerre and Laugel 2016).

La dernière phase clinique est qualifiée de non-ambulatoire avancée et se caractérise par un maintien difficile de la posture avec un fonctionnement des membres supérieurs extrêmement limités. Des soucis d'alimentation peuvent-être présents et une cardiomyopathie symptomatique installée. L'insuffisance respiratoire ayant débutée au stade précédent est aggravée.

À la vue de l'histoire naturelle de la DMD, en l'absence de traitements l'espérance de vie des patients est d'environ vingt ans. L'histoire naturelle de la DMB est elle moins sévère, certains patients peuvent d'ailleurs atteindre une espérance de vie normale. La symptomatique sévère de la DMD résulte de phénomènes complexes se jouant en premier lieu à l'échelle cellulaire. Ces derniers tirent leur origine de mutations survenant dans le gène de la dystrophine.

c) Du génotype au phénotype

Différentes mutations peuvent toucher le gène de la dystrophine engendrant un phénotype DMD ou DMB. Celles-ci sont en partie recensées, au niveau mondial, dans la base de données « TREAT NMD DMD Global database » (disponible en tapant le lien suivant : http://umd.be/TREAT_DMD/). Étant donné leurs modes de transmission récessif lié à l'X, les mutations pathologiques DMD et DMB sont héritées de la mère dans les 2/3 des cas. Cependant, chez 1/3 des patients, les événements mutationnels sont apparus *de novo*.

Les mutations pathologiques aboutissant à un phénotype clinique de type DMD peuvent être de différents types (délétions, substitutions, insertions...) (**figure 15**). Leurs fréquences sont relativement homogènes au niveau mondial (Bladen et al. 2015).

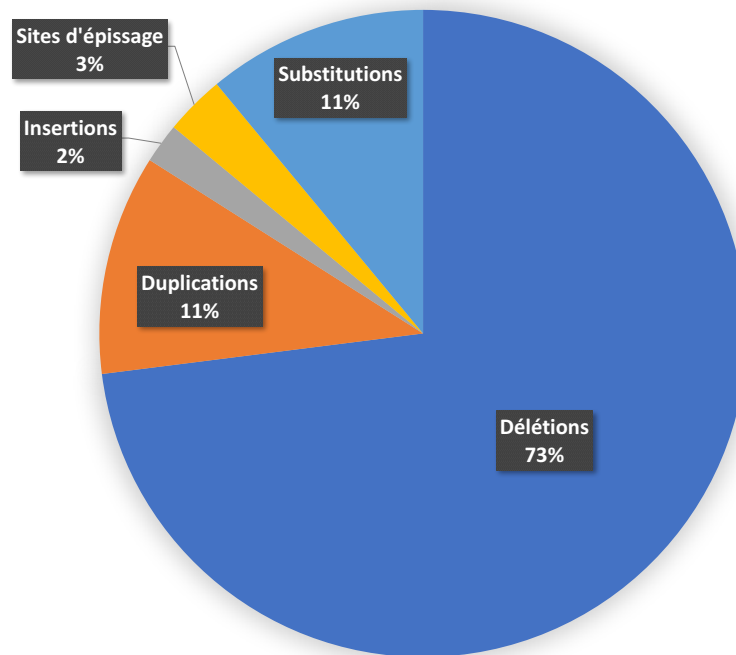


Figure 15 : Fréquences relatives de mutations responsables de DMD (d'après Bladen et al. 2015). Différents types de mutations peuvent mener à un phénotype Duchenne, en revanche leurs fréquences sont très différentes. Ainsi, les mutations intervenant au niveau des sites d'épissage et les petites insertions sont peu fréquentes. Au contraire, les mutations de type délétions sont largement majoritaires, ces dernières concernent en effet près de $\frac{3}{4}$ des patients.

Les mutations les plus répandues sont les délétions d'un ou plusieurs exons du gène (larges délétions) de la dystrophine (**figure 15**). Elles sont détectées chez 73% des patients DMD (contre 85% dans la DMB) et se distribuent au niveau du gène DMD principalement au niveau de deux points chauds. Le premier se situe au niveau des exons 2 à 20, le second au niveau des exons 45 à 55 (Gao and McNally 2015; Muntoni, Torelli, and Ferlini 2003; Flanigan et al. 2009; Bladen et al. 2015). La délétion d'un ou plusieurs exons au niveau de ce second « hotspot » concerne d'ailleurs 45% des patients Duchenne (Bladen et al. 2015; Iyombe-Engembe et al. 2016).

Les secondes mutations les plus retrouvées sont les duplications exoniques et concernent 11% des patients DMD (**figure 15**) (contre 9% dans la DMB). Au contraire des délétions, celles-ci ont une distribution relativement dispersée, même si leur fréquence est plus élevée, à l'extrémité 5' (notamment l'exon 2) que 3' du gène de la dystrophine (Juan-Mateu et al. 2015; White et al. 2006). Les substitutions concernent aussi 11% des patients DMD. Elles

sont la plupart du temps de type non-sens. Enfin, les mutations les moins fréquentes sont celles affectant les sites d'épissage (3% des patients DMD, un exemple étant la mutation c.9164-3_9164-1delCAG) et les petites insertions (2% des patients DMD, un exemple étant la mutation c.2666insA au niveau de l'exon 21) (**figure 15**). Pour ces dernières, la distribution au niveau du gène DMD est aléatoire (Bladen et al. 2015; Juan-Mateu et al. 2015; Wang et al. 2019; Vieitez et al. 2017).

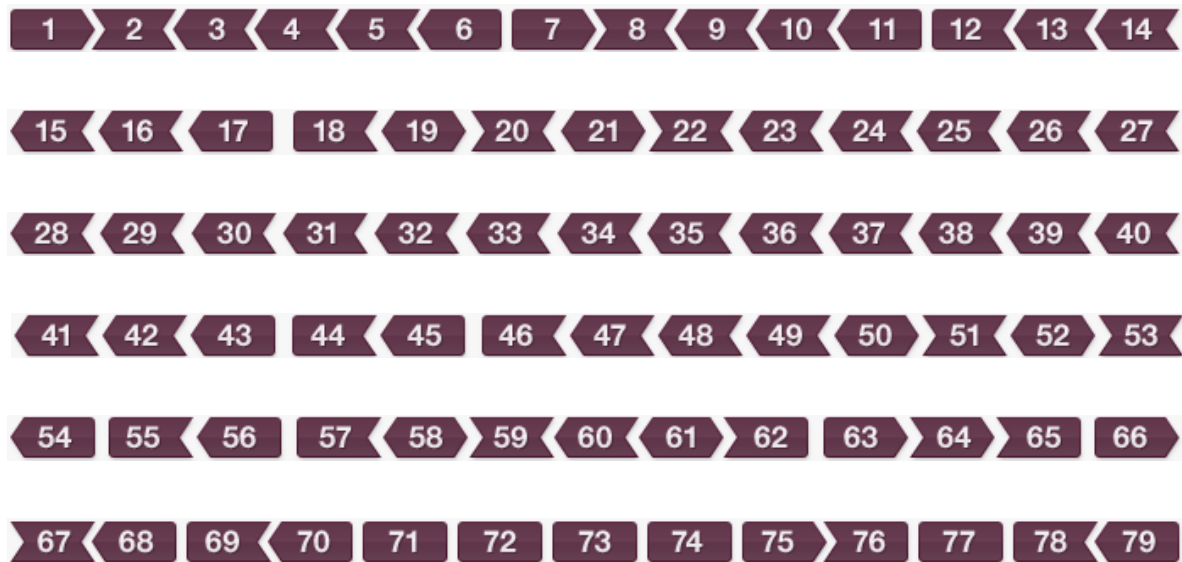


Figure 16 : Structure exonique du gène de la dystrophine (d'après "Exon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy" 2014). Le phasage des exons est représenté par leur « emboîtement ». Lorsqu'une délétion exonique ne permet plus ce dernier, le cadre ouvert de lecture est rompu. D'après la « règle de Monaco », le phénotype du patient atteint d'une telle mutation sera de type Duchenne, c'est par exemple le cas lors de la délétion de l'exon 50. Au contraire, une délétion de l'exon 3 entraînera d'après cette règle un phénotype de type Becker.

Plusieurs types de mutations peuvent donc aboutir à l'expression d'un phénotype DMD ou DMB. Il n'existe aucune corrélation entre leur taille et le phénotype résultant (Muntoni, Torelli, and Ferlini 2003). Ainsi, les conséquences phénotypiques suivent dans 90% des cas la « règle dite de Monaco » (**figure 16**) (Monaco et al. 1988; Juan-Mateu et al. 2015). Selon celle-ci, lorsque la mutation du gène de la dystrophine entraîne un décalage du cadre ouvert de lecture, ayant pour conséquence l'apparition d'un codon stop prématuré, l'ARN résultant de la transcription du gène sera reconnu et dégradé par le « Nonsense Mediated mRNA Decay » (NMD). Par conséquent, il y aura absence totale de production de dystrophine (à l'exception d'au sein de certaines fibres musculaires qualifiées de révertantes, où un « saut d'exon » naturel permet de rétablir le cadre ouvert de lecture ; voir « approches thérapeutiques actuelles et

émergentes »). Le phénotype clinique sera sévère et de type DMD. À l'inverse, si le cadre ouvert de lecture est maintenu, une dystrophine tronquée mais partiellement fonctionnelle sera produite en quantité variable (**figure 17**). Le phénotype associé sera plus léger et de type DMB (Ben Yaou et al. 2016; Monaco et al. 1988).

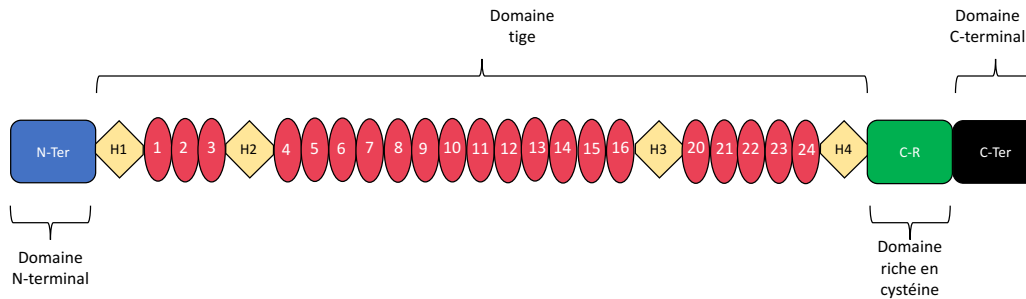


Figure 17 : Dystrophine tronquée de type Becker. La protéine représentée est issue de la délétion des exons 45 à 51, retrouvée chez certains patients Becker.

Quelques exceptions, comme par exemple certaines délétions, résistent cependant à la « règle de Monaco ». Un exemple est celui de la délétion de l'exon 45 du gène de la dystrophine (Dwianingsih et al. 2014). Ce génotype, censé entraîner un décalage du cadre ouvert de lecture peut parfois résulter en un phénotype DMD, parfois DMB. Ce phénomène est principalement expliqué par un phénomène d'épissage alternatif, survenant chez certains patients, et menant à l'exclusion de l'exon 44 adjacent. Le cadre ouvert de lecture est rétabli, un phénotype DMB est alors observé (Dwianingsih et al. 2014). De même, certains cas de délétions exoniques extrêmement distales pourraient passer inaperçus auprès du système NMD et la protéine produite serait relativement fonctionnelle (Ben Yaou et al. 2016). À l'inverse, certaines mutations pour lesquelles le cadre ouvert de lecture est conservé, peuvent conduire à un phénotype sévère de type DMD. Il s'agit majoritairement de délétion affectant des exons codant des domaines fondamentaux de la dystrophine (domaine N-terminal...). Des outils ont été développés et permettent de prédire les conséquences potentielles des mutations sur la structure protéique de la dystrophine et le phénotype résultant. C'est par exemple le cas de eDystrophin (Ben Yaou et al. 2016).

En conclusion, les mutations les plus retrouvées dans la DMD sont de type délétion. Elles concernent un ou plusieurs exons. La « règle de Monaco » permet la plupart du temps de prédire en fonction du génotype, si le phénotype résultant sera de type DMD ou DMB. En plus du critère diagnostique, établir le profil mutationnel des patients est important d'un point de vue

thérapeutique. Différentes approches thérapeutiques (médecine personnalisée), comme celle du saut d'exon en tiennent compte (voir chapitre « approches thérapeutiques actuelles et émergentes »).

d) L'absence de la dystrophine : un défaut aux multiples conséquences

Du fait des nombreux partenaires protéiques et du rôle central que joue la dystrophine au niveau des myocytes et au niveau musculaire, son absence est lourde de conséquences. Le non-assemblage du complexe DGC entraîne ainsi des perturbations mécaniques, ioniques, métaboliques, inflammatoires, immunitaires et histologiques. Ce chapitre organisé en différentes sous-parties, présente de manière succincte et simplifiée chacun des processus pathologiques impliqués.

d.1 Conséquences mécaniques

En l'absence de dystrophine, un découplage entre le sarcolemme et les filaments d'actine a lieu (Ervasti 2003). La transmission des forces, notamment latérales, lors des cycles de contraction, n'est alors plus assurée. Une fragilité membranaire importante, due à l'absence du complexe DGC, provoque par ailleurs des microlésions du sarcolemme (Péréon, Mercier, and Magot 2016). Ceci se traduit par la circulation d'enzymes solubles (CPK...) et par l'entrée de protéines telles que des immunoglobulines et de l'albumine dans les fibres musculaires dystrophiques (Deconinck and Dan 2007).

d.2 Conséquences sur l'homéostasie calcique

Avant même le clonage du gène DMD, il était constaté que l'absence de dystrophine se traduisait par une augmentation du calcium intracellulaire au niveau des fibres musculaires (Bodensteiner and Engel 1978). La dérégulation de l'homéostasie calcique dans la DMD est attribuable à plusieurs phénomènes (**figure 18**) (Shin et al. 2013). Le premier est l'influx calcique résultant de microlésions du sarcolemme comme mentionné dans le chapitre précédent (Péréon, Mercier, and Magot 2016). Ces événements lors de contractions excentriques répétées peuvent entraîner la dégénérescence de la fibre musculaire (Nigro and Piluso 2015). La réparation des micro-ruptures du sarcolemme, par exocytose, augmente aussi l'influx en Ca^{2+} , la portion de membrane plasmique nouvellement introduite (patch membranaire) étant riche en

canaux calciques de fuite (servant normalement à reconstituer le stock de calcium intracellulaire) (**figure 18**) (Ohlendieck 2013). L'augmentation résultante en Ca^{2+} subsarcolemmique active de plus une protéase appelée calpaïne prolongeant l'activation des précédents canaux (Alderton and Steinhardt 2000; Turner et al. 1993).

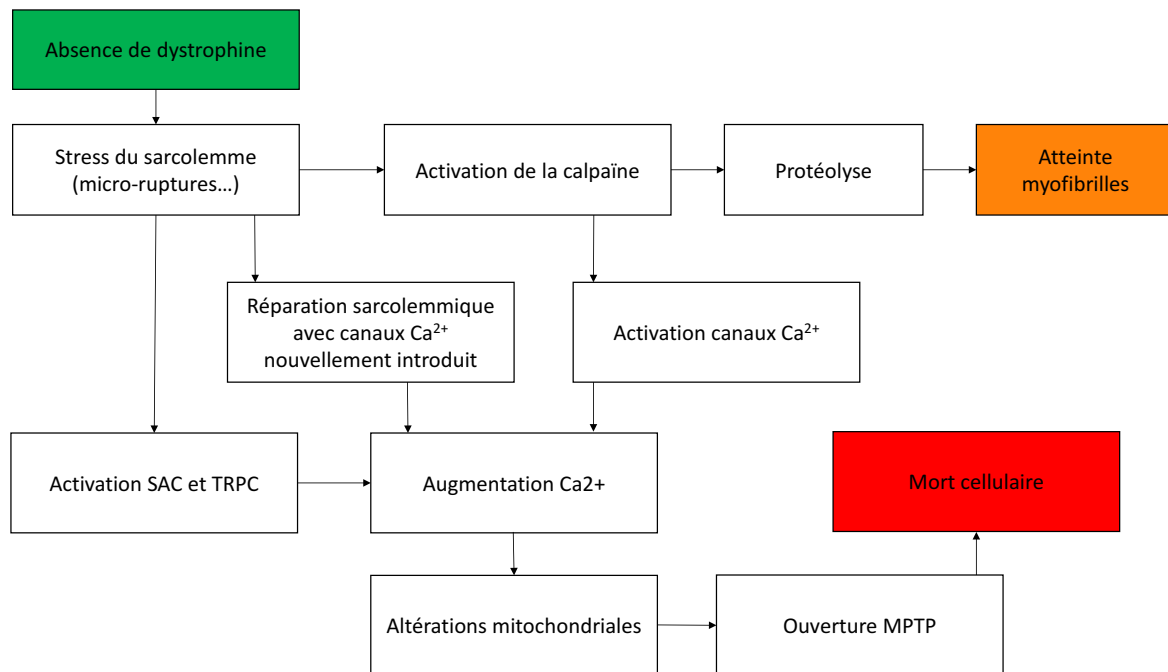


Figure 18 : La perte de dystrophine, voies physiopathologiques et conséquences sur l'homéostasie calcique du myocyte. La perte de l'homéostasie calcique est un processus clé dans la physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. L'absence de dystrophine (en vert) est le point de départ d'une cascade physiopathologique entraînant des influx calciques anormaux au sein de la fibre musculaire. L'activation aberrante de canaux calciques de type « Transient Receptor Potential Canonical » (TRPC) et « Stretch-Activated Channels » (SAC) est un processus clé. Il en résulte une atteinte des myofibrilles (en orange), une ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) avec finalement la mort du myocyte (en rouge).

La calpaïne entraîne aussi une protéolyse de protéines de régulation du myocyte et des myofibrilles (**figure 18**) (Tidball and Spencer 2000; Gokhin et al. 2014).

En plus des canaux de fuite, une dérégulation des canaux de type « Store Operated Calcium Entry » (SOCE), importants acteurs du maintien de l'homéostasie calcique sarcoplasmique, est aussi constatée. La délocalisation et la diminution en expression de la STP liées à l'absence de dystrophine, pourraient être impliquées dans ce phénomène (Harisseh et al. 2013; Sztretye et al. 2017). Des canaux mécano-sensitifs sont aussi sujets à des phénomènes de dérégulations, augmentant de surcroît l'influx en Ca^{2+} . C'est le cas des (i) canaux calciques de

type « Stretch-Activated Channels » (SAC) ayant une probabilité d'ouverture augmentée (**figure 18**) (Vandebrouck et al. 2001) et des (ii) canaux de type « Transient Receptor Potential Canonical » (TRPC) surexprimés. La sous famille dite « Canonical » (TRPC) est particulièrement concernée (**figure 18**). À ce jour, cinq TRPC ont été identifiés au niveau de la fibre musculaire (TRPC 1, 3,4,5 et 6) (Clarisse Vandebrouck et al. 2002; Gailly 2012). Dans le contexte DMD, TRPC 1 et 3 sont fermement impliqués. La sur-expression de ce type de canaux chez la souris serait d'ailleurs suffisante pour l'établissement d'un phénotype de type dystrophique (Millay et al. 2009).

À terme, la surcharge en Ca^{2+} perturbe l'activité des mitochondries, diminuant le métabolisme énergétique et de surcroît la réparation des fibres musculaires dystrophiques. Finalement la dérégulation de l'homéostasie calcique déclenche la mort cellulaire du myocyte (apoptose ou nécrose) *via* l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) (**figure 18**) (Vila et al. 2017).

La dérégulation de l'homéostasie calcique dans la DMD est un phénomène extrêmement complexe. Cependant, malgré un nombre important d'acteurs impliqués, ce désordre ne suffit pas à expliquer la physiopathologie de cette maladie. Un autre phénomène observé, intimement lié à la perturbation des influx de Ca^{2+} , est la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

d.3 Conséquences sur le stress oxydatif

Par son activité contractile et sa consommation en oxygène, le muscle génère des ROS de manière physiologique. Plusieurs systèmes antioxydants assurent le maintien de l'homéostasie cellulaire (Petrillo et al. 2017). Ces mécanismes seraient mis à mal dans le processus physiopathologique de la DMD. Il est ainsi constaté que les fibres musculaires dystrophiques sont plus sensibles au stress oxydatif et possèdent des protéines quantitativement plus oxydées que celles du muscle sain (Rando et al. 1998; Haycock et al. 1996). Une peroxydation lipidique est aussi observée (Hunter and Mohamed 1986). De même, le sarcolemme des myocytes DMD est riche en antioxydants (coenzyme Q et en vitamine E), reflet d'une tentative de lutte cellulaire dirigée contre le stress oxydatif (Tidball and Wehling-Henricks 2007).

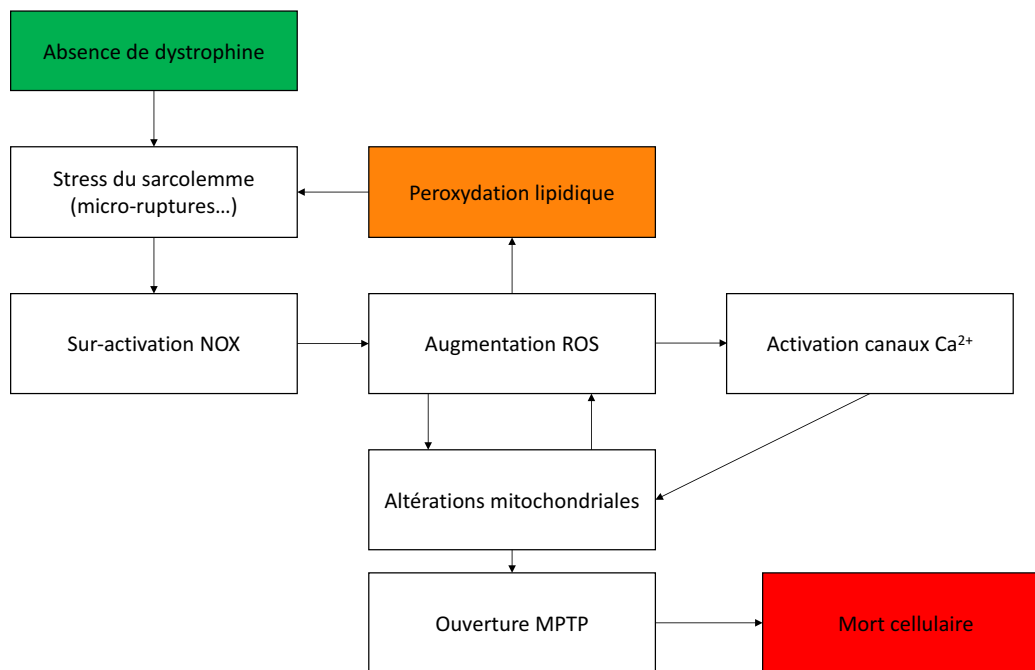


Figure 19 : La perte de dystrophine, conséquences et voies physiopathologiques du stress oxydatif. La surproduction d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) est un processus clé dans la physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ce dernier est en lien avec la dérégulation de l'homéostasie calcique. L'absence de dystrophine (en vert) est le point de départ d'une cascade physiopathologique d'événements faisant appel à différents mécanismes et acteurs protéiques. Ces derniers entraînent la surproduction de ROS au sein de la fibre musculaire, résultant en une peroxydation lipidique, augmentant la fragilité membranaire (en orange). L'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale (MPTP) conduit à la mort cellulaire du myocyte (en rouge).

Plusieurs phénomènes entraîneraient la génération de ROS (**figure 19**) au niveau des fibres musculaires dystrophiques. Parmi-eux, la sur-activation d'une enzyme, appelée NADPH oxydase (NOX), pourrait être directement impliquée (Whitehead et al. 2010). Cette sur-activation serait liée au stress mécanique au niveau du sarcolemme. De manière indirecte, la sur-activation de NOX déclenche l'ouverture de canaux SAC. L'influx calcique généré perturbe alors l'activité métabolique mitochondriale résultant alors en une surproduction de ROS dans les organelles (Shkryl et al. 2009). Ce phénomène pourrait ainsi découler en l'activation des canaux TRPC déjà surexprimés, et mener à l'activation du MPTP (Kelly-Worden and Thomas 2014).

L'absence de dystrophine résulte donc en une surproduction de ROS par le myocyte pathologique. Une interdépendance des phénomènes de dérégulations de l'homéostasie calcique et de la production de ROS est par ailleurs à souligner. À la vue de ces constats, les

antioxydants seraient des thérapeutiques de choix pour traiter la DMD. Cette approche s'est malheureusement révélée infructueuse (Whitehead et al. 2010). En résumé, la surproduction ROS a de nombreuses conséquences au niveau cellulaire. D'ailleurs, l'une d'entre elles, non décrites précédemment, serait le déclenchement de voies pro-inflammatoires *via* l'activation de NFkB (Amma et al. 2005).

d.4 Conséquences inflammatoires et immunitaires

L'absence de dystrophine, en plus des conséquences sur l'homéostasie calcique et sur la production de ROS, a des conséquences d'ordres inflammatoires et immunitaires, responsables de la majorité des dégâts histologiques (**figure 20**) (Villalta et al. 2009). La réponse inflammatoire est médiée par un acteur central, NFkB, qui par son activation entraîne la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (Messina et al. 2011; Monici et al. 2003). Parmi ces dernières, le TNF- α et IFN γ , promeuvent l'activation de macrophages M1 (pro-inflammatoires), cellules participant à la lyse des myocytes dystrophiques (Kastenschmidt, Avetyan, and Villalta 2018; Villalta et al. 2009).

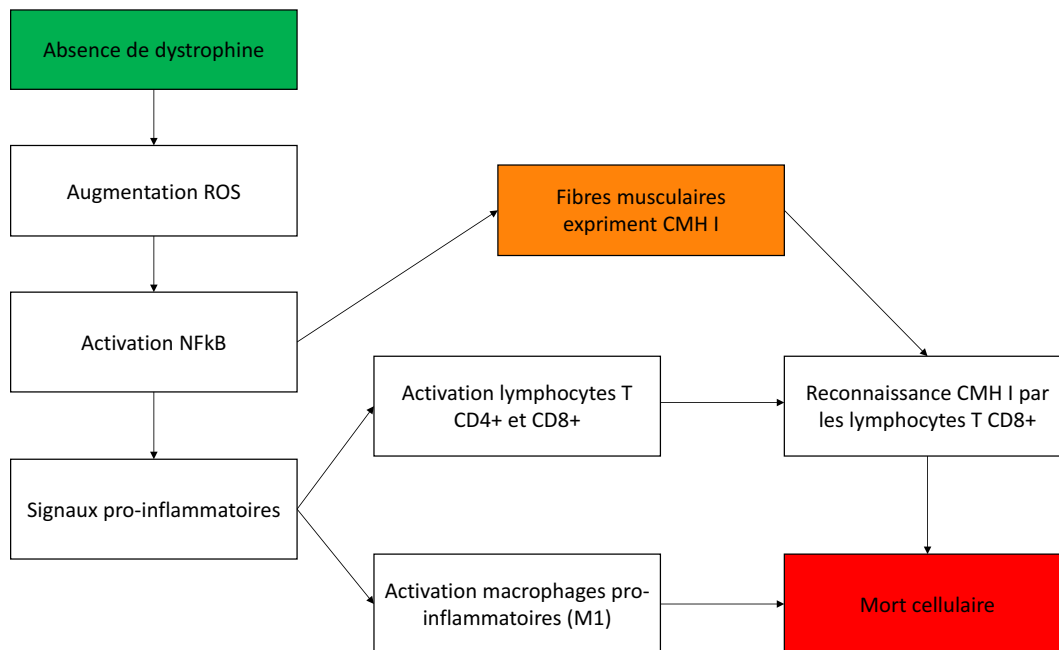


Figure 20 : La perte de dystrophine, conséquences inflammatoires et immunitaires. L'absence de dystrophine au sein de la fibre musculaire engendre plusieurs conséquences d'ordre inflammatoire et immunitaire. Ainsi, en activant le facteur de transcription NFkB, diverses cellules de l'immunité innée ou acquise sont activées. Les fibres musculaires vont de même se mettre à exprimer le CMH I (en orange), entraînant leur reconnaissance par les lymphocytes T CD8+. Ces mécanismes aboutiront à la mort cellulaire des fibres musculaires.

D'autres cellules comme des neutrophiles ou encore des mastocytes sont aussi activées (Tidball, Welc, and Wehling-Henricks 2018).

En dehors d'activer des cellules de l'immunité innée, NFkB par sa transcription et la production de cytokines en découlant, **(i)** déclenche une expression du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I au niveau de certains myocytes et **(ii)** active des lymphocytes T CD4+ et CD8+ infiltrés au niveau du muscle DMD **(figure 20)** (Rosenberg et al. 2015). Les lymphocytes T CD8+ sont systématiquement co-localisés au niveau des fibres musculaires exprimant le CMH et exercent sur elles une action cytolytique (Tidball, Welc, and Wehling-Henricks 2018). Ce phénomène est d'une telle ampleur qu'une étude menée chez la souris *mdx* a déterminé qu'une déplétion de ces cellules immunitaires réduisait de 75% les dommages histologiques dystrophiques (Spencer et al. 2001).

Le contexte inflammatoire et immunitaire résumé dans ce chapitre n'est pas à négliger d'un point de vue thérapeutique. En effet, la thérapie génique pratiquée dans un tel environnement pourrait par apport du transgène, devenir une vaccination ADN (stimulation des lymphocytes T présents) (Villalta, Rosenberg, and Bluestone 2015).

Quoi qu'il en soit, les répercussions des phénomènes inflammatoires et immunitaires sont nombreuses au niveau histologique.

d.5 Conséquences histologiques

Une coupe histologique typique de muscle sain présente des fibres musculaires de taille homogène séparées par peu de tissu connectif (endomysium) (**figure 21A**) (Blake et al. 2002). En cas de DMD, plusieurs anomalies histologiques sont observables (**figure 21B**), et ceci, dès le stade fœtus. Le muscle squelettique pathologique présente des fibres musculaires de taille hétérogène et nécrotique (qui sont phagocytées) (Emery 1977).

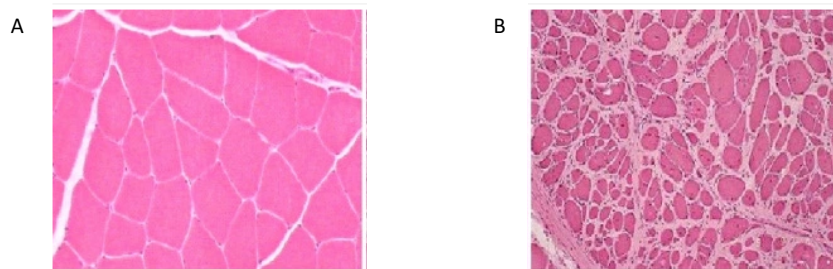


Figure 21 : Coupe transversale de muscle sain et de muscle d'un patient atteint de dystrophie musculaire de Duchenne (d'après Anonyme 2011) (coloration éosine et hématoxyline). Le muscle sain présente des fibres musculaires de taille relativement homogène (100 μm de diamètre) et peu de tissu connectif (A) au contraire du muscle dystrophique (B).

Des fibres atrophiées et hypertrophiées sont aussi retrouvées ainsi que des fibres centronuclées (Bell and Conen 1968). De même, des fibres en dégénérescence sont observées en groupes (Blake et al. 2002; Bell and Conen 1968). Certaines fibres révertantes, contenant de la dystrophine, peuvent aussi être observées (Arechavala-Gomez et al. 2010). En plus d'une atteinte des myocytes, des cellules inflammatoires (lymphocytes et macrophages) sont également retrouvées (Blake et al. 2002). Enfin, au contraire du muscle sain, le muscle squelettique DMD présente un infiltrat graisseux (qui peut être quantifié par IRM) accompagné d'une importante quantité de tissus connectifs (Emery 1977; Burakiewicz et al. 2017).

En conclusion, l'absence de dystrophine entraîne un ensemble de processus pathologiques complexes à l'échelle cellulaire, se traduisant par des lésions histologiques à l'échelle du corps entier. Du stress mécanique à la sur-activation de canaux calciques entraînant une sur-production de ROS, en passant par l'induction de réponses immunitaires, l'élucidation de tous ces mécanismes a été facilitée grâce au développement et l'utilisation de modèles animaux de DMD.

e) Les modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne : avantages et limites

À l'heure actuelle, malgré des modèles cellulaires de plus en plus performants, les modèles animaux sont toujours nécessaires pour l'étude de processus physiopathologiques impliqués dans de nombreuses maladies génétiques. Il en est de même pour le test de diverses approches thérapeutiques. Concernant la DMD, plus de 60 modèles animaux sont recensés à ce jour (Selsby et al. 2015; Widrick et al. 2016). Cette partie a pour but d'en décrire succinctement certains, en se concentrant sur leurs potentiels avantages et inconvénients. Une mention figure lorsque l'application de l'injection HLV y a déjà été rapportée.

e.1 Les nématodes

Le nématode *C. elegans* est un invertébré utilisé comme modèle de la DMD. Ce dernier présente des mutations du gène *dys-1*, analogue du gène de la dystrophine. Ces organismes de taille réduite permettent de réaliser relativement rapidement du criblage haut-débit de molécules potentiellement thérapeutiques. Ces tests peuvent-être réalisés en plaques multi-puits (C. Collins and Morgan 2003). Le coût d'utilisation d'un tel modèle est faible avec un temps de génération court (tous les 3,5 jours environ). L'espérance de vie est d'environ 3 semaines (**figure 22**) (Gaud et al. 2004; Suphamungmee, Jattujan, and Meemon 2017). Au contraire de l'Homme, les mutations dans le gène *dys-1* entraînent un phénotype hyperactif accompagné d'hypercontraction du corps du ver. De plus, d'un point de vue histologique, il n'existe pas de réelles altérations tissulaires (Hewitt et al. 2018). Ces différences entre les conséquences des mutations du gène de la dystrophine chez l'Homme et *C. elegans* constituent une limite majeure de l'utilisation de ce modèle.

e.2 Les poissons zèbre

Les poissons zèbre *sapje* (mutation au niveau de l'exon 4 du gène de la dystrophine) et *sapje like* sont des modèles intéressants de DMD. Leur petite taille permet un criblage de molécules potentiellement thérapeutiques à grande échelle (Kawahara and Kunkel 2013; Bassett et al. 2003). Ils peuvent être utilisés en plaques multi-puits (Kawahara et al. 2011). Le poisson zèbre est ainsi le plus petit vertébré organisme modèle de la DMD. Il permet d'établir le lien entre les modèles invertébrés comme les nématodes et les modèles animaux de DMD plus classiquement utilisés (murins...) (Widrick et al. 2016). L'espérance de vie du poisson zèbre *sapje* est

fortement réduite comparée à son homologue sauvage (12 jours contre 3 ans) (**figure 22**) (Waugh et al. 2014).

e.3 Les modèles murins

Les modèles murins de DMD sont nombreux, et ce paragraphe est loin d'être exhaustif. Le modèle animal le plus répandu de myopathie de Duchenne est la souris *mdx* (Collins and Morgan 2003). Il provient d'un mutant apparu spontanément au sein d'une colonie de souris C57BL/10 et a pour la première fois été décrit en 1984 par Bulfield et al. (Bulfield et al. 1984). Ces souris présentent une mutation non-sens au niveau de l'exon 23 du gène de la dystrophine (Nakamura and Takeda 2011). Le phénotype dystrophique qui en résulte partage plusieurs points communs avec celui des patients DMD et DMB, notamment aux niveaux histologique et biochimique. Ces souris présentent par exemple des fibres nécrotiques. Des cycles de nécrose et régénération musculaire sont aussi observés (surtout de l'âge de 4 à 6 semaines avant de se ralentir vers 12 semaines). Une élévation des CK peut être mesurée. Au niveau cardiaque, une cardiomyopathie hypertrophique peut être retrouvée chez les mâles. Le phénotype pathologique DMD chez ces animaux est en revanche beaucoup plus léger que celui des personnes atteintes par la DMD. La fibrose au niveau des muscles des membres est faible et les signes de dystrophies sont les plus présents entre l'âge de 2 et 8 semaines. Enfin l'espérance de vie des souris *mdx* n'est réduite que de 25% comparée à une souris C57BL/10 (**figure 22**). Par opposition, en l'absence de traitements, les patients atteints de DMD voient leur espérance de vie réduite de 75% par rapport à la population générale (**figure 22**) (McGreevy et al. 2015). En revanche, un avantage majeur de ce modèle murin de DMD est sa petite taille. Quelques expériences présentées dans ce manuscrit utilisent d'ailleurs ce type de souris. D'autres souches de souris *mdx* au phénotype plus sévère ont été générées. C'est par exemple le cas de la *mdx^{5cv}*, créé par mutagenèse chimique à partir d'une souche de souris C57BL/6 (Beastrom et al. 2011; McGreevy et al. 2015). Chez ces animaux, une mutation de type substitution au niveau de l'exon 10 entraîne une rupture du cadre ouvert de lecture résultant en une absence de dystrophine (Duan 2009). Ces souris possèdent moins de fibres révertantes que les *mdx* classiques et permettent une bonne évaluation de l'efficacité du transfert de gènes de constructions d'acides nucléiques (AN) thérapeutiques (Beastrom et al. 2011). À noter que la procédure HLV a été réalisée avec succès chez plusieurs souches de souris dont certaines de type *mdx* (Zhang et al. 2009).

Des modèles rats de DMD ont aussi été développés, comme le myorat (Larcher et al. 2014; Wells 2018). Ce modèle conçu grâce à la technologie TALEN, est un excellent compromis entre les modèles murins classiques et les modèles DMD de plus grandes tailles (canins...). Il présente une histoire de la maladie beaucoup plus sévère et semblable à celle des patients que la souris *mdx* (**figure 22**). Ce modèle présente par exemple une cardiomyopathie développée et accompagnée d'une fibrose musculaire. Un autre modèle de rat myopathe, généré grâce à la technologie Crispr/Cas9 a aussi été décrit par Nakamura et al. (Nakamura et al. 2015; Wells 2018). L'utilisation de l'injection HLV, même si appliquée chez le rat Sprague-Dawley, n'a jamais été rapportée dans la littérature avec ce type de modèle (Wooddell et al. 2011).

e.4 Les modèles félins

Chez les félins la déficience en dystrophine entraîne une maladie nommée Dystrophie Musculaire Féline Hypertrophique. Comme son nom l'indique, cette pathologie se traduit phénotypiquement par une hypertrophie musculaire. Ces modèles félins ne sont que peu utilisés car le développement d'une hypertrophie de la langue les rend très difficiles à nourrir (Wells 2018). Il n'existe pas de fibrose chez ces animaux, en revanche ils présentent une cardiomyopathie dilatée accompagnée d'une insuffisance rénale (Blake et al. 2002; A. Nakamura and Takeda 2011). Dans la littérature, il semble qu'aucune étude ne fasse mention de l'utilisation de modèles félins dans un cadre de recherche préclinique se servant de l'injection HLV.

e.5 Les modèles canins

Un des problèmes majeurs de la recherche préclinique est qu'en plus d'avoir un modèle animal mimant bien la pathologie d'intérêt, ce dernier doit avoir une taille suffisante pour effectuer le changement « d'échelle » entre l'animal et l'humain. Les modèles canins de DMD sont tout à fait pertinents à la vue de ces paramètres et il en existe une vingtaine (McGreevy et al. 2015). La sévérité du phénotype Duchenne chez ces modèles est très proche de celle de patients DMD. Ils permettent donc de tirer des conclusions expérimentales plus prédictives, que celles obtenues avec des modèles murins (Kornegay et al. 2012). Le modèle canin le plus répandu pour l'étude de la myopathie de Duchenne est le chien GRMD : golden retriever atteint de DMD (**figure 22**). Ces chiens myopathes possèdent une mutation au niveau de l'intron 6 du gène de la dystrophine. Il en résulte une exclusion de l'exon 7 entraînant l'apparition d'un codon stop prématuré (Nakamura and Takeda 2011). Le phénotype résultant est relativement similaire à

celui de la DMD chez l'Humain. Ce modèle a de plus une masse corporelle proche de celle de l'Homme. (Barthélémy et al. 2014). Malgré ces avantages, la taille importante de ces animaux les rend difficile d'utilisation d'un point de vue pratique (Les modèles canins ne sont en aucun cas adaptés à du criblage de molécules). Enfin ces derniers ont un coût élevé et il existe une composante émotionnelle importante en particulier pour les expérimentateurs (un autre paramètre important à prendre en compte)

L'injection HLV a été appliquée avec succès chez le chien GRMD, pour la délivrance d'un transgène à visée thérapeutique (Guiner et al. 2017).

e.6 Les modèles porcins

D'une taille supérieure à celle des modèles canins, plusieurs modèles porcins de DMD ont été développés ces dernières années, notamment par utilisation du génie génétique. À noter qu'un modèle issu de mutation spontanée dans le gène de la dystrophine existe aussi.

L'avantage principal des modèles porcins correspond aux nombreuses homologues entre l'Homme le porc. Ceci est vrai tant au niveau génotypique qu'au niveau de la taille, similaire à celle de l'Humain, évitant ainsi les problèmes d'échelle. Les modèles porcins DMD présentent aussi l'avantage de développer des lésions myocardiques ainsi que des lésions nécrotiques diaphragmatiques (Selsby et al. 2015). Ils ont une espérance de vie fortement réduite (**figure 22**). Chez le porc, l'utilisation de l'administration HLV n'est pas répertoriée. Par contre, le transfert de gènes par injection hydrodynamique aux membres *via* la voie artérielle (moins sûre d'un point de vue clinique que l'injection HLV) a été rapportée (Danialou et al. 2005).

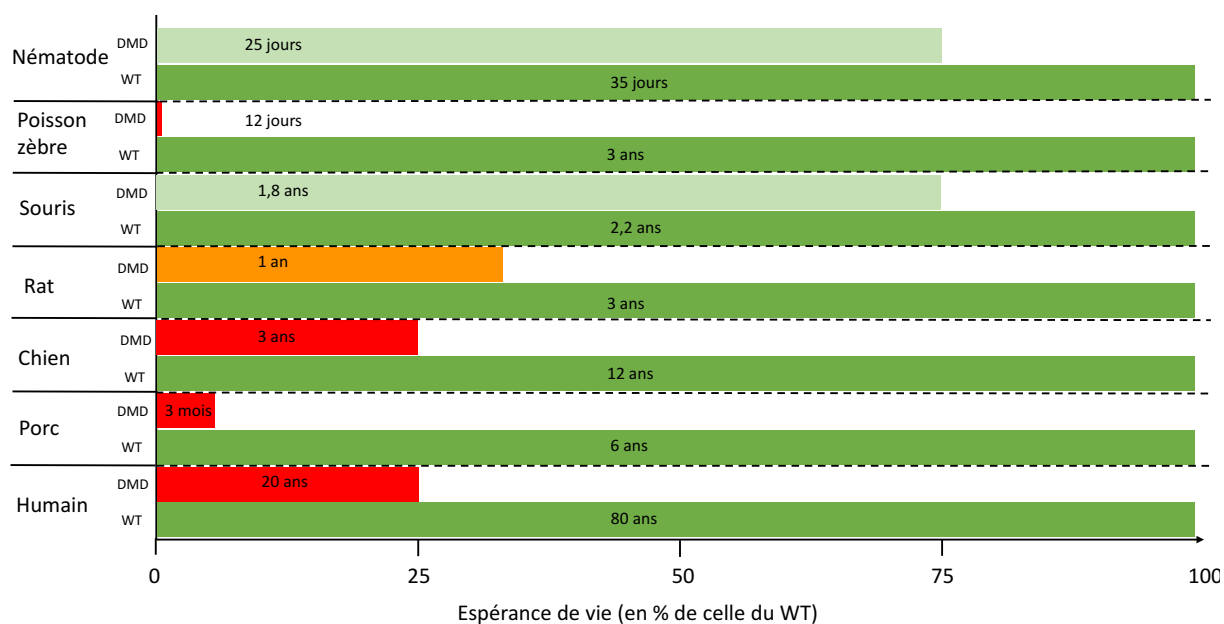


Figure 22 : Espérance de vie relative de différents modèles de Dystrophie Musculaire de Duchenne comparativement à celle chez l’Homme. Différents modèles animaux de la dystrophie musculaire de Duchenne sont utilisés en recherche. Selon les applications certains se révèlent plus pertinents que d’autres. Les conséquences physiopathologiques qui résultent des mutations du gène de la dystrophine peuvent varier d’une espèce à l’autre. La gradation du vert au rouge indique la sévérité de la réduction de l’espérance de vie des animaux modèles comparés aux souches sauvages (WT). Cet indicateur traduit indirectement la gravité du phénotype dystrophique.

En conclusion, les modèles animaux de DMD présentent chacun des avantages et des inconvénients propres. Les plus petits organismes modèles, dérivés du nématode *C. elegans* ou poisson zèbre, sont très utiles pour effectuer du criblage haut-débit de candidats thérapeutiques pour un coût relativement faible. Les modèles murins permettent aussi de réaliser du criblage, à plus petite échelle, tout en reproduisant de manière plus fidèle la DMD humaine que les modèles précédents. Enfin, les gros modèles animaux présentent, généralement, des atteintes phénotypiques relativement similaires à celles retrouvées chez l’Humain. Leurs tailles proches de celle de l’Homme permettent de plus de s’affranchir de problèmes d’échelles. Pour ces raisons, ces modèles sont les plus appropriés pour réaliser une transition de la recherche préclinique vers l’essai clinique.

3) Approches thérapeutiques actuelles et émergentes

De nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des phénomènes physiopathologiques complexes opérant dans la DMD. Il n'existe malheureusement à ce jour aucun traitement curatif pour cette maladie. En revanche, les approches thérapeutiques aujourd'hui employées, sont de plus en plus précisément dirigées contre des acteurs clés des processus pathologiques. Ainsi, en associant ces traitements à une prise en charge précoce, l'espérance de vie des patients a significativement augmentée ces dernières années (Passamano et al. 2012). Alors qu'elle n'était que d'environ 26 ans pour les malades nés avant 1970, elle est aujourd'hui d'environ 40 ans (Kieny et al. 2013).

Une bibliographie succincte de la littérature a permis la rédaction de la mini-revue : « **Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques** ». Cette dernière est écrite dans le format du Bulletin de l'Académie Française de Médecine et résume les thérapeutiques actuelles ainsi que les approches thérapeutiques nouvelles de la DMD. Le saut d'exons ainsi que la thérapie génique au sens strict du terme y sont abordés.

Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques

MOTS-CLES : DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE, THERAPEUTIQUES, THERAPIE GENIQUE.

Duchenne muscular dystrophy: current state and therapeutic perspectives

KEY-WORDS: DUCHENNE MUSCULAR DYSTROPHY, THERAPEUTICS, GENE THERAPY.

Y.T. Le Guen*, T. Le Gall*, V. Laurent*, F. d'Arbonneau*, T. Montier****

Le/les auteur(s) déclare(nt) n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.

RÉSUMÉ

La myopathie de Duchenne est la plus fréquente des dystrophies musculaires, affectant 250 000 personnes à travers le monde. Elle résulte de mutations dans le gène de la dystrophine, le plus grand gène connu du génome humain. Bien que les thérapeutiques actuelles conduisent à une amélioration du pronostic clinique, l'espérance et la qualité de vie des patients demeurent encore nettement inférieures à celles de la population générale. Plusieurs approches thérapeutiques sont actuellement explorées, offrant nouvelles perspectives et espoirs dans la prise en charge de cette grave maladie.

SUMMARY

Duchenne muscular dystrophy is the most frequent muscular dystrophy, with 250,000 affected people worldwide. It results from mutations occurring in the dystrophin gene, the largest known in the human genome. Despite current pharmaceuticals allow for a better clinical prognosis, the life span and the quality of life of patients still remain clearly lower than those in the general population. New therapeutic approaches are currently investigated, giving new perspectives and hopes for the care of this severe disease.

* Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGFB, F-29200 Brest, France

** Service de Génétique Médicale et Biologie de la Reproduction, Centre de référence des maladies rares « Maladies neuromusculaires », CHRU de Brest, F-29200 Brest, France

E-mail : Tristan.Montier@univ-brest.fr

Tirés à part : Professeur Tristan MONTIER, même adresse

Introduction

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique héréditaire ayant un mode de transmission récessif lié au chromosome X. C'est la plus fréquente des dystrophies musculaires chez l'enfant, avec une incidence de 1/3 500 naissances masculines, soit environ 150 nouveaux cas par an en France. Un phénotype moins sévère de cette maladie existe et est dénommé dystrophie musculaire de Becker (DMB), dont l'incidence est de 1/31 000 naissances masculines. La DMD s'appréhende sous différents aspects notamment génétiques, physiologiques et cliniques.

D'un point de vue génétique, la DMD (et DMB) résulte de mutation(s), le plus souvent de larges délétions (70% des cas) survenant en majorité dans les exons 45 à 55 du gène codant la dystrophine localisé sur le chromosome X en position Xp21 (Figure 1) [1]. Avec ses 2,5 millions de paires de bases et ses 79 exons, ce gène est l'un des plus grands connus à ce jour dans le règne animal, et est le plus grand du génome humain (2). Son principal transcrit est un ARN messager (ARNm) de 14 kb essentiellement produit au niveau des fibres musculaires et cardiaques. Sa traduction conduit à la synthèse de la protéine dystrophine. Celle-ci possède un poids moléculaire de 427 kDa et se trouve en position sub-sarcolemmique, constituant le lien entre le (i) complexe actine/myosine *via* l'actine cytoplasmique, (ii) le sarcolemme et (iii) la matrice extracellulaire. Au niveau cellulaire, la dystrophine joue donc un rôle essentiel en assurant la transmission latérale des forces générées par les sarcomères tout en maintenant l'intégrité du sarcolemme *via* l'assemblage d'un complexe multi-protéique appelé complexe dystrophine-glycoprotéines (DGC) (Figure 1). La dystrophine peut être subdivisée en 4 domaines. Le domaine N-terminal interagit avec l'actine cytoplasmique. Un second domaine, appelé tige, consiste en une répétition de 24 unités de spectrine, interagissant avec divers partenaires. Il est suivi d'un domaine riche en cystéine qui interagit avec les dystroglycanes du sarcolemme. Enfin, le domaine C-terminal interagit avec les dystrobrevines et syntrophines [2,3]. Les conséquences mutationnelles du gène de la dystrophine sont les plus lourdes lorsqu'elles entraînent un décalage du cadre de lecture. Elles résultent alors dans 90% des cas en l'absence de la protéine : le phénotype des patients est alors de type Duchenne. À l'inverse, les mutations qui préservent le cadre de lecture résultent en une dystrophine raccourcie (souvent au niveau du domaine tige) mais partiellement fonctionnelle, le phénotype est alors qualifié de type Becker ou intermédiaire.

D'un point de vue physiologique, l'absence de dystrophine aboutit lors de la contraction musculaire à la rupture de la membrane plasmique des fibres musculaires, menant à l'activation aberrante de plusieurs cascades physiologiques, dont l'activation du facteur de transcription NF- κ B. Ce dernier joue un rôle central dans les mécanismes inflammatoires et nécrotiques. Les cellules satellites, cellules souches impliquées dans la régénération des fibres musculaires, rentrent en prolifération. L'absence de dystrophine affecte par ailleurs ce processus en diminuant leurs divisions asymétriques, phénomène pourtant nécessaire à leur auto-renouvellement et à la différenciation en myocyte. Ainsi, le nombre de cellules satellites participant à la régénération musculaire diminue au cours du temps, participant à l'aggravation de la maladie. Le nombre de fibres nécrotiques augmente et la fibrose s'installe graduellement au cours du temps, de manière irréversible [4]. Parallèlement, il existe des fibres révertantes chez 50% des patients. Positives à la dystrophine, elles sont dues à des événements de saut d'exon qui restaure le cadre ouvert de lecture du gène [5].

D'un point de vue clinique, le phénotype des patients atteints de DMD évolue avec l'âge. La pathologie est généralement diagnostiquée entre 2 et 8 ans. Les enfants atteints ont dans un

premier temps des difficultés motrices mineures, une démarche dandinante, et sont positifs à la manœuvre de Gowers. Avec l'avancée en âge, la faiblesse musculaire s'étend progressivement aux membres supérieurs. Cette progression peut être estimée par l'utilisation de grilles de score tel que le score manuel de force musculaire ou « MRC scale ». Les patients sont généralement en fauteuil roulant vers l'âge de 12 ans. Une cardiomyopathie dilatée peut être présente ou non à ce stade tandis qu'elle est retrouvée de manière quasi systématique à 18 ans. La faiblesse musculaire généralisée touche aussi les muscles respiratoires. Les principales causes de mortalité des patients Duchenne sont donc l'insuffisance cardiaque et respiratoire. L'espérance de vie des malades DMD est aujourd'hui d'environ 30 ans. Cependant, certaines études font état de patients atteignant la quarantaine [6]. Les thérapeutiques actuelles permettent de sensiblement améliorer le pronostic des patients mais il pourrait être meilleur dans les années à venir, notamment grâce à de nouvelles thérapeutiques davantage curatives c'est-à-dire s'attaquant aux racines génétiques de la maladie.

Thérapeutiques actuelles

Les traitements actuels sont uniquement symptomatiques. Ils visent à ralentir l'évolution de la maladie, en contribuant à une meilleure qualité de vie des patients. Un soutien psychologique est également nécessaire, la maladie générant angoisse, stress et isolement social [7].

L'usage de corticoïdes est reconnu comme ayant une certaine efficacité dans la myopathie de Duchenne (contrairement à la DMB [8]) ; de ce fait, leur utilisation figure parmi les lignes directrices de soins standards pour la DMD. La corticothérapie peut être administrée de manière chronique ou discontinue, selon si celle-ci est bien tolérée ou non. Les molécules les plus prescrites actuellement sont le Déflazacort et la Prednisolone [9,10]. Elles permettent de réduire l'inflammation (via l'inactivation du facteur NF-kB) et la nécrose musculaire ; cela a pour effets d'augmenter la force musculaire, de réduire le développement de scoliose, de retarder l'âge de perte de la marche et la survenue de l'insuffisance respiratoire [11,12]. Une étude rapporte par exemple qu'avec une corticothérapie intermittente, l'âge médian de la perte de l'ambulation est de 12 ans contre 14,5 ans lorsque ce même traitement est continu [12]. Des effets secondaires existent cependant et ils sont plus importants dans le groupe traité quotidiennement (pour une durée moyenne de traitement de 4 ans à 0.75 mg/kg/jour). Plus de la moitié des patients sous corticothérapie quotidienne présente un syndrome de Cushing (contre environ 30% lorsque la corticothérapie est discontinue). Les fractures vertébrales sont également plus fréquentes, un des effets secondaires étant l'ostéoporose [9,12]. La prise de poids est elle aussi courante. Pour toute ces raisons, 42% des patients touchés par la myopathie de Duchenne reçoivent des corticoïdes de manière discontinue et plus rarement n'en prennent pas [13].

Un traitement contre l'insuffisance cardiaque est généralement proposé afin de prendre en charge l'insuffisance cardiaque gauche consécutive à une cardiomyopathie dilatée (aussi retrouvée dans les DMB [8]). Des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (Perindopril, Eplerenone, Lisinopril) peuvent ainsi être utilisés, associés ou non à des bêta-bloquants (Bisoprolol, Carvedilol, Metoprolol). La mise en place d'une telle thérapie s'est révélée particulièrement efficace chez des sujets encore asymptomatiques. Une augmentation significative de la survie à long terme a été obtenue par rapport à un groupe traité en phase symptomatique ou ne recevant pas ce traitement [14]. Des diurétiques peuvent aussi être utilisés lorsque la dysfonction ventriculaire est importante et qu'elle entraîne des œdèmes.

Une ventilation non invasive, de nuit ou généralisée, est généralement nécessaire ; une trachéotomie peut aussi être réalisée lorsque la ventilation n'est pas ou n'est plus efficace [6].

La physiothérapie fait aussi partie intégrante des soins dispensés aux patients. Elle a pour but de diminuer les contractures et de diminuer la survenue de scoliose, en maintenant le plus longtemps possible une activité physique [15,16]. Au niveau des traitements chirurgicaux, la ténotomie de plusieurs muscles peut être pratiquée, afin de réduire les contractures musculotendineuses et corriger les déformations orthopédiques. La chirurgie peut aussi être utilisée pour compenser la scoliose qui s'installe généralement dès lors que les patients sont non ambulants. Cette chirurgie a montré de nets effets bénéfiques sur l'équilibre en position assise, sur le confort en fauteuil roulant et de manière plus générale sur la qualité de vie des patients [17,18]. D'ailleurs, pour cette dernière, la prise en charge de la perte de l'autonomie est essentielle. Celle-ci passe par l'utilisation maintenant fréquente de fauteuils roulants électriques, mais aussi par une adaptation de l'environnement de vie des patients (objets à commandes vocales, monte-escalier, salle de bain adaptée...) [19].

Perspectives thérapeutiques

L'approfondissement des connaissances sur la myopathie de Duchenne et l'avènement de nouvelles technologies ont permis d'offrir de nouveaux horizons thérapeutiques pour la DMD (Tableau I°). Ces différentes stratégies – plus ou moins avancées à ce jour – visent à pallier l'absence de dystrophine ou à cibler les mutations affectant le gène afin de restaurer totalement ou partiellement l'expression de ce dernier.

La thérapie cellulaire est une piste prometteuse pour le traitement de la DMD. Plusieurs approches de ce type existent, dont la transplantation de cellules souches musculaires de manière autologue ou allogénique. Cependant, cette méthode se heurte encore à des difficultés liées à la durée de vie réduite des cellules injectées (mort de la plupart de celles-ci en 3 jours) et à une réponse immunitaire consécutive à cette administration (notamment par immunité à médiation cellulaire) [20]. Une alternative consisterait à utiliser des cellules souches de moelle osseuse, celles-ci étant capables de se différencier en myoblastes et de sécréter des cytokines anti-inflammatoires et anti-apoptotiques. Ceci pourrait aussi avoir un effet sur la régénération tissulaire. Quelques études ont été menées sur un nombre réduit de patients traités par injection intrathécale ou intramusculaire. Une amélioration au niveau fonctionnel et au niveau de la force musculaire a été constatée pour la majorité des patients ainsi traités (près de 90% dans l'étude de Sharma et al. de 2013) [21], sans qu'il soit rapporté d'effets secondaires notables [20].

Une autre approche thérapeutique vise à compenser l'absence de dystrophine en induisant la surexpression d'une protéine homologue appelée utrophine. Cette dernière présente 80% d'homologie avec la séquence de la protéine dystrophine. Des résultats prometteurs ont été obtenus en recherche préclinique sur la souris *mdx* (souris modèle de la maladie de Duchenne). Ayant fait la preuve de son innocuité chez l'humain en phase I, l'Ezutromid (molécule hétérocyclique) est entré en juin 2016 en phase II. Les résultats de cet essai clinique n'ont malheureusement pas permis de mettre en évidence des bénéfices significatifs au test de marche 6 mn (clinicaltrials.gov, numéro NCT02858362) [22,23]. La Metformine, médicament utilisée dans le traitement du diabète de type 2, a lui aussi montré des effets intéressants en modulant l'expression du gène de l'utrophine chez la souris *mdx* [24]. Cette molécule est actuellement en phase I en vue de son utilisation dans le traitement de la DMD.

Parmi les approches ciblant le gène de la dystrophine, la translecture de codon stop pourrait bénéficier à 13% des patients. Cette méthode vise à ignorer une mutation non-sens, produisant un codon stop prématuré entraînant l'absence de protéine DMD au niveau de la membrane des fibres musculaires. La translecture doit ainsi permettre la production de dystrophine de pleine

longueur, identique à celle de personnes saines. Pour le moment, l'Ataluren est le seul médicament doté de ce mode d'action à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) au sein de l'Union Européenne. Administré par voie orale, ses effets bénéfiques restent modestes, montrant une légère amélioration de la fonction motrice au test de marche 6 minutes [25,26]. La Food and Drug Administration (FDA) a, quant à elle, rendu un avis défavorable à sa mise sur le marché aux États-Unis d'Amérique, jugeant que le bénéfice insuffisant comparé au placebo [27]. D'autres molécules de ce type sont actuellement en test préclinique ou en essai clinique (Arbekacine ou NPC-14 par voie intraveineuse, actuellement en phase II au Japon) [28].

Le saut d'exon consiste à exclure, lors de l'épissage de l'ARNm, un ou plusieurs exons mutés afin de rétablir le cadre ouvert de lecture [29]. Pour cela, un ou plusieurs oligonucléotides antisens (OAN) peuvent être administrés. La dystrophine obtenue, dans ce cas, est raccourcie mais fonctionnelle, semblable à celle trouvée chez les patients DMB. Le saut d'exons multiples pourrait bénéficier à plus de 80% des patients [30]. Pour le moment, les essais cliniques impliquant des OAN administrés par voie intraveineuse ont rapporté une augmentation significative du taux de dystrophine chez les patients résultant en un bénéfice clinique modéré. Un essai clinique du Golodirsén (débuté en 2014), OAN permettant le saut de l'exon 53, a mis en évidence une augmentation d'un facteur 10 de dystrophine à la membrane, équivalent à 1% de la normale [31]. L'Eteplirsén, un OAN permettant le saut de l'exon 51, a donné des résultats similaires [32]. Même si l'évaluation des patients traités révèle une augmentation modeste des performances au test de marche 6 minutes, ces études constituent une preuve de concept et l'optimisation de cette approche pourrait permettre une amélioration plus importante de l'état clinique des patients.

Enfin la thérapie génique pourrait bénéficier à tous les patients DMD, quel que soit leur génotype. Cette stratégie consiste en l'introduction d'un transgène dans une cellule cible (ici le myocyte) afin de corriger ou pallier une anomalie génétique à l'origine d'un dysfonctionnement cellulaire [33]. Deux catégories de vecteurs seraient utilisables pour transporter le « transgène thérapeutique » au sein des fibres musculaires. Les vecteurs synthétiques ont l'avantage d'avoir une capacité d'encapsulation élevée, ce qui apparaît particulièrement utile pour véhiculer un transgène dystrophine thérapeutique. Ils ont pour autres avantages leur faible immunogénicité et leur facilité de production. Ces vecteurs (notamment des molécules de type copolymères tribloc amphiphiles neutres) sont pour le moment uniquement testés en phase préclinique. Leurs niveaux d'efficacité sont en effet encore insuffisants comparativement aux vecteurs viraux, notamment de type virus adéno-associé (AAV) [34–36]. Ces derniers possèdent une efficacité de transduction élevée mais ont un potentiel immunogène empêchant leur ré-administration. Leur capacité d'encapsulation est de plus limitée. Le gène de la dystrophine étant de trop grande taille, des transgènes de type « mini-dystrophine » (de 6 à 8 kb) et « micro-dystrophine » (inférieure à 4 kb) ont été mis au point [37]. Ces derniers codent une version raccourcie et fonctionnelle de la dystrophine « sauvage ». En test préclinique chez le chien golden retriever modèle de la DMD, des résultats montrant une réduction des symptômes ainsi que des améliorations au niveau histologique ont déjà été obtenus [38]. Des essais cliniques de phase I et II, utilisant ce type de vecteurs injectés par voie systémique (injection unique) sont actuellement en cours [39].

Conclusion

Les thérapeutiques actuelles et une prise en charge de plus en plus précoce ont permis de sensiblement améliorer la qualité de vie et le pronostic des patients atteints par la DMD. Ces traitements sont cependant encore uniquement symptomatiques. Les multiples pistes explorées actuellement visent davantage à s'attaquer aux racines génétiques de la maladie en ciblant le gène de la dystrophine ou en intervenant au niveau des mécanismes de régénérations cellulaires. Des spécialités pharmaceutiques innovantes ont récemment reçu une AMM au niveau Européen ou États-Uniens. Pour le moment, les bénéfices cliniques obtenus sont encore modestes mais ils font la démonstration de la pertinence des différents concepts envisagés qui pourraient, à terme, être optimisés. D'ailleurs pour d'autres maladies neuromusculaires, certaines des approches présentées ont abouti, comme la thérapie génique par vecteurs AAV (Zolgensma©) ou encore l'utilisation d'OAN (Spinraza©) pour le traitement de l'amyotrophie spinale de type 1 [40,41].

Remerciements

Les auteurs remercient l'Association Française contre les Myopathies (AFM, Evry, France), la région Bretagne, l'Agence Nationale de la Recherche (ANR, Paris, France) ainsi que Ministère de la Recherche, de l'Enseignement Supérieur et de l'Innovation (Paris, France).

Références

- [1] Bladen CL, Salgado D, Monges S, Foncuberta ME, Kekou K, Kosma K, et al. The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations. *Hum Mutat.* avr 2015;36(4):395-402.
- [2] Ervasti JM. Structure and Function of the Dystrophin-Glycoprotein Complex [Internet]. *Landes Bioscience*; 2013 [cité 19 oct 2017]. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6193/>
- [3] Blake DJ, Weir A, Newey SE, Davies KE. Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle. *Physiol Rev.* 1 avr 2002;82(2):291-329.
- [4] Keefe AC, Kardon G. A new role for dystrophin in muscle stem cells. *Nat Med.* déc 2015;21(12):1391-3.
- [5] Arechavala-Gomez V, Kinali M, Feng L, Guglieri M, Edge G, Main M, et al. Revertant fibres and dystrophin traces in Duchenne muscular dystrophy: Implication for clinical trials. *Neuromuscul Disord.* 1 mai 2010;20(5):295-301.
- [6] Boussaïd G, Lofaso F, Santos DB, Vaugier I, Pottier S, Prigent H, et al. Impact of invasive ventilation on survival when non-invasive ventilation is ineffective in patients with Duchenne muscular dystrophy: A prospective cohort. *Respir Med.* 1 juin 2016;115(Supplement C):26-32.
- [7] Filippo TD, Parisi L, Roccella M. Psychological Aspects in Children Affected by Duchenne De Boulogne Muscular Dystrophy. *Ment Illn* [Internet]. 19 mars 2014 [cité 21 nov 2017];4(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253365/>
- [8.] Magot A, Mercier S, Péréon Y. Particularités de la dystrophie musculaire de Becker et des femmes conductrices. /data/revues/0929693X/v22i12sS1/S0929693X16300069/ [Internet]. 8 janv 2016 [cité 4 nov 2019]; Disponible sur: <https://www.em-consulte.com/en/article/1026537>
- [9] Matthews E, Brassington R, Kuntzer T, Jichi F, Manzur AY. Corticosteroids for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Cochrane Database Syst Rev.* 5 mai 2016;(5):CD003725.

- [10] Benveniste O. La myosite à inclusions – Académie de Médecine. Bull Académie Natl Médecine [Internet]. janv 2018 [cité 15 mars 2018];2018.1. Disponible sur: <http://www.academie-medecine.fr/la-myosite-a-inclusions/>
- [11] Simon H-U. CRC Desk Reference for Allergy and Asthma. CRC Press; 2000. 404 p.
- [12] Ricotti V, Ridout DA, Scott E, Quinlivan R, Robb SA, Manzur AY, et al. Long-term benefits and adverse effects of intermittent versus daily glucocorticoids in boys with Duchenne muscular dystrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1 juin 2013;84(6):698-705.
- [13] Buyse GM, Voit T, Schara U, Straathof CSM, D'Angelo MG, Bernert G, et al. Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet*. 2 mai 2015;385(9979):1748-57.
- [14] Ogata H, Ishikawa Y, Ishikawa Y, Minami R. Beneficial effects of beta-blockers and angiotensin-converting enzyme inhibitors in Duchenne muscular dystrophy. *J Cardiol*. 1 févr 2009;53(1):72-8.
- [15] Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. *Lancet Neurol*. janv 2010;9(1):77-93.
- [16] Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. *Lancet Neurol*. févr 2010;9(2):177-89.
- [17] Archer JE, Gardner AC, Roper HP, Chikermane AA, Tatman AJ. Duchenne muscular dystrophy: the management of scoliosis. *J Spine Surg*. sept 2016;2(3):185-94.
- [18] Takaso M, Nakazawa T, Imura T, Okada T, Fukushima K, Ueno M, et al. Surgical management of severe scoliosis with high risk pulmonary dysfunction in Duchenne muscular dystrophy: patient function, quality of life and satisfaction. *Int Orthop*. juin 2010;34(5):695-702.
- [19] Birnkrant DJ, Bushby K, Bann CM, Apkon SD, Blackwell A, Brumbaugh D, et al. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and neuromuscular, rehabilitation, endocrine, and gastrointestinal and nutritional management. *Lancet Neurol*. mars 2018;17(3):251-67.
- [20] Sienkiewicz D, Kulak W, Okurowska-Zawada B, Paszko-Patej G, Kawnik K. Duchenne muscular dystrophy: current cell therapies. *Ther Adv Neurol Disord*. juill 2015;8(4):166-77.
- [21] Sharma A, Sane H, Badhe P, Gokulchandran N, Kulkarni P, Lohiya M, et al. A Clinical Study Shows Safety and Efficacy of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Therapy to Improve Quality of Life in Muscular Dystrophy Patients: Cell Transplant [Internet]. 1 janv 2013 [cité 30 mars 2018]; Disponible sur: <http://journals.sagepub.com/gate2.inist.fr/doi/full/10.3727/096368913X672136>
- [22] Staff MDA. Summit Therapeutics Discontinues ezutromid for DMD after Disappointing Phase 2 Trial Results [Internet]. Muscular Dystrophy Association. 2018 [cité 4 nov 2019]. Disponible sur: <https://strongly.mda.org/summit-therapeutics-discontinues-ezutromid-dmd-disappointing-trial-results/>
- [23] Ricotti V, Spinty S, Roper H, Hughes I, Tejura B, Robinson N, et al. Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-Arylbenzoxazole Utrophin Modulator, following Single- and Multiple-Dose Administration to Pediatric Patients with Duchenne Muscular Dystrophy. *PLOS ONE*. 7 avr 2016;11(4):e0152840.
- [24] Ljubicic V, Jasmin BJ. Metformin increases peroxisome proliferator-activated receptor γ Co-activator-1 α and utrophin a expression in dystrophic skeletal muscle. *Muscle Nerve*. juill 2015;52(1):139-42.

- [25] Péréon Y, Chabrol B, Voit T, Girado T, Magot A, Mercier S, et al. Ataluren : vue d'ensemble des résultats d'essai clinique dans la dystrophie musculaire de Duchenne résultant d'une mutation non sens (nmDMD). *Rev Neurol (Paris)*. 1 avr 2016;172(Supplement 1):A159.
- [26] McDonald C, Bushby K, Tulinius M, Finkel R, Topaloglu H, Day J, et al. Ataluren: An Overview of Clinical Trial Results in Nonsense Mutation Duchenne Muscular Dystrophy (P3.162). *Neurology*. 4 mai 2016;86(16 Supplement):P3.162.
- [27] FDA Rejects PTC Therapeutics' Application for Duchenne Drug [Internet]. *Rare Disease Report*. [cité 6 nov 2017]. Disponible sur: <http://www.raredr.com/news/fda-crl-ptc>
- [28] Takeshima Y. [Nonsense readthrough therapy for Duchenne muscular dystrophy]. *Rinsho Shinkeigaku*. 2014;54(12):1074-6.
- [29] Goyenvalle A, Vulin A, Fougousse F, Leturcq F, Kaplan J-C, Garcia L, et al. Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science*. 3 déc 2004;306(5702):1796-9.
- [30] Sarkozy A, Bushby K, Mercuri E. Chapter 125 - Muscular Dystrophies. In: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics (Sixth Edition) [Internet]. Oxford: Academic Press; 2013 [cité 6 nov 2017]. p. 1-58. Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123838346001348>
- [31] Sarepta Therapeutics Announces Positive Results in Its Study Evaluating Gene Expression, Dystrophin Production, and Dystrophin Localization in Patients with Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) Amenable to Skipping Exon 53 Treated with Golodirsén (SRP-4053) [Internet]. Sarepta Therapeutics. [cité 6 nov 2017]. Disponible sur: <http://investorrelations.sarepta.com/news-releases/news-release-details/sarepta-therapeutics-announces-positive-results-its-study>
- [32] Lim KRQ, Maruyama R, Yokota T. Eteplirsén in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Drug Des Devel Ther*. 28 févr 2017;11:533-45.
- [33] Montier T, Delépine P, Pichon C, Férec C, Porteous DJ, Midoux P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol*. nov 2004;22(11):586-92.
- [34] Ramamoorth M, Narvekar A. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J Clin Diagn Res JCDR*. janv 2015;9(1):GE01-6.
- [35] Pomel C, Leborgne C, Cheradame H, Scherman D, Kichler A, Guégan P. Synthesis and evaluation of amphiphilic poly(tetrahydrofuran-b-ethylene oxide) copolymers for DNA delivery into skeletal muscle. *Pharm Res*. déc 2008;25(12):2963-71.
- [36] Bello-Roufaï 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*. févr 2007;35(3):728-39.
- [37] Duan D. Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? *Res Rep Biol*. mars 2011;2011(2):31-42.
- [38] Guiner CL, Servais L, Montus M, Larcher T, Fraysse B, Moullec S, et al. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun*. 25 juill 2017;8:ncomms16105.
- [39] Duan D. Systemic AAV Micro-dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther*. 3 oct 2018;26(10):2337-56.
- [40] Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, et al. Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med*. 2 nov 2017;377(18):1713-22.
- [41] Aartsma-Rus A. FDA Approval of Nusinersen for Spinal Muscular Atrophy Makes 2016 the Year of Splice Modulating Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther*. 2017;27(2):67-9.

Figure 1: La dystrophine, du gène à la protéine, mutations et phénotypes associés

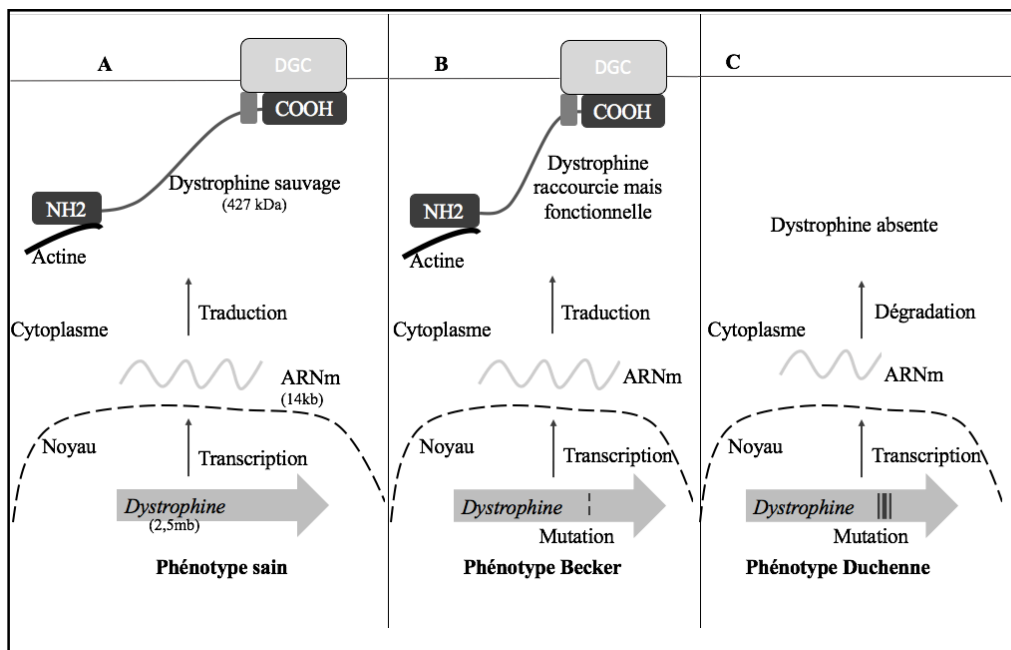


Tableau I° : Principales approches thérapeutiques actuellement en cours d'évaluation pour la myopathie de Duchenne

Approche thérapeutique	Traitement	Mode d'administration	Population DMD éligible	Phases de développement
Régénération tissulaire	Cellules souches	Intramusculaire et intratéchale	100%	Phases I et II
Surexpression d'utrophine	Metformine	Oral	100%	Phase I
Translecture de codon stop	Ataluren	Oral	13%	Phase IV (Europe)
	Arbekacine	Intraveineux	13%	Phase II
Saut d'exon	Golodirsén (exon 53)	Intraveineux	8%	Phase III
	Eteplirsén (exon 51)	Intraveineux	14%	Phase IV
Thérapie génique	Vecteurs synthétiques (Copolymères tribloc amphiphiles neutres)	Intramusculaire et hydrodynamique loco-régionale	100%	Préclinique
	AAVrh74.MHCK7. micro-Dystrophin (AAV)	Intraveineux	100%	Phases I et II
	SGT-001 (AAV)	Intraveineux	100%	Phases I et II
	PF-06939926 (AAV)	Intraveineux	100%	Phases I

Légendes des figures

Figure 1 : A) Le gène de la dystrophine (d'une taille de 2,5 mb) (représenté par une flèche grise au niveau du noyau), plus grand gène du génome humain, est transcrit en un ARNm (d'une taille de 14kb) et code pour la protéine dystrophine (d'un poids moléculaire de 427 kDa) se trouvant en position sub-sarcolemmique. Les domaines N (interragissant avec l'actine cytoplasmique) et C terminaux (interragissant avec le complexe dystrophine-glycoprotéines ou DGC en gris clair) sont indiqués en noir respectivement par NH₂ et COOH, le domaine riche en cystéine est représenté par un rectangle gris foncé. Le domaine tige constitue la partie entre le domaine N et celui riche en cystéine. B) En cas de mutation conservant le cadre ouvert de lecture (schématisée par un trait en tirets), la dystrophine est raccourcie, généralement au niveau de son domaine central « tige ». Celle-ci est néanmoins fonctionnelle ; le phénotype associé est alors dit de Becker. C) Lorsqu'une mutation (schématisée par un triple trait) entraîne une perte de cadre de lecture aboutissant à la formation d'un codon stop prématuré, l'ARN messenger en résultant (ARNm) est dégradé. Il y a absence de dystrophine, le phénotype est alors sévère ; on parle de dystrophie musculaire de Duchenne.

4) La thérapie génique

Pour les maladies génétiques, la pharmacopée actuelle ne permet que, dans la grande majorité des cas, d'assurer un traitement symptomatique. La thérapie génique, au contraire, possède un potentiel curatif en s'attaquant directement aux racines génétiques de la maladie qu'elle est censée traiter. Ce chapitre a pour but de présenter, succinctement, cette approche thérapeutique. Ses différentes composantes et acteurs (liste non-exhaustive), notamment destinés à la DMD, sont abordés considérant qu'ils peuvent être utilisés dans le cadre de l'injection HLV.

a) La thérapie génique, généralités, principe et considérations éthiques

La thérapie génique consiste en l'apport d'un transgène afin de palier et/ou corriger une anomalie génétique (Montier et al. 2004). La très large majorité des essais cliniques utilisant cette technologie sont menés en Amérique du Nord (65%) et en Europe (23,2%). La plupart d'entre eux sont des essais de phase I (56,8%) et de phase I/II (20,9%) (Ginn et al. 2018). Afin de vectoriser le gène médicament (transgène à visée thérapeutique), plusieurs stratégies peuvent être utilisées. Elles sont la dans la très grande majorité divisée en approches **(i)** virales (les plus utilisées dans les essais cliniques) et **(ii)** non-virales (**figure 23**).

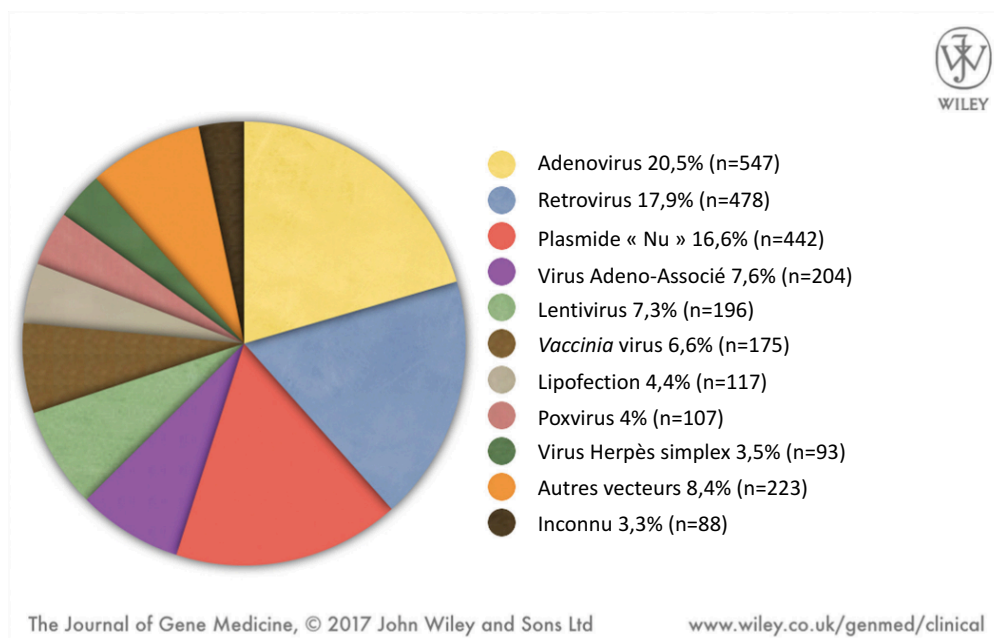


Figure 23 : Les différents types de stratégies de vectorisation utilisées en thérapie génique (d'après Ginn et al. 2018). Les vecteurs viraux sont majoritairement utilisés et représentent 67,4% du total des stratégies de vectorisation utilisés en essai clinique. Les stratégies non virales quant à elles, comptent pour 21% du total des essais cliniques, avec le plasmide « nu » comme sous-groupe le plus représenté.

Le potentiel d'une telle technologie n'échappe pas aux débats éthiques qui peuvent orienter les stratégies de recherche. La thérapie génique est, et devrait rester, destinée à des fins thérapeutiques. Elle ne devrait en aucun cas servir à « augmenter » les performances humaines (dopage génétique). Si ces considérations éthiques sont claires concernant cet aspect, elles le sont moins, au sein du grand public, entre la thérapie génique somatique et germinale. La thérapie génique destinée aux cellules somatiques n'entraîne de modifications génétiques que chez l'individu traité. Au contraire, le traitement de cellules germinales résulte en la transmission de la modification génétique à la descendance. Un récent sondage (s'étalant de décembre 2016 à janvier 2017) interrogeant 1600 citoyens des États-Unis d'Amérique, montre que près de 60% des sondés, considèrent les deux approches comme « acceptables » (Scheufele et al. 2017). En contraste avec ces données, la communauté scientifique mondiale a fermement condamné l'annonce d'une équipe de recherche chinoise concernant la naissance de jumelles issues de cellules embryonnaires humaines génétiquement modifiées (Wolf, Mitalipov, and Mitalipov 2019; Greely 2019). Les conséquences potentielles de telles modifications génétiques, réalisées à des stades de développement précoces, sont difficiles à anticiper (Greely 2019). La thérapie génique à destination des cellules somatiques est la seule qui fait consensus au sein de la communauté scientifique. Les éléments décrits et utilisés à des fins de thérapie génique, dans les parties suivantes de ce manuscrit, ne l'ont été qu'uniquement dans ce contexte.

Une thérapie génique est généralement constituée de 3 composantes, à savoir, **(i)** un vecteur, servant à protéger, transporter et délivrer le transgène au sein de cellules cibles, **(ii)** un transgène thérapeutique, généralement sous forme d'ADN plasmidique (ADNp) et **(iii)** un mode d'administration.

b) Les vecteurs pour le transfert de gènes

b.1 Approche virale par vecteurs viraux recombinants

Au fil de millions d'années d'évolution, les virus sont naturellement capables de transmettre de manière efficace, leur matériel génétique à des cellules eucaryotes afin d'y être répliqués. Leur génome peut se présenter sous forme d'ADN ou d'ARN et peut-être simple ou double brin. Dérivant des virus, les vecteurs viraux recombinants (générés par ingénierie moléculaire et produit de manière biologique) permettent de vectoriser de manière efficiente des AN d'intérêts

en lieu et place des séquences naturelles au potentiel pathogène. Les vecteurs viraux les plus utilisés sont décrits dans les différents paragraphes suivants.

Les rétrovirus recombinants

Les rétrovirus ont une taille d'environ 120 nm et leur génome se présente sous forme d'ARN simple brin qui est rétro-transcrit lors du cycle d'infection. Il en résulte un ADN double brin qui s'intègre dans le génome de l'hôte *via* une enzyme nommée intégrase. Ainsi, les rétrovirus recombinants utilisés à des fins de thérapie génique sont qualifiés de vecteurs intégratifs. Cette propriété permet d'effectuer un transfert de gènes stable et persistant sans effet de « dilution du transgène ». Ces vecteurs viraux sont de plus peu inflammatoires, et ont une capacité d'encapsulation d'environ 8 kb (Lundstrom 2018). En dehors de leurs avantages, les rétrovirus recombinants (autre les lentivirus), ne peuvent transduire efficacement que les cellules en division (Robbins and Ghivizzani 1998). Leur utilisation pour cibler et traiter le tissu musculaire squelettique, dont les principales cellules ne se divisent que peu (voir pas), est donc limitée. Enfin, dans certaines circonstances, l'intégration du transgène peut prendre un caractère oncogène (Lee et al. 2017).

Les adénovirus recombinants

Au contraire des vecteurs rétroviraux, les AV recombinants, dérivés des virus du même nom, sont capables de transduire des cellules en division ou non (Lee et al. 2017). Ils ont une taille d'environ 100 nm et leur génome se présente sous forme d'ADN double brin linéaire (Robbins and Ghivizzani 1998). Ces vecteurs permettent une transduction de l'hôte de sorte que le transgène reste épisomale. La capacité d'encapsulation de tels vecteurs est de 7,5 kb (Lundstrom 2018). Un des désavantages majeurs des AV recombinants est leur potentiel inflammatoire relativement élevé (même si des efforts ont été menés pour le réduire). La réponse cellulaire résultante peut fortement limiter l'expression du transgène. Ces vecteurs ne permettent pas de transduire efficacement le muscle squelettique (Gilchrist et al. 2002; Lundstrom 2018).

Les Adeno-Associated Virus recombinants

Les AAV ne sont pas pathogènes pour l'Homme ce qui rend leur utilisation, sous forme recombinante, attractive en thérapie génique (Hollinger and Chamberlain 2015). Ces vecteurs

viraux ont une taille d'environ 25 nm et présentent un matériel génétique sous d'ADN forme simple brin (même s'il existe des formes dites « self complementary » avec une conception double brin) dont la transduction se fait de manière épisomale (même si statistiquement des insertions se produisent) (**figure 24**) (Blankinship et al. 2004; Wang, Tai, and Gao 2019).

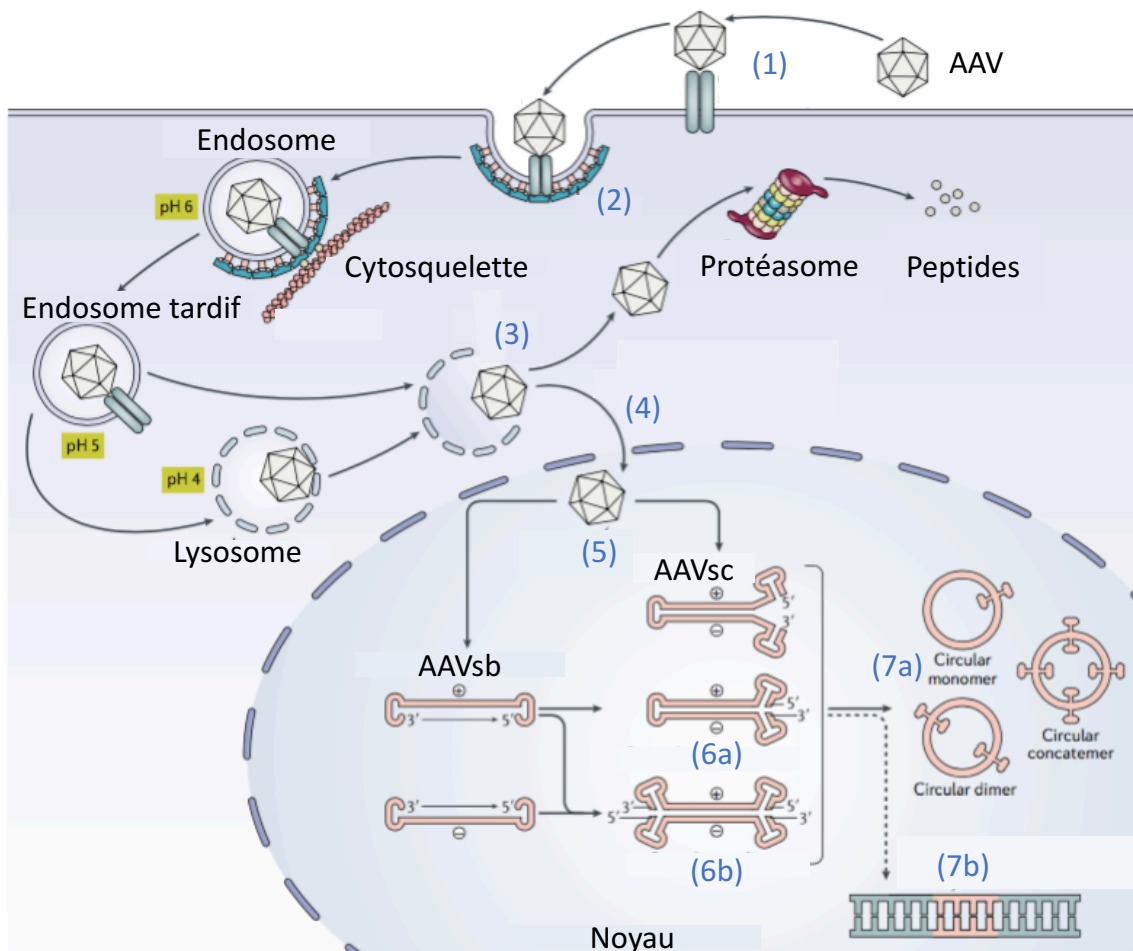


Figure 24 : Les étapes du transfert de gènes par Adeno-Associated Virus (AAV) recombinant (d'après Wang, Tai, and Gao 2019). Le transfert de gènes par AAV recombinant se déroule selon différentes étapes. (1) Dans un premier temps le virus se fixe à un récepteur qui permet (2) l'endocytose par voie clathrine dépendante, entraînant la formation d'un endosome (pouvant évoluer en lysosome). (3) L'AAV recombinant échappe par la suite à l'endosome avant d'être soit dégradé par le protéasome soit, (4) de franchir l'enveloppe nucléaire par les pores pour finalement (5) libérer le génome de sa capsid. Ce dernier peut se trouver sous forme dite « self complementary » (AAVsc) qui peut immédiatement être transcrit, ou sous forme simple brin (AAVsb). Cette forme sb, nécessite une étape de conversion sous forme double brin pour être transcriptionnellement active. Ce phénomène se fait soit (6a) par synthèse d'un brin complémentaire soit (6b) par assemblage de deux génomes simple brin existant. Il en résulte (7a) des ADN circulaires double brin, à l'état de monomères voir même de concatémères. Dans de rares cas, le génome viral peut (7b) s'insérer au niveau du génome de l'hôte.

Leur capacité d'encapsidation est d'environ 5 kb et peut constituer une des limites de leur utilisation à des fins de transfert de gènes. Cela est notamment le cas dans un cadre de thérapie génique appliquée à la DMD où le transgène à vectoriser peut être d'une taille importante (Hollinger and Chamberlain 2015). Malgré cela, les AAV recombinants, par leur capacité à transduire les cellules post-mitotiques comme les myocytes, sont les vecteurs viraux fournissant actuellement les meilleurs résultats pour la transduction du muscle squelettique dans un contexte de thérapie génique pour la DMD. En outre, les sérotypes 6, 8 et 9 se sont révélés efficaces pour cibler l'ensemble de la musculature des grands mammifères (Duan 2018). Trois essais cliniques, de phases I et II, utilisant des AAV recombinants pour une thérapie génique de la DMD ont d'ailleurs lieu au moment de la rédaction de ce manuscrit (disponibles sur clinicaltrials.gov aux références : NCT03368742, NCT03375164 et NCT03362502).

En conclusion, les vecteurs viraux présentent un potentiel de transduction élevé. Pour le transfert de gènes thérapeutiques des muscles squelettiques, les AAV se sont révélés particulièrement efficaces et prometteurs. Cependant, le désavantage majeur de l'utilisation des approches virales demeure l'induction d'une réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur. Ce phénomène peut être rédhibitoire pour la pratique de ré-administrations (voir même d'une simple administration, si le patient est positif au sérotype injecté), qui seront probablement nécessaires pour le traitement à long terme de la DMD par AAV recombinants. Dans ce contexte, il est estimé que pour maintenir un niveau thérapeutique d'expression du transgène sur de très longues durées, des ré-administrations devraient être pratiquées tous les 5 à 10 ans (ces chiffres sont basés sur le renouvellement des fibres musculaires) (Hollinger and Chamberlain 2015). En parallèle de l'approche virale, ont été développés des vecteurs synthétiques. Ces derniers, comportent des propriétés différentes des vecteurs viraux recombinants et ne sont en aucun cas à opposer à ces derniers. C'est cette partie qui constitue le sujet de ma thèse au sein de mon équipe de recherche.

b.2 Approche non-virale par vecteurs synthétiques

De manière générale, les vecteurs synthétiques sont des molécules dont l'efficacité de transfert de gènes est moins importante que celle des vecteurs viraux. Ces systèmes synthétiques présentent en revanche plusieurs propriétés avantageuses. Parmi-elles, leur processus de fabrication et de contrôle qualité sont relativement maîtrisés. Autres avantages, les vecteurs synthétiques ne comportent pas de limite théorique en termes de taille du transgène et ont un

potentiel immunogène très faible voire inexistant. Ce dernier permet de réaliser des ré-administrations si nécessaire, qui pourraient s'avérer utiles pour le traitement de maladies génétiques. Enfin, le risque de mutagenèse insertionnelle est très faible comparé aux vecteurs viraux (Ramamoorth and Narvekar 2015). Par ce fait, l'expression du transgène est transitoire (ce qui peut constituer un avantage dans des approches de type gène suicide). Il existe différentes familles de vecteurs synthétiques qui se classent selon leur nature chimique et leurs propriétés physico-chimiques, dont **(i)** les vecteurs cationiques et **(ii)** les copolymères amphiphiles neutres.

Les composés cationiques sont les vecteurs de synthèse les plus utilisés pour la transfection. Ces molécules chimiques interagissent avec les phosphates anioniques de l'ADN pour former différents types de nanoparticules. Les lipides et les polymères cationiques sont les deux principaux groupes de ce type de vecteurs.

Les lipides cationiques

Historiquement, l'utilisation de liposomes fût la première approche utilisée pour tenter d'apporter du matériel exogène au sein des cellules. Le premier lipide cationique synthétique a été synthétisé par l'équipe du Pr Felgner en 1987. Il s'agit du N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium chloride (DOTMA) (Felgner et al. 1987). Associés à des AN, les lipides cationiques, par auto-assemblage, forment des lipoplexes. Ces édifices nanométriques mesurent généralement de 100 à 500 nm et permettent notamment de condenser et protéger l'AN qu'ils vectorisent (Rai, Alwani, and Badea 2019).

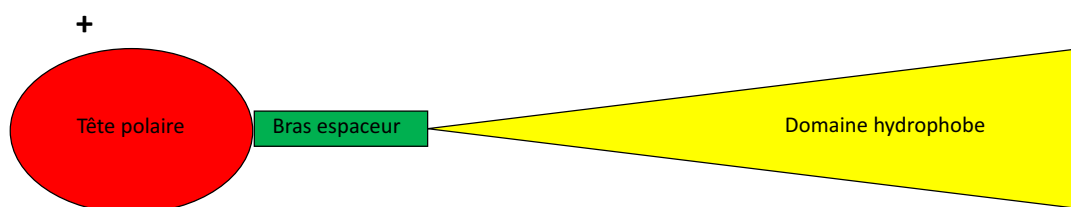


Figure 25 : Structure générale typique d'un lipide cationique. Les lipides cationiques comprennent typiquement 3 domaines : **(i)** un domaine hydrophile, constitué d'une tête chargée positivement (en rouge), **(ii)** un bras espaceur (en vert) ainsi **(iii)** qu'un domaine hydrophobe (en jaune).

De manière générale, les lipides cationiques sont composés de 3 domaines (**figure 25**) :

- Une tête polaire chargée hydrophile : cette tête polaire chargée positivement permet l'interaction avec les AN chargés négativement en raison de leurs groupements phosphates (Zhi et al. 2013). Le plus souvent, ce domaine du lipide cationique est composé de une ou plusieurs fonctions amines (Martin et al. 2005; Montier et al. 2008).
- Un bras espaceur : ce bras, notamment par sa taille, influence la biodégradabilité et la stabilité du vecteur (Zhi et al. 2018). Sa nature chimique peut varier et il peut être sensible au pH environnant afin de faciliter l'échappement endosomal (Martin et al. 2005).
- Un domaine hydrophobe : ce domaine est généralement composé d'une ou deux chaînes aliphatiques. Celles-ci peuvent être ou non ramifiées, de même elles peuvent comporter ou non des insaturations. Un motif cholestéryl peut également être employé en remplacement de ces chaînes grasses. Le domaine hydrophobe, selon sa structure/composition, impacte l'efficacité de transfection du vecteur lipidique (Martin et al. 2005).

Par leurs composantes hydrophiles et hydrophobes, les lipides cationiques sont des molécules amphiphiles. Ils peuvent selon la composition de leurs domaines, être classés en quatre catégories, à savoir, les lipides **(i)** mono, **(ii)** poly-cationiques et **(iii)** dérivés du cholestérol mono ou **(iv)** poly-cationiques. Toutes ces molécules peuvent être modifiées, par exemple *via* PEGylation. Cette dernière consiste en l'ajout de polyéthylène glycol (PEG) (dans la formulation ou par liaison covalente avec le composé) et a pour effet de « masquer » les charges positives du lipoplexe (de même pour les polyplexes). Elle a pour effet d'en améliorer la furtivité en réduisant notamment l'opsonisation des nanoparticules *in vivo*. Cependant, cette modification, diminue la capacité d'interaction du vecteur avec les AN à cause de l'encombrement stérique généré et réduit l'endocytose par les cellules cibles (Remant Bahadur and Uludağ 2016). Les lipides cationiques peuvent aussi être utilisés en association avec des co-lipides (ou lipides « helper ») comme le dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) (Farhood, Serbina, and Huang 1995; Berchel et al. 2016). Il possède des propriétés qualifiées

de fusogènes, c'est-à-dire permettant la déstabilisation de bicouche lipidique comme celle de la vésicule endosomale, étape importante et limitante du transfert de gènes non-viral. L'ajout de ce type de lipides peut par ailleurs, comme tout ajout de molécule dans la formulation, modifier la structure des nanoparticules.

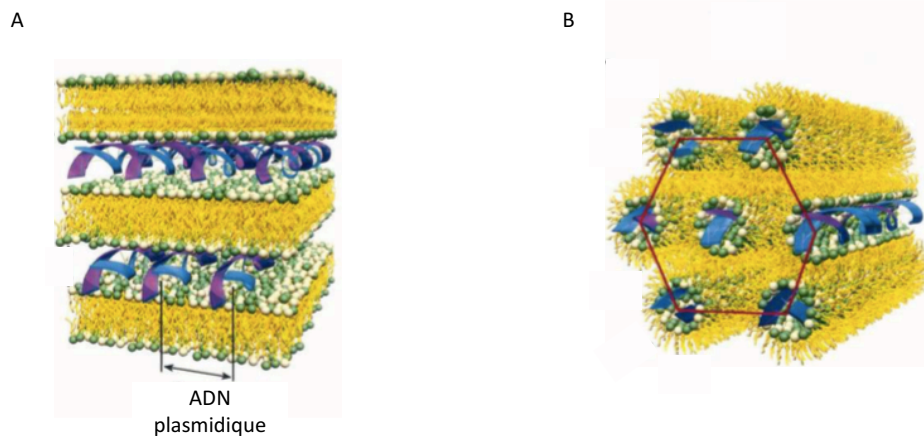


Figure 26 : Représentations schématiques de l'organisation supramoléculaire de lipoplexes (d'après Koltover et al. 1998). Les lipides cationiques peuvent former différents types de structures avec les acides nucléiques (AN) qu'ils complexent. Deux structures répandues sont ici représentées, la première est dite lamellaire, dans ce cas de l'ADN plasmidique (ADNp) (en bleu) est piégé en « sandwich » entre des bicouches de lipides cationiques (en jaune) (A). L'apport de DOPE, ou encore certains lipides cationiques seuls, peuvent permettre la formation d'édifices de conformation hexagonale inverse (repère dessiné en rouge) aux propriétés fusogènes (B).

Ainsi, plusieurs conformations de lipoplexes sont retrouvées et dictent leurs efficacités de transfection (Ma et al. 2007). Les arrangements obtenus les plus courants sont ceux de type « lamellaires ». L'ADNp est dans ce cas piégé entre deux bicouches lipidiques (**figure 26A**). L'ajout de DOPE favorise une autre organisation qualifiée « d'hexagonale inverse ». L'ADNp se trouve alors à l'intérieur d'édifices moléculaires composés d'assemblages de « tubes lipidiques » (**figure 26B**). Certains lipides cationiques s'organisent naturellement de cette manière en présence d'AN (Afonso et al. 2016). Cette propriété est intéressante puisqu'elle est relativement efficace pour la transfection (Zuhorn et al. 2005).

Aujourd'hui, les lipides cationiques représentent 4,5% des vecteurs utilisés dans les essais cliniques (Ginn et al. 2018). Des résultats intéressants ont d'ailleurs été obtenus dans certains contextes *in vivo*, notamment pour le transfert de gènes destinés aux voies pulmonaires (Alton et al. 2015). De façon générale, une bonne innocuité des complexes est constatée.

Les polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des molécules aux structures bien différentes de celles des lipides cationiques. Ces vecteurs sont constitués d'un grand nombre de répétitions d'un ou plusieurs motifs chimiques et condensent fortement les AN (Zhang et al. 2004). Les objets formés sont appelés des polyplexes. Comme les lipoplexes, ils permettent, *in vivo*, de protéger les AN de la dégradation par les nucléases et par d'autres enzymes du sérum (Aied et al. 2013). Certains polymères cationiques ont été et sont couramment utilisés pour le transfert non-viral de gènes. C'est le cas **(i)** des poly-L-lysines (PLL), **(ii)** du chitosan, **(iii)** des dendrimères et **(iv)** des polyéthylènimines (PEI) (Sun and Zhang 2010).

Les PLL sont des homopolymères linéaires (**figure 27**) et sont historiquement les premiers polymères cationiques ayant été utilisés pour le transfert non-viral de gènes. La plus répandue a un poids moléculaire de 25 kDa et les objets formés avec les AN ont des tailles comprises entre 50 et 500 nm (Wong et al. 2017). L'efficacité de transfection obtenue est inférieure à celle des PEI. La principale raison à ce phénomène est l'inefficacité du processus d'échappement endosomal avec ces composés.

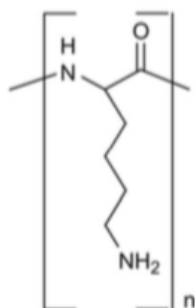


Figure 27 : Structure chimique de la Poly-L-Lysine.

Afin d'améliorer le rendement du transfert de gènes médié par les PLL, des modifications structurales comme l'introduction d'un groupement imidazole ont été réalisées. L'effet escompté est une augmentation du pouvoir tampon de la PLL résultant en un meilleur échappement de l'endosome (Lin and Lou 2012). Tout comme les lipides cationiques, une autre modification possible de ce type de polymère est la PEGylation (Itaka et al. 2010).

Outre des PLL, le chitosan est lui aussi un homopolymère (**figure 28**). Ce composé est d'origine naturelle (généralement produit à partir de coquilles de crustacés) et constitué de polysaccharides cationiques. Il est de plus peu toxique, même utilisé à de fortes concentrations (Ramamoorth and Narvekar 2015; Saranya et al. 2011; Prabu and Ruckmani 2017). Ce polymère cationique a pour la première fois été rapporté comme agent transfectant en 1995 (Mumper 1995).

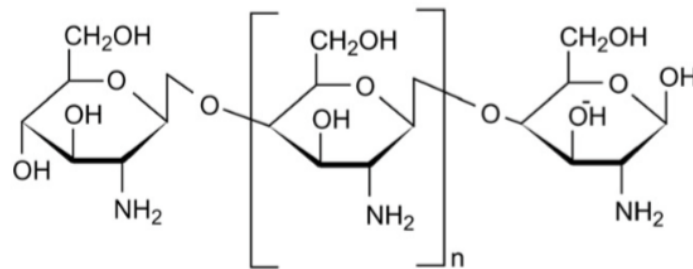


Figure 28 : Structure chimique du chitosan.

Les polyplexes formés ont une taille de 200 à 500 nm et leur pouvoir transfectant dépend du degré d'acétylation, du poids moléculaire du polymère et du pH environnant (Wong et al. 2017; Bozkir and Saka 2004).

Au contraire du chitosan, certains polymères peuvent s'avérer plus toxiques et même avoir des propriétés hémolytiques. C'est le cas de certains dendrimères (**figure 29**) (Palmerston Mendes, Pan, and Torchilin 2017). Ces molécules ont pour la première fois été utilisées comme agents transfectants en 1993 (Haensler and Szoka 1993). Leur nom provient du grec « dendron », ayant pour traduction arbre et de « meros » signifiant partie. Ces molécules ont un noyau central à partir duquel se décline un nombre important de structures en « branches ». Chaque ajout d'une ramification correspond à une génération (Dufès, Uchegbu, and Schätzlein 2005). Les plus courants des dendrimères utilisés en transfert de gènes sont les polyamidoamines (PAMAM).

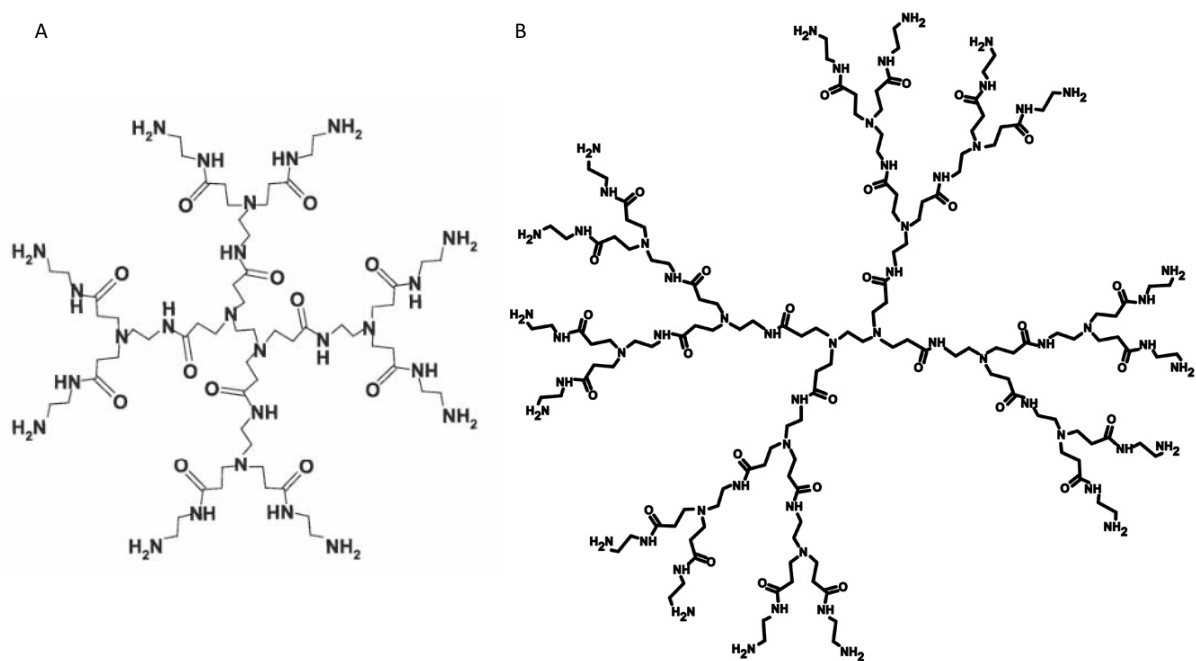


Figure 29 : Structures chimiques de dendrimères PAMAM de (A) 1^{ère} et (B) 2^{ème} génération.

À l’instar des PAMAM, la PEI (**figure 30**) peut aussi se trouver sous forme de dendrimère. Elle est le polymère cationique le plus utilisé et parmi les plus efficaces en transfection *in vitro* (Eliyahu, Barenholz, and Domb 2005; Wong et al. 2017). Initialement conçue par l’équipe du Pr Jean-Paul Behr en 1995, elle est aujourd’hui considérée comme une référence parmi les vecteurs synthétiques (Eliyahu, Barenholz, and Domb 2005; Boussif et al. 1995). La haute densité de groupements amines de ce composé permet une forte compaction de l’AN vectorisé. Les polyplexes formés ont des tailles comprises entre 50 et 500 nm (Wong et al. 2017). La PEI se trouve généralement sous forme linéaire (lPEI) (**figure 30A**) ou branchée (bPEI) (**figure 30B**). La forme linéaire possède une amine secondaire protonée tandis que la forme branchée possède en sus un amine tertiaire (Lin and Lou 2012; Eliyahu, Barenholz, and Domb 2005). Ces différents groupements confèrent une excellente capacité d’échappement endosomal par effet « éponge à protons ». En revanche la bPEI est plus toxique que la version linéaire (Narain 2016; Sun and Zhang 2010; Köping-Höggård et al. 2001). Outre les formes linéaires et branchées, il existe des PEI de différents poids moléculaires. La bPEI 25 kDa, telle que celle utilisée pour la transfection dans notre laboratoire, est une des plus courantes (Rai, Alwani, and Badea 2019). À noter que des composés ayant des poids aussi élevés que 800 kDa ont été employés, démontrant de meilleures efficacités de transfection comparées à des PEI de

plus faibles poids moléculaires. En revanche, leur cytotoxicité est remarquablement augmentée (Lungwitz et al. 2005).

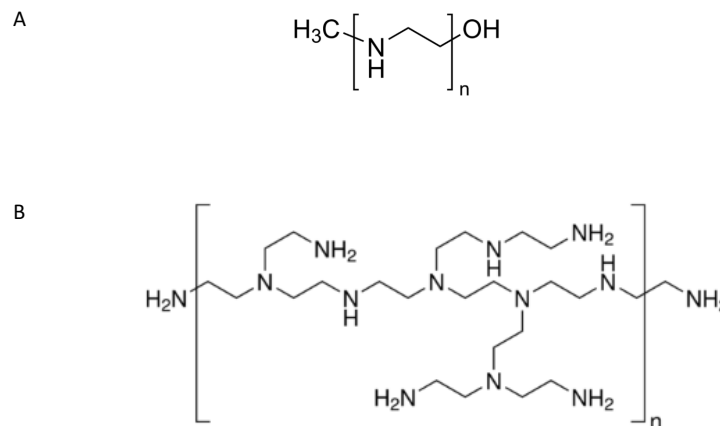


Figure 30 : Structures chimiques des polyéthylènimines linéaire (IPEI, A) et branchée (bPEI, B).

Plusieurs modifications de la PEI peuvent être réalisées et la PEGylation est la modification la plus courante (Remant Bahadur and Uludağ 2016). Elle peut aussi être histidinylée. Il en résulte alors une meilleure capacité d'échappement à l'endosome et une réduction de la cytotoxicité (Bertrand et al. 2011). Au cours de cette thèse, de la bPEI et sa version histidinylée ont été utilisées pour mener à bien différentes expériences.

En conclusion, l'utilisation de vecteurs synthétiques cationiques permet de complexer des AN et de former respectivement soit des lipoplexes soit des polyplexes. La combinaison des deux systèmes peut aussi être employée, et former des lipopolyplexes. Ces nanoparticules permettent de protéger les AN de nucléases et peuvent être internalisées par les cellules (Eliyahu, Barenholz, and Domb 2005). Les lipides et les polymères cationiques peuvent *en sus* être modifiés afin de leur conférer de nouvelles propriétés. Les formulations utilisées ont d'ailleurs tendance à se complexifier afin de permettre de franchir les différentes étapes du processus de transfection cellulaire.

Les étapes de la transfection au moyen de lipoplexes ou polyplexes

Le transfert de gènes se déroule en plusieurs étapes (**figure 31**). De façon générale, l'AN d'intérêt, souvent un plasmide, est condensé à l'aide des vecteurs lipidiques ou polymériques

(figure 31, étape 1). Les nanoparticules formées (dont la taille est cruciale, notamment *in vivo*, un petit diamètre permettant d'échapper à l'opsonisation par les cellules immunitaires), positivement chargées, entrent en contact avec la membrane plasmique et sont alors internalisées. Ce mécanisme peut se faire par différentes voies en fonction du type de nanoparticules. Les polyplexes pénètrent principalement dans les cellules cibles par endocytose selon les voies cavéoline ou clathrine dépendantes, tandis que les lipoplexes entrent eux, majoritairement par la voie clathrine dépendante **(figure 31, étape 2)**. Cependant, le type cellulaire peut influencer sur les voies d'internalisation empruntées pour une formulation donnée (Billiet et al. 2012).

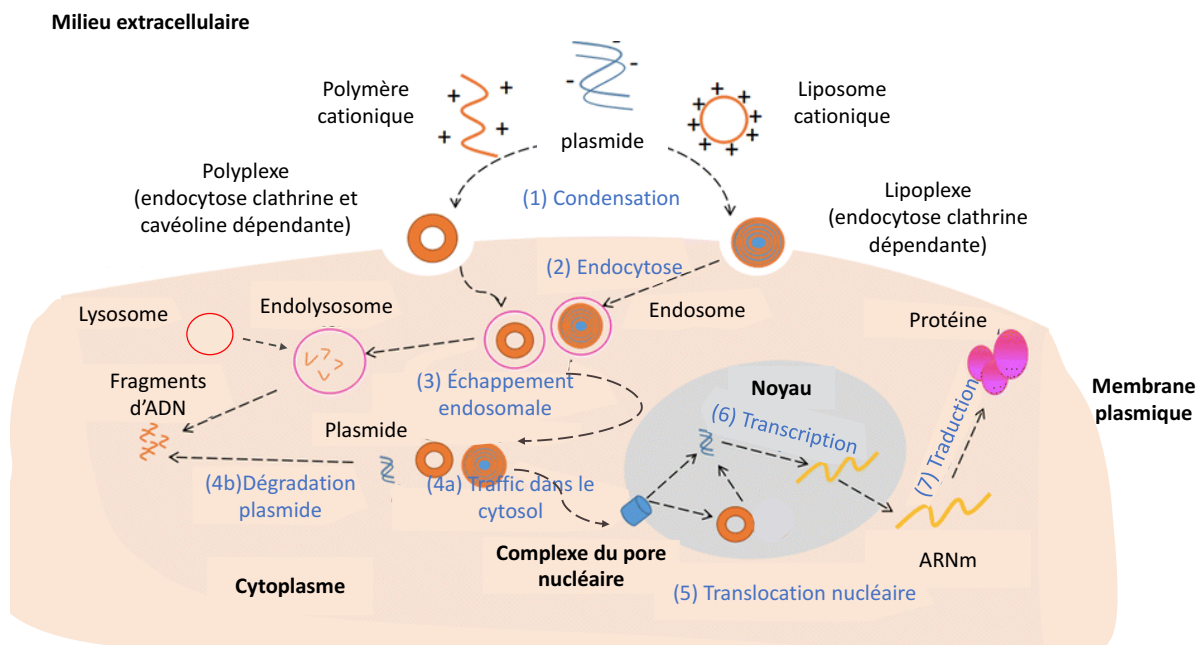


Figure 31 : Les différentes étapes de la transfection d'un plasmide à l'aide de vecteurs cationiques (modifié de Wu et al. 2018). Dans un premier temps, l'ADN plasmidique (ADNp) est condensé à l'aide de vecteurs cationiques. Les objets formés sont de type polyplexes dans le cas de l'utilisation d'un polymère cationique, ou de type lipoplexes lors de l'utilisation d'un lipide cationique. L'ADNp non complexé est dégradé dans le milieu extracellulaire (1). Les complexes atteignant la surface de la cellule sont pour une partie endocytés. Différentes voies sont empruntées selon la nature des nanoparticules. Pour un polyplexe, la voie cavéoline dépendante est privilégiée même si la voie clathrine dépendante pourra aussi être empruntée. Pour un lipoplexe, la voie clathrine dépendante est largement majoritaire (2). Une fois internalisé, l'ADNp contenu dans le complexe peut en partie échapper à l'endosome (3), le plasmide est alors libéré dans le cytoplasme ainsi que certains nano-objets (4a). Le reste est dégradé dans le cytoplasme (4b). Le plasmide est ensuite transloqué dans le noyau, de même que certaines nanoparticules (5). Le plasmide est ensuite transcrit (6) en messager (ARNm) puis traduit dans le cytoplasme pour donner une protéine (rapporteur ou d'intérêt) (7).

Les complexes se trouvent piégés dans la vésicule endosomale (**figure 31, étape 3**). Le pH initialement autour de 7 à l'intérieur de ce dernier s'acidifie progressivement grâce à des pompes à protons. L'endosome fusionne ensuite avec des lysosomes (comportant des hydrolases acides dont des nucléases) formant alors des endolysosomes. L'AN, dans cet exemple sous forme de plasmide, est alors dégradé. L'échappement endosomal constitue donc un point clé du transfert de gènes car il permet au plasmide d'échapper à cette dégradation. Pour les lipoplexes, ce processus se ferait par fusion entre les lipides cationiques composant la nanoparticule et la membrane de la vésicule endosomale (Wasungu and Hoekstra 2006). Les lipides de la membrane endosomale interne, anioniques, interagiraient avec ceux du lipoplexe, formant des paires d'ions, libérant ainsi l'AN du complexe (W. Liang and Lam 2012). Le mécanisme s'apparenterait à celui-dit de « flip-flop » (Xu and Szoka 1996). Pour les polyplexes, l'échappement endosomal a lieu, de manière générale, par le mécanisme qualifié « d'éponge à protons ». L'acidification endosomale entraîne alors une protonation du vecteur utilisé et une entrée massive d'ions chlorure. Le déséquilibre osmotique créé, résulte en une importante entrée d'eau générant un gonflement, et finalement l'éclatement de l'endosome (si ce déséquilibre est trop important, une forte toxicité cellulaire est cependant constatée) (Elouahabi and Ruyschaert 2005).

Le plasmide relâché dans le cytoplasme doit ensuite transiter jusqu'aux environs du noyau (**figure 31, étape 4a**). Le cytoplasme étant un hydrogel, la diffusion au sein de ce dernier peut s'avérer difficile et le plasmide peut y être dégradé par des nucléases (**figure 31, étape 4b**). Si non-dégradé, le plasmide par l'intermédiaire de protéines adaptatrices ainsi que la dynéine emprunte le réseau de microtubules pour se mouvoir jusqu'au noyau (Vaughan and Dean 2006).

L'entrée du plasmide dans le noyau dans des conditions de transfection *in vitro* se fait majoritairement grâce à la disruption de l'enveloppe nucléaire lors des divisions cellulaires. Cependant, *in vivo*, ce phénomène est beaucoup plus rare, et la plupart des cellules sont terminales, donc ne se divisent pas. Le plasmide emprunte alors le complexe du pore nucléaire, une structure dont le diamètre interne mesure 45 nm et est composée d'une centaine de nucléoporines (**figure 31, étape 5**). L'import nucléaire est dépendant de la taille du plasmide et est le plus efficace pour les AN de petites tailles (Bai et al. 2017). Pour aider à cette étape, certains plasmides peuvent être équipés de DNA nuclear Targeting Sequence (DTS). Ces

courtes séquences d'ADN sont capables de fixer une protéine (facteur de transcription) comportant un signal de localisation nucléaire, jouant ainsi un rôle de navette entre le cytoplasme et le noyau (Gonçalves et al. 2009; Breuzard et al. 2008). Cette stratégie d'optimisation de l'étape d'import nucléaire a été explorée dans le cadre de ce travail de thèse.

Après l'étape de translocation dans le noyau, le transgène porté par le plasmide est transcrit en ARNm (**figure 31, étape 6**) qui par la suite est traduit dans le cytoplasme de la cellule pour aboutir à la protéine d'intérêt (**figure 31, étape 7**).

Les copolymères à blocs amphiphiles neutres

Contrairement aux vecteurs synthétiques de type cationiques, dont les mécanismes de transfection sont relativement bien compris, ceux des copolymères amphiphiles neutres le sont beaucoup moins. Pour le transfert de gènes, ce type de composés a d'abord été utilisé en tant qu'adjuvant avec des vecteurs viraux pour augmenter leur efficacité de transduction en les protégeant des barrières physiologiques (Rey-Rico and Cucchiari 2016). Cependant ces molécules, mélangées avec un plasmide, peuvent également servir d'agents transfectants en tant que tels (Kabanov, Zhu, and Alakhov 2005). Elles s'avèrent même particulièrement intéressantes pour le transfert non-viral de gènes *in vivo* (Bello-Roufaï, Lambert, and Pitard 2007; Gaymalov et al. 2009; Lemieux et al. 2000; Alimi-Guez et al. 2009).

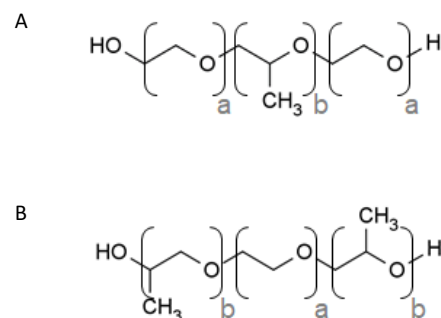


Figure 32 : Structures chimiques générales de Copolymères Tribloc Amphiphiles Neutres (CTAN) de type poloxamères (A-B-A) et « reverse » poloxamères (B-A-B).

D'un point de vue structural, cette classe de vecteurs synthétiques regroupe un grand nombre de composés ayant pour point commun leur organisation modulaire (en blocs). Pour le travail de recherche effectué au cours de cette thèse, des copolymères tribloc amphiphiles

neutres (CTAN) (notamment synthétisés par l'équipe du Professeur Philippe Guégan de l'université Paris Sorbonne (ex-UPMC)) ont été utilisés. Ce chapitre se concentre donc sur ces derniers. Comme leur nom l'indique, les copolymères tribloc sont composés de 3 blocs. Généralement, ces derniers sont organisés selon un enchaînement dit « A-B-A » (**figure 32A**), c'est-à-dire, un bloc hydrophile « A » suivi d'un bloc hydrophobe « B » à nouveau suivi d'un bloc hydrophile « A ». La configuration inverse est aussi possible et est qualifiée dans ce cas de « B-A-B » (**figure 32B**). Les propriétés physico-chimiques des CTAN sont en partie régies par le nombre de répétitions de chacun des blocs qui détermine leur balance hydrophile/hydrophobe (HLB). Plus celle-ci est faible, plus le CTAN est hydrophobe. L'HLB influe aussi sur la Concentration Micellaire Critique (CMC) des composés, définie comme la concentration à partir de laquelle les CTAN s'auto-assemblent en micelles. Généralement, la CMC diminue avec l'HLB et l'augmentation du poids moléculaire du copolymère concerné (Rey-Rico and Cucchiariini 2018).

Les CTAN les plus décrits pour le transfert de gènes des muscles squelettiques dans la littérature sont les poloxamères (aussi appelés pluronics[®]) (**figure 32A**). Un avantage de ces A-B-A copolymères est qu'ils font déjà partie de la pharmacopée (notamment les poloxamères 188 et 407 testés au cours de cette thèse) (Newman, Balusubramanian, and Todd 1998). Un large choix est désormais disponible (différents poids moléculaires et HLB). Enfin, les poloxamères sont généralement peu toxiques pour les cellules (Rey-Rico and Cucchiariini 2018). Leur segment hydrophile, « A », est constitué de poly(éthylène oxide) ou PEO, tandis que le segment hydrophobe est constitué de poly(propylène oxide) ou PPO. Leur arrangement se résume donc en PEO-PPO-PEO. Ces molécules sont capables de former des micelles dont la taille varie entre 10 et 100 nm (Batrakova and Kabanov 2008). Pour le transfert non-viral de gènes des muscles squelettiques, par voie intramusculaire (IM), certains poloxamères se sont avérés particulièrement efficaces. Ils ont, dans ce cas, permis d'augmenter l'efficacité de transfection, du muscle ciblé, d'un logarithme en comparaison à la référence constituée par l'ADNp nu (Pitard et al. 2002; Bello-Roufaï, Lambert, and Pitard 2007; Alimi-Guez et al. 2009; Lemieux et al. 2000).

Une revue de la littérature sur les CTAN, par Knop et al., rapporte cependant de possibles réactions allergiques imputables au bloc PEO des poloxamères (Knop et al. 2010). D'autres composés originaux alternatifs ont donc été développés. Ainsi, les blocs de PEO ont pu être remplacés par des groupements poly(méthylloxazoline) (pMeOxz) (Bauer et al. 2012).

Le CTAN produit a alors une structure pMeOXz–PPO–pMeOXz et comporte une efficacité de transfection alors 20 fois supérieure à celle de l’ADN nu par voie IM (Brissault et al. 2007). À l’inverse, certains CTAN originaux possèdent des groupements hydrophobes alternatifs au PPO. Ainsi, certains composés ont en remplacement des groupements polytétrahydrofuran (pTHF). Ce dernier aurait potentiellement un effet de déstabilisation des bicouches lipidiques relativement important. Le copolymère PEO–pTHF–PEO possède ainsi une efficacité de transfection *in vivo* similaire à celles d’autres poloxamères (Pomel et al. 2008). Dérivant des travaux précédemment décrits, un CTAN de type pMeOXz– pTHF –pMeOXz a pu être testé pour le transfert de gènes des muscles squelettiques au cours de ce travail de thèse.

Les CTAN utilisés pour le transfert de gènes, malgré leur pouvoir transfectant, et au contraire des vecteurs cationiques, ne condensent pas les AN. Les interactions entre les AN et ces molécules sont donc différentes. Ainsi, une publication de Bello-Roufai et al., démontre que sous certaines conditions, les blocs PPO des poloxamères interagissent avec l’ADNp en masquant les charges négatives de ce dernier (Bello-Roufai, Lambert, and Pitard 2007).

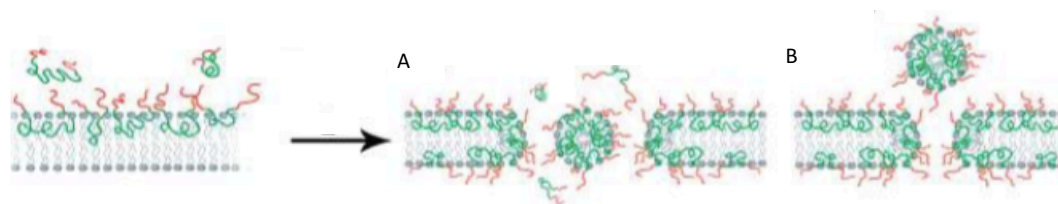


Figure 33 : Mécanisme de la formation de pore transitoire membranaire par un copolymère tribloc amphiphile neutre (d’après Gau-Racine et al. 2007). Lors de l’ajout de bloc copolymères (représenté ici en orange et vert, respectivement pour les blocs hydrophiles et les blocs hydrophobes), une déstabilisation locale de la membrane plasmique par changement de sa courbure peut être induite localement. Ce phénomène se produit lorsqu’une concentration suffisamment importante en composé est présente. Un pore transitoire se forme alors au sein de la bicouche lipidique (A et B).

Plusieurs phénomènes pourraient d’ailleurs expliquer l’efficacité de transfection de certains CTAN. D’une part, ils pourraient permettre une meilleure diffusion des AN au sein des tissus ciblés (Bello-Roufai, Lambert, and Pitard 2007). Ils pourraient en outre aider les AN à traverser la membrane plasmique des cellules, notamment *via* la création de pores transitoires (Eskandani et al. 2018; Huin et al. 2011; Rasolonjatovo et al. 2015). Abondant en ce sens, un phénomène de perméation membranaire par le poloxamère 184 a été démontré (Alimi-Guez et al. 2009). Un modèle de formation de pore a même été proposé (Gau-Racine et al. 2007) (**figure 33**). En plus

de faciliter les premières étapes de la transfection, certains CTAN (par exemple les poloxamères 184 et 235) se sont aussi révélés capables de conférer des bénéfices à des étapes ultérieures du transfert de gènes. Des effets positifs sur l'étape de translocation du plasmide dans le noyau ont ainsi été mis en évidence (Batrakova and Kabanov 2008; Chèvre et al. 2011). De plus, certains composés de ce type se sont aussi révélés capables de moduler l'expression de transgène rapporteur sous contrôle du promoteur CMV (Kabanov, Zhu, and Alakhov 2005). Des augmentations de l'expression de la luciférase de luciole ainsi que de la « Green Fluorescence Protein » (GFP), ont dès lors été observées (Sriadibhatla et al. 2006). Ces derniers effets sur l'import nucléaire et la modulation de l'expression des plasmides ne sont cependant l'apanage que des CTAN relativement hydrophobes (ce qui n'est pas le cas des poloxamères 188 et 407) (Sriadibhatla et al. 2006).

En conclusion, les nombreuses propriétés et effets des CTAN sont très intéressants pour le transfert non-viral de gènes. Ces derniers se sont d'ailleurs révélés particulièrement efficaces pour la transfection des muscles squelettiques par voie IM. Avant ce travail de thèse, cette classe de composés n'avait, à notre connaissance, pas encore été évaluée/rapportée dans le contexte de l'injection HLV.

c) Les constructions d'acides nucléiques thérapeutiques pour la dystrophie musculaire de Duchenne

Les vecteurs utilisés en thérapie génique servent à protéger un AN qui est l'élément thérapeutique dans le cadre du transfert de gènes. L'AN a donc lui aussi une importance critique, sa taille impactera sur celle des nanoparticules et lors de l'utilisation de vecteurs viraux restreindra le choix disponible. De plus, ce paramètre aura aussi un impact sur les étapes de routage intracytoplasmique et de translocation des AN dans le noyau. Dans le contexte de la DMD, ces remarques sont particulièrement vraies considérant la taille potentiellement importante du transgène à vectoriser. Ainsi, de nombreuses constructions plasmidiques incluant des versions pleines longueurs ou réduites du gène de la dystrophine ont été générées. Selon leurs tailles, elles portent le nom de transgènes **(i)** dystrophine pleine longueur, **(ii)** mini-dystrophine et **(iii)** micro-dystrophine.

c.1 Les transgènes dystrophine pleine longueur

L'ADNc de la dystrophine ayant une taille de 14 kb, son utilisation peut être à l'origine de soucis de vectorisation (**figure 34A**). Par exemple, beaucoup de vecteurs viraux ont des capacités d'encapsulation nettement inférieures. De même, l'efficacité de transfection peut aussi être nettement diminuée par la taille importante de l'AN délivré. Cependant, l'avantage majeur de ces transgènes est que la dystrophine en résultant est structurellement semblable à la protéine sauvage. Elle possède donc tous ses domaines d'interactions (domaine N-terminal ; domaine tige ; domaine riche en cystéine et domaine C-terminal). Dans la littérature, il est intéressant de constater que l'administration HLV a été utilisée pour délivrer un plasmide codant une version complète de la dystrophine murine chez des souris *mdx* (Zhang et al. 2009).

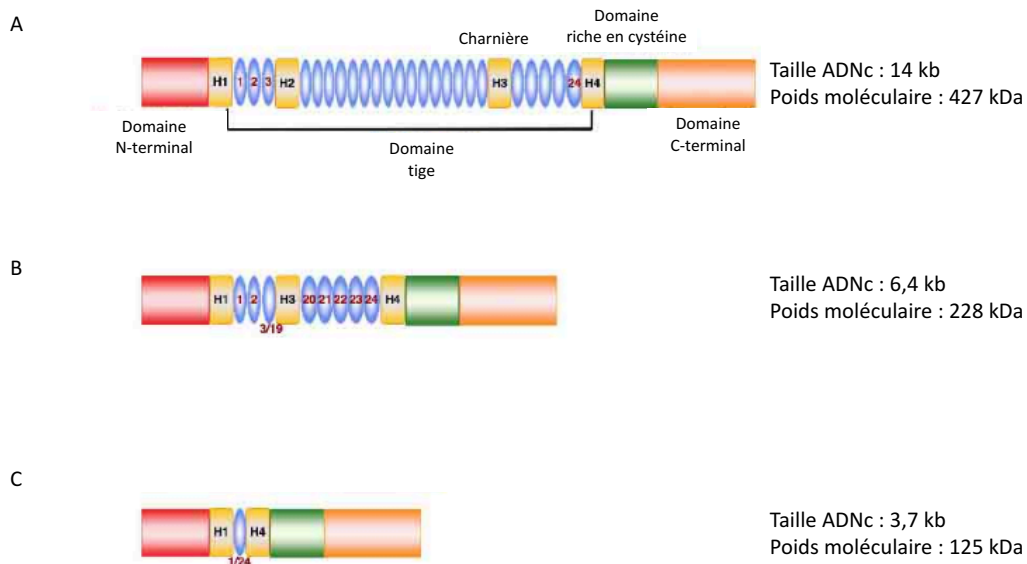


Figure 34 : La dystrophine et ses formes optimisées pour la thérapie génique (modifié de Takeda and Okada 2011). L'ADN codant (ADNc) de la dystrophine pleine longueur a une taille importante de 14 kb (A). Ceci pouvant causer des difficultés de vectorisation, des versions raccourcies du transgène dystrophine ont été mises au point. Les mini-dystrophines sont inspirées de formes de la dystrophine retrouvées dans la DMB, ces transgènes ont une taille comprise entre 6 et 8 kb (B). De taille encore plus réduite, les micro-dystrophines mesurent généralement autour de 4 kb. Ainsi, la $\Delta DysM3$, première micro-dystrophine rapportée, est représentée en (C).

c.2 Les transgènes mini-dystrophine

L'idée des transgènes mini-dystrophine a pour la première fois été proposée par l'équipe de Kay Davies en 1990. Ce concept est né de l'observation d'une famille de patients DMB porteurs d'une délétion des exons 17 à 48 du gène de la dystrophine. Il en résultait une protéine réduite de moitié en comparaison à la dystrophine sauvage. Malgré cela, un des patients alors âgé de 25 ans, était bodybuilder tandis qu'un autre était ambulant à l'âge de 61 ans (England et al. 1990; Duan 2018). Ainsi, les transgènes mini-dystrophine ont des tailles comprises entre 6 et 8 kb et permettent des efficacités de transfection plus élevées qu'avec un transgène pleine longueur. La protéine dystrophine codée par ces mini-gènes, mesure la moitié de celle issue de la version sauvage (**figure 34B**) (McGreevy et al. 2015; Duan 2016). L'approche mini-dystrophine a été testée chez divers modèles animaux et des résultats prometteurs ont été obtenus. Cependant, les vecteurs viraux capables de vectoriser un tel transgène, à savoir les rétrovirus et les AV, étaient difficilement utilisables cliniquement parlant (respectivement par une faible efficacité de transduction *in vivo* pour cibler le muscle et par une forte immunotoxicité) (Duan 2018). La mise au point de transgènes mini-dystrophine (comme micro-dystrophine) nécessite un effort de conception afin de conserver au maximum les sites d'interaction de la dystrophine sauvage. Le but est alors de maintenir le plus grand nombre de partenaires protéiques du complexe DGC. De cette manière, de bons résultats, en termes de bénéfiques fonctionnels et histologiques, peuvent être obtenus. Ainsi, certaines expériences présentées dans ce manuscrit comprennent l'utilisation d'un plasmique mini-dystrophine délivré par injection HLV.

c.3 Les transgènes micro-dystrophine

De tailles encore plus réduites que les transgènes mini-dystrophine, les transgènes micro-dystrophine sont des mini-gènes d'environ 4 kb (**figure 34C**) (McGreevy et al. 2015). Plus de 30 versions différentes de ce type de constructions ont été rapportées dans la littérature (Duan 2018). La protéine qui en découle a une taille équivalente au tiers de celle de la dystrophine sauvage (Duan 2016). Le premier transgène micro-dystrophine a été mis au point par Yuasa et al. en 1997 (Yuasa et al. 1997). La transcription de ce mini-gène résultait en une dystrophine raccourcie dite Δ DysM3. Elle ne comportait que les domaines N et C terminaux, les régions charnières 1, 4 et un domaine spectrine like. Aucune amélioration du phénotype n'a pu être obtenue chez la souris *mdx* avec cette construction (Duan 2018). Ce résultat peut s'expliquer par l'absence de nombreux sites d'interactions localisés normalement au niveau du domaine

tige. Les premières constructions micro-dystrophine fonctionnelles ont été rapportées un peu plus tard dans les années 2000. Le désavantage majeur de ces mini-gènes reste malgré tout la sélection encore plus restreinte des partenaires protéiques comparativement aux transgènes mini-dystrophine. Les transgènes micro-dystrophines présentent en revanche l'avantage par leurs tailles réduites d'être vectorisables par un grand nombre de vecteurs (dont les AAV). De bonnes efficacités en termes de transfert de gènes peuvent-être obtenues avec ce type de construction et de grandes améliorations dans leur conception ont été réalisées. Certains transgènes micro-dystrophine permettent ainsi la restauration d'un phénotype histologique satisfaisant et un recouvrement complet des capacités de contraction musculaire chez des souris *mdx*. La délivrance de telles constructions par injection HLV chez le chien GRMD a aussi été rapportée permettant des bénéfices histologiques et fonctionnels (Guiner et al. 2017).

En conclusion, les AN utilisés pour le transfert de gènes ont une importance cruciale. Ce fait est particulièrement bien illustré par les différents types de transgènes à visée thérapeutique qui ont été mis au point pour la DMD. La taille importante de l'ADNc de la dystrophine posant des soucis de vectorisation, des versions miniaturisées ont été conçues. Ce processus peut alors influencer positivement sur l'efficacité du transfert de gènes et le nombre de vecteurs capables de transporter de tels transgènes. En revanche la miniaturisation peut aussi avoir pour effet de réduire le nombre de partenaires protéiques de la dystrophine. La conception des mini-gènes doit donc être faite de manière rationnelle. À noter qu'en plus d'un transgène dystrophine plus ou moins optimisé, certaines constructions peuvent comporter une seconde cassette d'expression censée augmenter la force et la masse musculaire (Blankinship, Gregorevic, and Chamberlain 2006).

d) Les modes d'administrations et méthodes physiques de transfert de gènes pour cibler le muscle squelettique

En plus de vecteurs et d'AN performants, un mode d'administration pertinent est nécessaire pour un transfert de gènes efficace. Pour cibler le tissu musculaire squelettique, notamment dans le cadre de traitements par thérapie génique de la DMD, plusieurs voies et méthodes peuvent être utilisées.

d.1 L'injection systémique

La voie systémique est particulièrement intéressante pour cibler l'ensemble de la musculature du corps humain. Ce mode d'administration a d'ailleurs été choisi dans plusieurs essais cliniques de thérapie génique concernant la DMD (Disponibles sur clinicaltrials.gov avec les codes d'identification : NCT03368742, NCT03375164 et NCT03362502) (Duan 2018). Il demeure néanmoins que cette voie peut être sujette à certaines limitations. L'activation du système immunitaire en fait partie (Hinderer et al. 2018; Duan 2018). Par injection systémique de vecteurs viraux, pour la transduction d'un transgène micro-dystrophine, des effets secondaires pouvant être liés à une réponse immunitaire innée ont par exemple été observés lors d'un essai clinique (déplétion des plaquettes et des globules rouges) (Duan 2018).

d.2 L'injection intramusculaire et l'électroporation

En raison de sa relative facilité d'exécution, l'injection IM est intéressante pour cibler les muscles squelettiques. Elle permet de plus de transférer de l'ADN nu (ce qui constitue d'ailleurs 17% des essais cliniques (**figure 23**)) (Ginn et al. 2018; Wolff et al. 1990). Plusieurs hypothèses ont été émises concernant le mécanisme d'entrée de ce dernier dans les myocytes. Ainsi, une endocytose médiée par des récepteurs spécifiques est envisagée, de même qu'une perméabilisation directe de la membrane plasmique (Wolff and Budker 2005; André et al. 2006). Un désavantage majeur de l'administration IM, pour son emploi pour les dystrophies comme la DMD, est que l'expression du transgène est uniquement localisée autour du site d'injection. Cette méthode a donc un caractère local et un grand nombre d'administrations serait donc nécessaire pour traiter de manière homogène un muscle ou un groupe de muscles.

Pour augmenter le rendement de la transfection, l'injection IM peut par ailleurs, être couplée avec certaines méthodes physiques de transfert de gènes comme l'électroporation. Celle-ci consiste à appliquer un champ électrique pulsatile, par l'intermédiaire d'électrodes, placées de chaque côté de la région à traiter. Elle permet de multiplier par un facteur 10 à 1000 l'efficacité de transfection en comparaison à une administration IM simple (Mathiesen 1999). Cependant, l'expression du transgène reste une nouvelle fois relativement localisée et des dommages des fibres du muscle traité peuvent être constatés (Roche et al. 2011).

d.3 L'injection hydrodynamique locorégionale par voie veineuse

L'injection HLV est à la fois une méthode locorégionale et physique de transfert de gènes. Tout comme l'injection IM, elle permet de transférer des AN nus (Hagstrom et al. 2004; Wooddell et al. 2011; J.A. Wolff et al. 1990). Cependant, l'injection HLV possède l'avantage majeur de permettre la transfection de l'ensemble de la musculature d'un membre isolé par un garrot. Cette technique a démontré son efficacité de la souris au primate, ainsi que son « applicabilité » en clinique lors d'un essai de transposition chez des patients dystrophiques (disponible sur clinicaltrials.gov avec le code d'identification : NCT00873782) (Hegge et al. 2010; Wooddell et al. 2011; Guiner et al. 2017; Fan et al. 2012; 2015).

La revue bibliographique qui suit est intitulée : « **Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations** », et présente un état de l'art de l'injection HLV. Les différents contextes et applications dans lesquels cette méthode d'administration a été employée sont décrits. Par la suite, cette revue se concentre sur l'injection HLV dans sa configuration originelle, c'est-à-dire, en tant que méthode de transfert de gènes non-virale. C'est d'ailleurs dans cet état d'esprit qu'elle est appliquée dans notre laboratoire. Dans ce contexte, l'efficacité de transfection obtenue avec l'administration d'AN nu demeure la référence. Ainsi, différents facteurs qui pourraient limiter le rendement du transfert de gènes ont été identifiés et différentes pistes d'optimisations proposées.

Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations

Short title: HLV injection, hurdles and optimizations

Yann Thierry Le Guen¹, Tony Le Gall¹, Patrick Midoux², Philippe Guégan³, Serge Braun⁴ and Tristan Montier^{1,5}

¹ Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGFB, F-29200 Brest, France

² Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, Université d'Orléans, France

³ Laboratoire de chimie des polymères, Sorbonne Université, CNRS UMR 8232, UPMC Paris 06, F-75005 Paris, France

⁴ AFM Telethon, 1 rue de l'internationale, BP59, 91002 Evry, France

⁵ Service de Génétique Médicale et Biologie de la Reproduction, Centre de référence des maladies rares « Maladies neuromusculaires », CHRU de Brest, F-29200 Brest, France

Abstract

Aims: This review focuses on gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection, with current applications, hurdles and possible optimizations.

Discussion: Hydrodynamic limb vein injection is an *in vivo* loco-regional gene delivery method. It consists to administrate a large volume of solution containing nucleic acid constructs in a limb with both blood inflow and outflow temporarily blocked using a tourniquet. The fast, high pressure delivery allows to reach the musculature of the whole limb. The skeletal muscle is a tissue of choice for a variety of gene transfer applications including gene therapy, for Duchenne muscular dystrophy or other myopathies, as well as for the production of antibodies or other proteins with broad therapeutic effects. Hydrodynamic limb vein delivery has been evaluated with success in a large range of animal models. It also proved to be safe and well-tolerated in muscular dystrophy patients, thus supporting its translation to the clinic. However, some possible limitations may occur at different steps of the delivery process. This review points out the interests, bottlenecks and potential improvements that could further optimize non-viral gene transfer following hydrodynamic limb vein injection.

Conclusion: This review not only makes a state of the art of hydrodynamic limb vein injection but also proposes avenues for research in the field of gene transfer to skeletal muscles.

Keywords: gene transfer, hydrodynamic delivery, loco-regional, optimizations, skeletal muscle, non-viral gene delivery

Abbreviations: HLV, hydrodynamic limb vein; DTS, DNA nuclear targeting sequence; NA, nucleic acids; AAV, adeno associated virus; DMD, Duchenne muscular dystrophy; LGMD, limb girdle muscular dystrophy; *GRMD*, golden retriever muscular dystrophy; AON, antisens oligonucleotide; pDNA, plasmid DNA; ECM, extracellular matrix; NPs, nanoparticles; TBCP, triblock copolymer; PEG, polyethylene glycol; EP, electroporation; HTV, hydrodynamic tail vein; IV, systemic intravenous; SP, sonoporation; SM, skeletal muscle

Table of content

Abstract	78
Table of content.....	79
I) Introduction	80
II) HLV gene delivery: interests and applications.....	83
a) HLV injection for <i>in situ</i> production of secreted proteins	83
b) HLV injection for DNA vaccination.....	83
c) HLV injection for genetic disorders.....	84
III) Current state of HLV delivery: strengths and weaknesses.....	86
a) Blood components.....	88
b) Blood vasculature.....	89
c) Extracellular matrix	89
d) Plasma membrane.....	90
e) Cytoplasm	91
f) Nuclear membrane.....	92
IV) Potential optimizations: step-by-step improvements	92
a) Extravasation from the vessels	93
b) Passage through the extracellular matrix.....	93
c) Crossing the plasma membrane	94
d) Traffic through the cytoplasm	95
e) Translocation into the nuclei	96
V) Other miscellaneous considerations	97
VI) Conclusion	99
Bibliography.....	120

I) Introduction

The skeletal muscle (SM) is an interesting target for delivering nucleic acids (NA).^{1,2} In humans, the whole body counts as many as 650 muscles, constituting 40% of its total mass, thus making it the most abundant tissue.³ Anatomically, the SM is mainly composed of multinucleated cells, named myocytes or muscle fibers. These form syncytia covered by a layer of connective tissue called the endomysium. Muscle fibers are grouped in bundles, named fasciculi. Each of them is surrounded by another connective structure called the perimysium. Finally, groups of fasciculi wrapped by the epimysium form the muscle.⁴ SM are implicated in many functions such as posture control, locomotion, breathing, cholesterol homeostasis, hormone secretion, or thermoregulation. It can be targeted for various applications like induction of antibody production (antigen-based vaccination) or *in situ* synthesis of other proteins with diverse biomedical interests. Furthermore, SM can be affected by a wide range of diseases including myopathies. Accordingly, SM can be targeted for direct as well as indirect purposes.

In this respect, the administration path is a crucial parameter, especially for the delivery of NA such as plasmid DNA (pDNA) or siRNA.⁵ Irrespective of the delivery approach, it must be at the same time relevant, safe, and efficient. Among the various hydrodynamic delivery methods (extensively reviewed for instances in ⁶⁻⁸), Hydrodynamic Limb Vein (HLV) injection is a particular locoregional administration method specifically dedicated to target SM. Introduced by Wolff and colleagues in the 90', this procedure (also known as high-pressure transvenous limb perfusion or locoregional transvenous perfusion) has the potential to treat at once, i.e. in a single administration, the whole musculature of a given limb.^{9,10} It derives from the Bier block procedure, aimed for locoregional anesthesia in orthopedic surgery or for the delivery of chemotherapies. It relies on a transient isolation of a limb, using tourniquet(s) placed at its proximal part. By analogy, HLV injection consists in transient interruption of the blood flow of a limb followed by the rapid administration – *via* the venous system of that limb – of a large volume of solution containing NA constructs. For instance, HLV

is performed in mice according to the step-by-step procedure described in **Figure 1** for reaching the various muscles of the hind limb (**Figure 2**).

The potential advantages of HLV injection can be highlighted through a comparison with other muscle-gated methods, including systemic intravenous (IV) or intramuscular (IM) injections, electroporation, and sonoporation (**Table 1**).

(i) Systemic injection is meant to transfer genes into muscles throughout the whole body.¹¹ Some successes have been recently obtained using this path, notably in dogs with X linked myotubular myopathy (XLMTM),¹² confirmed by preliminary data in young MTM boys treated with an Adeno Associated Virus (AAV)-2/8 vector. Other, gene therapy clinical trials using AAVs injected *via* IV are currently ongoing^{13,14} or have been successfully completed.¹⁵ Nevertheless, widespread gene delivery remains challenging in terms of vector safety (e.g. liver toxicity of vectors, as well as anti-viral vector immune/inflammatory responses) and should even be avoided, depending on the intended application. Potential toxicity of the transgene product must also be considered. For instance, the normal protein, lacking in some muscular dystrophies, can be toxic when produced in non-relevant part(s) of the body (e.g. calpain 3, re-expressed to treat Limb Girdle Muscular Dystrophy (LGMD) 2A limb muscles, is toxic if expressed in the heart, which could be overcome by a more restricted tissue-specific transgene expression)¹⁶. Locoregional delivery can therefore be suitable.¹⁷ (ii) IM injection consists of a direct administration in a given muscle, *via* a syringe and needle.¹⁸ While HLV bears specific physical barriers (such as the passage through the vasculature and the endothelium) which are less of a problem with the IM route, subsequent steps are similar in many instances (see below). IM is relatively easy to practice and is a route of choice for vaccination. It allows high transgene expression in the injected muscle group but this only occurs along the administration site. Thus, homogeneous gene transfer even for a single muscle would require multiple injections, which could potentially induce unwanted damages to the tissue. This makes such local delivery methods clinically irrelevant for diseases affecting large, profound, and/or multiple muscles.¹⁹ Furthermore, issues of scaling-up from mouse to bigger animals

have been reported.²⁰ **(iii)** Muscle electroporation generally consists in IM injections, followed by the application of a pulsatile electric field delivered by electrodes positioned on one or both sides of the muscle area to be treated. This allows a 10 to 100-fold increased transfection compared to IM injection²¹ in small and in large animals,^{20,22,23} as well as in humans. Nevertheless, only mm³ to cm³ volumes of muscle can be efficiently treated with single procedures. **(iv)** Sonoporation uses ultrasounds to create small pores in cell membranes, thus facilitating intracellular delivery.²⁴ To date, gene-based sonoporation have rarely been applied in clinical settings.

HLV gene transfer to SM is a rather quick and simple technique, which may be applied to muscle diseases using either pDNA or viral (mainly AAV) vectors.^{25,26} It was evaluated in a wide range of animals including mice,^{17,27,28} rats,^{29,30} dogs,^{10,31,32} and non-human primates.^{29,33,34} In all these diverse models, HLV demonstrated some efficiency while it was basically safe. Hematoxylin and eosin staining and other histological studies (comprising Evan's blue dye) revealed only minimal and transient damages of SM fibers.³⁵ The oedema caused by the injected fluid resolved within 24 hours and even the minimal signs of observed muscle toxicity cleared within two weeks post-injection.^{35,36} To note that arterial limb perfusion did not turn safe in a canine model of Duchenne muscular dystrophy (*GRMD* dogs).³⁷ Even though a head-to-head comparison would be necessary, preclinical studies suggest that gene transfer might be higher in diseased than in wild-type muscles. The highest transfection efficiencies were noticed in non-human primates; up to 40% of SM fibers did express reporter genes following a single limb perfusion of naked pDNA.³⁸ In humans, two clinical studies (NCT number on clinicaltrials.gov: 00873782) evaluated the injection of up to 20% and 35% of limb volume, respectively, in lower and upper extremities of young adults with muscular dystrophy.^{9,39} These demonstrated the clinical feasibility and safety of the procedure, neither any significant side-effects nor any major pain being reported. Altogether, non-viral approaches remain valid to treat dystrophic limb muscles, alternatively to viral vectors in seropositive patients or in indications that require large transgenes with regional gene transfer.⁴⁰

This review is intended to survey the current status of the HLV procedure. After listing various applications using this administration method, issues possibly occurring during this procedure are identified and further improvements are suggested.

II) HLV gene delivery: interests and applications

HLV delivery has been implemented in various gene transfer studies and applications (**Table 2**).

a) HLV injection for *in situ* production of secreted proteins

HLV gene transfer can be performed with the aim to use the SM as a protein factory (**Table 2**). This approach is under investigation for diseases like haemophilia. Haemophilia B is due to mutations in the F9 gene encoding the coagulation factor IX whose deficiency is responsible of severe bleedings.⁴¹ HLV injection was used in haemophilia B dogs to deliver a cassette encoding the coagulation factor IX carried by a recombinant AAV2 vector. The transgene was sufficiently expressed to reach a therapeutic level of circulating factor IX protein for more than four years.⁴² Another example is anemia, which corresponds to a deficit in hemoglobin due to red blood cell depletion. Erythropoietin (EPO) is a key hormone for erythropoiesis that is mainly produced in the kidneys. A non-viral gene therapy protocol based on the HLV delivery of an EPO-encoding pDNA was evaluated in SM of sub-total nephrectomized Lewis rats and in rhesus monkeys.⁴³ Long-term inducible transgene expression (for at least five years) of an EPO-encoding pDNA was also shown in non-human primates using an AAV vector delivered by HLV injection; no deleterious immune reaction against the transgene could be detected throughout the duration of this study.³⁴

b) HLV injection for DNA vaccination

Genetic immunization can be achieved *via* IM delivery of an antigen-encoding NA, with *in situ* antigen expression possibly triggering both cellular and humoral immune responses.⁴⁴ In comparison with conventional vaccination relying on antigen protein

administration, DNA vaccination exhibits several advantages such as lower production costs, easier fabrication and avoidance of any heat instability.⁴⁵ HLV DNA delivery was reported as a relevant administration method for vaccination purposes (**Table 2**). It turned out to surpass other delivery methods like IM injection of naked DNA, which failed in scale-up experiment.^{46,47} HLV injection for DNA vaccination was investigated in various animal models. Antitumor DNA vaccination performed by this procedure showed a protective antitumor immunity in a murine model of melanoma.⁴⁶ Using a luciferase-encoding pDNA, it was shown that two administrations were sufficient to obtain high level of anti-luciferase antibodies in mice; similar results could be obtained in rats and rabbits. Immunization could also be achieved for other proteins like EPO.⁴⁸

c) HLV injection for genetic disorders

Gene therapy is an attractive therapeutic strategy to cure genetic diseases.⁴⁹ It consists basically in introducing NA to correct and/or to supply a genetic defect responsible for a given pathology.⁵⁰⁻⁵³ To date, more than 2600 gene therapy clinical trials have been completed worldwide,^{54,55} successes are increasingly obtained not only for correcting the hematopoietic tissue⁵⁶ but also for addressing disorders affecting solid organs/tissues.⁵⁷⁻⁶⁰ For instance, a recent study reported successful SM gene delivery for LGMD 2D through isolated limb infusion, a locoregional method which does not imply any hydrodynamic overpressure.⁶¹ The HLV procedure has been evaluated for this genetic disease as well as others, as exemplified hereafter (**Table 2**).

LGMD comprise a broad range of neuromuscular disorders that are inherited following an autosomal pattern. More than thirty subgroups have been reported at present, displaying different genetic etiologies and phenotypes.⁶² Up to now, no cure exists for these diseases. HLV injection has been used in a study focusing on LGMD 2B, which results from mutation(s) in the dysferlin gene.⁶³ In a murine model for this disease, the HLV delivery of a naked therapeutic pDNA allowed to restore dysferlin in the treated hind limb muscles.¹⁷ Following a single administration, up to 10% of

myofibers were transfected in some muscles. A reduction of Evan's blue dyed positive fibers (a marker of myofiber damage) was also reported, suggesting at least partial restoration of the sarcolemma integrity.¹⁷

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a recessive X-linked disorder affecting the whole-body musculature. It results from mutations occurring in dystrophin, the largest gene known in the human genome. Dystrophin is a 427 kDa subsarcolemmal protein that connects the actin filaments to a protein complex anchored in the membrane of muscle and heart myofibers. A major role of the Dystrophin-glycoprotein complex is to maintain the integrity of the sarcolemma during muscle contractions.⁶⁴ To date, treatments for DMD are primarily symptomatic.⁶⁵ HLV has been evaluated in diverse DMD animal models, using different strategies implicating naked pDNA or viral vectors. **(i)** As for dystrophin delivery by HLV, Wolff and coworkers delivered a naked pDNA encoding a full-length murine DMD cassette to the hind limbs of *mdx* mice (a murine model of muscular dystrophy). Following a single injection, 4 to 8% of Dystrophin-positive myofibers were obtained. This percentage could be noticeably increased when this treatment was repeated. After 6 injections, it was on average 15% in medial thigh muscles and 25% in posterior lower leg muscles during 15 months.²⁷ In another study conducted in *GRMD* dogs, HLV administration of a recombinant viral vector (rAAV2/8) carrying a micro-dystrophin transgene allowed long-term Dystrophin expression to even much higher level. Up to 84% Dystrophin-positive myofibers were indeed obtained in the *extensor carpi radialis* of the treated limbs.³² **(ii)** Exon skipping consists in using an expression cassette to generate antisense oligonucleotides (AON) allowing to skip a mutated exon during mRNA splicing; this restores the open reading frame of the dystrophin mRNA with subsequent translation of a shorter but functional Dystrophin.^{66,67} Following this strategy, Dystrophin was restored in up to 76% myofibers in the forelimbs of *GRMD* dogs after HLV injection of a rAAV8 (follow-up time was about 3.5 months).¹⁰ **(iii)** Myostatin, a negative regulator of muscle mass, can also be targeted to alleviate the dystrophic phenotype. HLV delivery of an AAV8 vector carrying the canine myostatin

propeptide gene (an inhibitor of myostatin) could enhance muscle growth of normal dogs as assessed by histology (fiber size measurement) and digital morphometric analysis.³¹

Limb ischemia can be addressed with HLV-administered pDNA encoding short hairpin RNA targeting the Prolyl-4-Hydroxylase Domain enzyme 2 (PHD2). This enzyme is implicated in oxygen homeostasis by hydroxylating the Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). The latter plays a key role in the regulation of some angiogenic factors. Thus, by inhibiting PHD2, increased recovery with enhanced vascular regeneration could be obtained in a critical limb ischemia murine model.⁶⁸

Mitochondrial disorders may also be targeted using HLV injection. Exogenous pDNA localization to mitochondria has been achieved using both naked³⁰ or condensed pDNA (using protamine at low N/P ratios).^{69,70}

III) Current state of HLV delivery: strengths and weaknesses

Despite having been proved efficient in many cases, HLV gene transfer may still require improvements, especially in view of clinical applications. First, an obvious reason for improving HLV delivery relates to the need for higher gene transfer efficiency (in terms of transgene expression intensity and/or number of cells treated). Although this delivery method allows to simultaneously target all the SM of the treated limb, not all muscle fibers are transfected. Further, notably because HLV injection generates different pressures in the various limb muscle groups,³⁶ a broad range of transgene expression levels can be found across muscles, as shown for instance upon HLV delivery of a luciferase-encoding pDNA (**Figure 3**). Yet, high and homogeneous transfection is crucial to assure therapeutic levels.⁷¹ For instance in DMD, HLV delivery of naked dystrophin-encoding pDNA is still unable to restore normal Dystrophin expression in a sufficient number of myofibers in every SM, 40% being usually considered as required to obtain a substantial clinical benefit in patients.³²

The efficiency of HLV gene transfer depends on the injection volume which determines the hydrodynamic pressure. From works conducted in the *mdx* mouse, *GRMD* dog and non-human primates, it was found that the optimal volume needed for efficient naked pDNA limb perfusion was 40% of the limb volume.²⁷ Compared to studies performed in non-human primates, clinical studies in dystrophic patients were conducted at lower cuff pressures (450–700 versus 310–325 mm Hg, respectively).^{29,38} Perfusion performed at 40% limb volume in one patient was associated with short-lived physiological changes in peripheral nerves without clinical correlates.⁹ For safety reasons, the volume delivered in humans will not be as high as in animals. Moreover, to avoid any compartment syndrome, the injected volume in man could be suboptimum, set to only 20% of the limb volume.

Also, curative treatments for congenital diseases like DMD should take place before the onset of pathological degenerations (especially fibrosis), which will compromise phenotype reversibility with an obvious impact on therapeutic efficacy. Considering that treatment should be initiated as soon as possible in early childhood to limit a dilution effect consecutive to muscle growth and necrosis-regeneration cycles, re-administrations may be done throughout the patient life. The need for repeated administrations may damage and compromise the venous system and in turn the efficiency of treatments. Accordingly, the therapeutic regimen must be both convenient and highly efficient with successive administrations well-staggered over time. As for DNA vaccination, HLV injection was used to perform antitumor vaccination in mice. Following a first HLV delivery, a second one (“boost”) was required a few days later to maintain antitumoral activity.⁴⁶ Here again, increasing the yield of gene transfer could be useful to avoid such requirement.

Besides, economical aspects are not to be underestimated. For instance, it was reported that, compared to rodents, 20 to 30 higher doses of EPO-encoding pDNA were needed to reach similar efficiencies in larger animals like dogs or monkeys.⁷² Transposed to humans, the amount of NA constructs to be delivered may reach several milligrams, with obvious consequences regarding large scale production and cost of

Good Manufacturing Practice (GMP) clinical grade material. For all the above-mentioned reasons, the efficiency of any treatment based on HLV delivery must be increased. For this purpose, it is important to first identify the potential technical limitations in order to propose adequate optimizations.

In the next parts of this review, the barriers at each of the sequential steps upon HLV injection will be reviewed (**Figure 4**), emphasizing their potential respective impact on the final transfection efficiency. For the sake of clarity, the HLV procedure will be mainly considered as a non-viral method, thus focusing on its use to deliver NA either naked or combined with a synthetic non-viral system.

a) Blood components

First NA crosses through the wall of the saphenous vein, thus gaining direct access to the vasculature system (**Figure 4, step 1**). At this stage, various interactions may occur with blood components, including nucleases. This can represent a hurdle, especially for naked NA. *In vitro* studies predicted a half-life of supercoiled pDNA of about 1 min in rat plasma⁷³ whereas a half-life between 5 to 10 min was reported for pDNA post-IV injection in mice.⁷⁴ Also, when using nanoparticles (NPs) for gene transfer, interactions with serum proteins (e.g. albumin, complement system) can lead to their titration, capture and elimination from the bloodstream.⁷⁵ However, it must be noticed that a typical HLV injection involves the administration of a large volume of solution flushing in the blood. This forces mechanically the NA solution to extravasate into the vascularized tissues, this occurring very quickly and therefore limiting the interference with blood components. For this reason, the contribution of the blood barrier, with respect to the transfection yield, might not be a key determinant. This assumption is supported by the observation that no substantial benefit resulted from limb exsanguination prior to HLV injection in non-human primates.³⁸

b) Blood vasculature

The endothelium barrier should not be a main barrier to HLV gene transfer, provided the delivered volume is high enough to produce a sufficient hydrodynamic effect. The increased pressure due to the volume introduced into the blood vessels induces a transient dramatic stretch of the microvasculature (**Figure 4, step 2**).⁷⁶ The capillary wall being relatively thin, stretchable and easy to break, the NA can thus reach the extravascular space passing between – or even through (transcytosis)⁷⁷ – the endothelial cells. It is noteworthy that the capillary network within SM is continuous unlike in the liver where it is highly fenestrated, with gaps between adjacent endothelial cells.⁷⁸

c) Extracellular matrix

The blood vessels of the microvasculature are surrounded by an extracellular matrix (ECM), a complex biopolymer structure acting as a scaffold (**Figure 4, step 3**). The epimysium, the perimysium and the endomysium are mainly composed of collagen, glycosaminoglycans and proteoglycans.⁷⁹ This composition can be modified under particular pathological conditions like in DMD. In this disease, an aberrant accumulation of ECM is observed, with modifications of the glycosaminoglycans (with higher proportions of chondroitin sulfate and dermatan sulfate) and an increase of the collagen content.⁸⁰ Also, a strong chronic inflammatory process is ongoing with a high load of infiltrating mononucleated cells. Thus, the activated inflammatory cells may either incorporate and degrade the vector together with the nucleases contained in this matrix and the fluids.⁸¹ When entrapping NA within a viral or non-viral vector, protection against degradation can be obtained but in turn other hurdles can be faced. Several studies suggested that the ECM could trap the positively-charged nano-objects upon IM injection.^{82,83} It was proposed that the ECM could indeed be considered as a selective electrostatic bandpass.⁸⁴ According to the model reported in this study, the zeta potential of synthetic (lipid-based) NPs (composed of 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) and

1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (DOPG)) determines the mobility of these NPs in Matrigel© (an extracellular matrix purified from mouse sarcoma). A dramatic decrease of mobility occurred for NPs exhibiting even a slightly positive zeta potential, as low as +7.2 mV. This decrease was very sharp, no intermediate situation between mobility and immobility being identified in this study. When considering negatively-charged NPs, a reduction of mobility could also be observed but it was less stringent than for positively-charged NPs since it occurred starting from a zeta potential of -30 mV.⁸⁴ It is worth noticing here that naked pDNA typically exhibits a negative surface charge of approximately -40 mV (depending on the solvent), suggesting that its trafficking through the ECM may also be affected (and could thus be improved). All these findings are consistent with our own experience using synthetic cationic vectors delivered by HLV injection in mice (**Figures 1 and 3**). For instance, we evaluated 25 kDa Polyethylenimine (bPEI), a branched polymer exhibiting a very high density of positive charges, and which is widely used for many gene transfer applications.^{85,86} In comparison with naked pDNA, bPEI/pDNA complexes showed much inferior – or even close to the background – transfection efficiencies in all the SM isolated from the treated hind limbs of animals (**Figures 2 and 3**). Thus, bPEI showed a strong deleterious effect in term of transfection upon HLV injection in every case considered, even for very low bPEI/pDNA mass ratios. Similar results were actually obtained with any other (lipid or polymer-based) cationic vector we have considered (personal unpublished data).

d) Plasma membrane

The cell membrane (**Figure 4, step 4**) is a major obstacle for gene transfer in general. For instance, *in vitro* studies using flow cytometry showed that only 0.1% to 20% of pDNA copies actually cross this barrier and reach the cytoplasm.^{87,88} Following HLV injection of naked pDNA, the mechanism of pDNA entry through the sarcolemma is not fully understood yet. Several – nonexclusive – hypotheses have been proposed.

(i) First, the hydrodynamic pressure likely promotes a local transient mechanical destabilization of the plasma membrane allowing NA translocation from the outside to the inside of the cells. This assumption is supported by the finding that upon IM injection, the transfection efficiency increases proportionally with the injection speed.⁸⁹ (ii) In the context of hydrodynamic gene delivery to the liver, authors proposed that the hydrodynamic pressure can generate pores through which NA constructs may enter into the cell (*via* so called “hydroporation”);⁹⁰⁻⁹² such mechanism could also take place during HLV delivery. (iii) Other specific features/composition of the sarcolemma may also be involved. Macropinocytosis may occur in SM cells like described in hepatocytes during hydrodynamic gene delivery to the liver.⁷ Along the same line, it has been proposed that the entry of naked DNA into muscle fibers could happen following a specific recognition *via* a receptor-mediated endocytosis process.^{93,94} In support of this hypothesis, IM injection studies reported that the transfection efficiency of naked pDNA was impaired when a polyanionic compound like heparin was co-administrated, suggesting a competitive inhibition of pDNA endocytosis.⁹⁴ We have observed a similar phenomenon following HLV injection in mice of a pDNA mixed with dextran sulfate (personal unpublished data). Regardless of the exact mechanism of entry of pDNA into muscle fibers, the sarcolemma constitutes a noticeable barrier to HLV gene transfer.

e) Cytoplasm

Once inside the cell, the cytosol is also an obstacle for HLV gene transfer since the NA can remain trapped inside (**Figure 4, step 5**).⁹⁵ The diffusion of molecules through this natural hydrogel indeed largely depends on their molecular weight. For large macromolecules like pDNA more than 2 kb, the mobility is strongly decreased.⁹⁶ Moreover, the cytoplasm contains nucleases. The half-life of naked pDNA was estimated to be approximately 4 h in the cytoplasm of a murine myoblast (C2C12) cell line.⁹⁷ Hydrodynamic delivery by itself can allow to overcome this step to a certain extent since the transient increase of the intracellular volume can enlarge the mesh size

of the cytoplasm hydrogel. As a consequence, the exclusion diameter is increased and the diffusion of exogenous NA can be enhanced allowing it to get closer to the fiber nuclei.⁹⁰ It is noteworthy that in healthy conditions, nuclei are located at the periphery of muscle cells; thus, the path from the sarcolemma to nuclei might be shorter than in centronucleated cells. However, following HLV delivery, a relationship between the size of NA constructs and their transfection efficiency is generally still observed. This indicates that the hydrodynamic positive effect on NA mobility in the cytoplasm is probably limited, especially for large NA.

f) Nuclear membrane

Myofibers correspond to terminal non-dividing cells. Under normal (non-pathological) conditions, they exhibit a very low renewing rate with an average lifespan of 10 to 15 years in humans⁹⁸ (this duration being most certainly shorter in dystrophic muscles). This has an obvious impact on gene transfer into these cells since the entry of NA constructs into their nuclei (**Figure 4, step 6**) cannot rely on mitosis, during which the nuclear envelope transiently disappears. Furthermore, in some pathological contexts, the nuclei can be located far from the fiber periphery (centronucleated fibers). Once inside the nuclei, other parameters – notably related to the design of the NA delivered – can impact on transgene expression (see below).

IV) Potential optimizations: step-by-step improvements

Since the first description of the HLV injection procedure by Wolff and colleagues,⁵ optimizations have been proposed to get better benefits from this technic while preserving its simplicity, safety, and clinical translatability. With respect to the successive barriers opposing to HLV gene transfer as listed before, the following part of this review discusses the interest of potential improvements that were already underscored and/or would deserve to be tested in further studies (**Table 3**).

a) Extravasation from the vessels

This step mainly relies on a controlled hydrodynamic pressure applied to enhance endothelial and parenchymal cell permeability (**Figure 4, steps 1 and 2**). In contrast with arterial delivery, a pre-injection of papaverine (a phosphodiesterase inhibitor) did not provide any benefit following HLV delivery in non-human primates.³⁸ However, since the injection volume may be reduced when practicing this procedure in humans (for safety reasons as stated before), it could help to counterbalance a lower hydrodynamic effect. In this respect, preconditioning treatments would deserve further attention. It should also be highlighted that compounds such as neutral amphiphilic triblock copolymers (TBCP) (see below) could open new muscle vascular territories, thereby expanding the vessel 'surface for extravasation.

b) Passage through the extracellular matrix

Several strategies can be considered to facilitate the diffusion of the NA through the ECM (**Figure 4, step 3**), such as local transient degradation of the latter before and/or concomitantly with HLV delivery. For this purpose, enzymes can be used for digesting some ECM components, as reported in studies dealing with other delivery methods. For instance, a pretreatment with hyaluronidase before IM injection of pDNA allowed to increase the yield of gene transfer.⁹⁹ Likewise, injection of collagenase prior to hydrodynamic (arterial) gene delivery resulted in a 3-fold higher transfection efficiency.⁷⁶ Another strategy could consist in using NPs able to escape from the trap that forms the charged molecular scaffold of the ECM. For instance, decoration of the NPs surface with polyethylene glycol (PEG) chains may enhance their mobility through the ECM. This was observed under *in vitro* conditions with PEGylated PEI NPs dispersed in Matrigel; the mobility increase of the nano-objects was correlated with a decrease of their positive surface charge.¹⁰⁰ This was also demonstrated *in vivo* in mice following HLV delivery of PEGylated poly-L-Lysine used to complex a luciferase-encoding pDNA; compared to naked DNA, about 1-log enhancement of luciferase expression could be obtained.²⁸ This benefit was likely attributable to the

PEGylated shell, the hiding of the positive charges of the complexes avoiding their interactions with the negatively-charged ECM components.²⁸

c) Crossing the plasma membrane

As stated above, the precise molecular mechanism by which NA enter into muscle fibers (**Figure 4, step 4**) is not clearly understood yet. Investigations using various chemical compounds can provide clues to better understand this process, which in turn could help for improving gene transfer at this step. As for positively-charged (polymer or lipid-based) vectors, they can be efficient for *in vitro* transfection of muscle cells whereas naked pDNA is ineffective;¹⁰¹ by contrast, the same chemical compounds delivered *in vivo via* IM or HLV routes usefully show detrimental effects compared to naked pDNA (as discussed before).¹⁰² On the opposite, some neutral synthetic compounds such as some block copolymers – described hereafter and in **Figure 5** – that are inefficient under *in vitro* conditions can provide some benefit for gene transfer in the context of IM delivery. This again illustrates a sharp contrast between *in vitro* and *in vivo* settings, making preclinical (animal) experimentation both an indispensable and unavoidable step.

Neutral amphiphilic TBCP are structurally composed of three subunits. “A-B-A” block copolymers correspond to a sequence of hydrophilic/hydrophobic/hydrophilic moieties whereas “B-A-B” block copolymers correspond to a sequence of hydrophobic/hydrophilic/hydrophobic moieties. Among the “A-B-A”-type neutral amphiphilic TBCP, Pluronic (also called Poloxamers) have been the most widely used for gene transfer to SM. They consist of two poly(ethylene oxide) (PEO) chains surrounding a central poly(propylene oxide) (PPO) chain.¹⁰³ For instance, Pluronic F-68 © (also named Poloxamer 188 or Lutrol ©) allowed to increase the gene transfer upon IM injection in the tibialis anterior muscle of mice.¹⁰⁴ This compound has been shown to promote the interaction of pDNA with membranes and also its cell internalization.¹⁰¹ As regards the “B-A-B”-type neutral amphiphilic TBCP, the reverse Pluronic (corresponding to PPO-PEO-PPO) also enhanced gene transfer into SM.¹⁰⁵

Aside Pluronics, other original “A-B-A”-type neutral amphiphilic TBCP were designed with alternate chemical moieties such as poly(tetrahydrofuran) (pTHF) and poly(2-methyl-2-oxazoline) (pMeOxz). Such PEO-pTHF-PEO¹⁰⁶ and pMeOxz-PPO-pMeOxz¹⁰⁷ showed some efficiency under similar experimental conditions. Tetronics (star-like polymers) comprise the same chemical groups as Pluronics but with a specific organization i.e. with 4-branches grafted on an ethylenediamine core. For instance, Tetronic 304 increased the gene transfer efficiency upon IM injection.^{102,108} It is noteworthy that all the above-mentioned copolymers could also be useful for DNA vaccination.¹⁰⁹ Furthermore, increased transfection could also be obtained by coupling some of the previous compounds with physical gene delivery methods such as electroporation and sonoporation.^{110,111}

In addition to a possible correlation between surface charge of a given compound and its role – as helper or antagonist – for SM gene transfer (notably during ECM crossing), a strong electrostatic interaction and condensation of NA may prevent their recognition with a receptor participating in cell entry, an assumption coming in support of the “cell internalization *via* NA receptors” hypothesis. On the opposite, compounds like amphiphilic copolymers which do not (or only slightly) interact with NA would not interfere with such a process. The benefit conferred by the latter class of compounds may also rely on other cell entry mechanisms. This includes a local permeation of the cell membrane¹¹² and/or the formation of transient nanopores.¹¹³ Of note, other chemicals like starburst cyclodextrin-based poly(ethylene glycol)s are able to form such pores through which NA could directly access to the cytoplasm.¹¹⁴ Furthermore, amphiphilic copolymers could mediate other beneficial effects at subsequent steps of the HLV delivery pathway, as discussed below.

d) Traffic through the cytoplasm

In the cytoplasm, NA assisted-movements along the microtubules network may be used to get closer to the nuclei, thus both escaping the trap constituted by this hydrogel and avoiding degradation by nucleases present in that compartment (**Figure 4, step**

5).¹¹⁵ For this purpose, some peptides were designed to bind to NA and to interact with dynein; this led to a noticeable increase (by a factor 5) of luminescence in the liver of mice upon HTV injection of a luciferase-encoding pDNA.¹¹⁶ To our knowledge, the potential of such an approach remains to be evaluated in the context of HLV gene transfer to SM. However, here again, the relevance of such a strategy may be driven by the intended application and eventual pathological context. For instance in DMD, the lack of Dystrophin also results in a strong disorganization of the microtubule network.¹¹⁷

e) Translocation into the nuclei

Under healthy conditions, SM is a long-lasting stable tissue.¹¹⁸ Mitosis of muscle fibers being a very rare event, entry of exogenous NA in the nuclei of the myofibers occurs mainly through the nuclear pores (**Figure 4, step 6**). Since this translocation is generally poorly efficient, optimizations of this step should be beneficial. Improvements can be obtained by taking advantage of specific – experimentally, pathologically or even therapeutically-induced – conditions, as detailed below. DNA nuclear Targeting Sequences (DTS) are short DNA sequences capable to bind proteins that shuttle from the cytoplasm into the nucleus.⁹⁵ The incorporation of such motifs has been reported to enhance the translocation of pDNA into the nucleus of non-dividing cells *in vitro*.¹¹⁹ For instance, cyclic AMP response-element binding protein (CREB) DTS-carrying pDNA displayed a rapid movement through the cytoplasm and a rapid translocation in the nucleus.¹²⁰ Nuclear factor-kappa B (NF-kB) was also used for assisted nuclear import of pDNA.¹²¹ An optimized DTS called 3NF (corresponding to three NF-kB binding sites with optimized spacers) was inserted in the backbone of a pDNA; compared to a control pDNA devoid of such DTS, 3NF-equipped pDNA showed significantly increased transfection not only *in vitro* but also *in vivo* (following HTV delivery in mice).^{122,123} It is noteworthy that NF-kB is upregulated under inflammatory conditions and in some muscular diseases (e.g. at an early stage in DMD).¹²⁴ It can also be experimentally induced, for instance as a consequence of an

hydrodynamic injection¹²⁵ or with some amphiphilic block copolymers such as Pluronic p85.¹¹³ Therefore, HLV delivery of combination of such chemicals with NF-kB DTS-equipped pDNA might be useful. Furthermore, Pluronic p85 can elicit some pro-inflammatory pathways and immune responses,¹²⁶ which may be relevant for DNA vaccination purposes. Along the same line, glucocorticoid responsive elements (GRE) DTS might also be useful since glucocorticoids are often included in the therapeutic regimen of muscular diseases like DMD; GRE DTS-carrying pDNA delivered *via* nebulization to lungs in mice have indeed led to a 4.7-fold increased gene expression upon glucocorticoid treatment.¹²⁷ Moreover, some studies have highlighted the interest of DTS-equipped pDNA when delivered to SM *via* a physical gene delivery method (e.g SV40 DTS-pDNA together with electroporation¹²⁸ and NF-kB related transgene expression in mouse tibial cranial muscle after pDNA injection + electrotransfer¹²⁹). Altogether, these findings suggest that the “DTS strategy” – optionally combined with some specific chemicals – might be relevant in the context of HLV gene transfer, especially for gene therapy of inflammatory muscle diseases like DMD.

V) Other miscellaneous considerations

Other parameters should be considered since they can also impact on the yield of HLV gene transfer. This includes first the final product formulation to be delivered, with physical/physicochemical properties that may impact on each step of the delivery procedure. Considering the NA construct, its size impairs transfection efficiency,²⁹ emphasizing the need for short and functional NA backbones and transgenes, like mini or micro-dystrophin pDNA for DMD.¹³⁰ The purity of pDNA batches is also a crucial parameter, especially as regards residual bacterial genomic DNA that can cause muscle damages.¹³¹ The viscosity of the solution to deliver can affect the injection rate and biodistribution.⁷⁶ The composition of the solution may disturb normal blood clotting and isotonicity, with direct and/or indirect influence on the bioavailability of the NA product. This was substantiated by experiments using hydrodynamic intra-

arterial limb delivery with hypotonic or hypertonic solutions which reduced gene transfer.⁷⁶ Consequently, formulations must be optimized with regards to purity, viscosity, or osmotic strength, to ensure optimal flow and efficient/safe transit across the various physiological barriers. Other parameters such as tourniquet inflation, pressure/duration, and rate of injection are also modulators. These can tolerate a range of variations, as seen in rats and non-human primates, showing the robustness of the method.³⁸ Accordingly, HLV injection parameters could be tuned to some extents, depending on the intended application.

Besides optimizations dedicated to obtain high and widespread pDNA delivery into the nuclei of muscle cells, improvements could also concern the transgene expression cassette. In addition to the potential benefit taken from an active nuclear import, some DTS might also further enhance the transgene transcription.¹²⁸ This may also be achieved thanks to peculiar properties of some amphiphilic block copolymers.¹³² Pharmacological treatment may also help; for example, it was shown that corticoids, which are used to treat DMD patients, could also increase transgene expression in SM.¹³³ Moreover, re-expression of a silenced transgene might possibly be reactivated thanks to subsequent HLV administration(s) of saline, as it was shown for liver transfection using HTV.¹³⁴

Adequate transgene expression requirements may differ between HLV gene therapy intended for protein production or for DNA vaccination. For the latter application, the strong CMV promoter could be used since it confers a high expression level of the transgene in mammalian cells whereas the duration of expression is probably not determinant.^{135,136} For long-term expression applications, the use of a muscle specific promoter could be more adequate and ensure to restrict transgene expression to SM.^{16,130} However, it is important to mention that upon HLV, sustained expression could be obtained using various promoters (including the CMV promoter).^{27,29,130} The duration of transgene expression does probably also depend on the CpG dinucleotides present on pDNA because of their immunogenicity-inducing recognition by TLR9.¹³⁷ Accordingly, CpG-free pDNA is less prone to induce

inflammation in lung transfection studies¹³⁸ (as well as following IV injection).¹³⁹ Of note, long transgene expression has however been achieved following HLV administration of non-CpG free pDNA.¹⁴⁰ Along the same lines, CpG-enriched pDNA should be more relevant for DNA vaccination.¹⁴¹ On the contrary, CpG-enriched pDNA has been shown to protect against anti-transgene immune response.¹⁴² To date, gene therapy pre-clinical studies (in animal models) showed no induction of any deleterious immune reaction against the transgene following HLV injection.³⁴ This remains however to be confirmed in humans.

VI) Conclusion

HLV injection is a locoregional delivery method with broad biodistribution to any SM of a given limb. It was shown to be very efficient in small as well as in large animals, with a good safety profile and the potential for a variety of clinical applications. However, the efficacy of today HLV non-viral gene transfer might not be optimal and sufficient to reach therapeutic levels because of limitations occurring at the various stages of this multistep process. Some possible improvements of this delivery method have already been discussed above. An example consists in using neutral amphiphilic TBCP which could have beneficial effects on some steps of the HLV delivery process. It is noteworthy that such compounds could be advantageously combined with DTS-equipped plasmids. It should also be stressed here that additional transfection benefits might be obtained by combining HLV delivery with other physical gene transfer methods, e.g. sonoporation. In a broader perspective, some additional improvements might be foreseen. For example, as regards the NA constructs to be transferred, the use of novel oligonucleotide chemistries might be of great potential. Gene editing might also be performed using HLV injection. For instance, CRISPR/Cas9 has already been efficiently delivered to the liver *via* the hydrodynamic HTV method. Finally, taken altogether, the HLV approach might become an efficient delivery method for clinical SM gene transfection.

Acknowledgments

The authors greatly thank Professor Jon Wolff (who inspired this original review) and express their gratitude to Professor Pierre Lehn for his constant support. Personal unpublished data reported in this study were obtained following the HLV procedure protocol (approved by the Laboratory Animal Care Guidelines and the Institutional Animal Care and Research Advisory committee at the Faculty of Brest) learnt from Dr Julia Hegge and Dr Guofeng Zhang, who are here also gratefully acknowledged. The authors also thank "Service général des plateformes, Animalerie commune » (Brest, France) and "Association Française contre les Myopathies" (AFM, Evry, France), "Association de transfusion sanguine et de biogénétique Gaétan Saleün" (Brest, France) and "Région Bretagne" (Brest, France) which supported this work. Yann Le Guen was a recipient of a PhD fellowship from the "french Ministère de l'Enseignement supérieur, de la Recherche et de l'Innovation" (Paris, France).

Conflicts of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Bibliography

1. Braun S. Muscular gene transfer using nonviral vectors. *Curr Gene Ther.* 2008;8(5):391-405.
2. Broderick KE, Humeau LM. Enhanced Delivery of DNA or RNA Vaccines by Electroporation. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2017;1499:193-200. doi:10.1007/978-1-4939-6481-9_12
3. Grzelkowska-Kowalczyk K. The Importance of Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development and Function. In: Travascio F, ed. *Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body.* InTech; 2016. doi:10.5772/62230
4. 10.2 Skeletal Muscle – Anatomy and Physiology. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/10-2-skeletal-muscle/>. Accessed July 24, 2019.
5. Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, et al. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2004;10(2):386-398. doi:10.1016/j.ymthe.2004.05.004

6. Bonamassa B, Hai L, Liu D. Hydrodynamic Gene Delivery and Its Applications in Pharmaceutical Research. *Pharm Res.* 2011;28(4):694-701. doi:10.1007/s11095-010-0338-9
7. Suda T, Liu D. Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications. *Mol Ther.* 2007;15(12):2063-2069. doi:10.1038/sj.mt.6300314
8. Huang M, Sun R, Huang Q, Tian Z. Technical Improvement and Application of Hydrodynamic Gene Delivery in Study of Liver Diseases. *Front Pharmacol.* 2017;8:591. doi:10.3389/fphar.2017.00591
9. Fan Z, Kocis K, Valley R, et al. High-Pressure Transvenous Perfusion of the Upper Extremity in Human Muscular Dystrophy: A Safety Study with 0.9% Saline. *Hum Gene Ther.* 2015;26(9):614-621. doi:10.1089/hum.2015.023
10. Le Guiner C, Montus M, Servais L, et al. Forelimb Treatment in a Large Cohort of Dystrophic Dogs Supports Delivery of a Recombinant AAV for Exon Skipping in Duchenne Patients. *Mol Ther.* 2014;22(11):1923-1935. doi:10.1038/mt.2014.151
11. Seto JT, Ramos JN, Muir L, Chamberlain JS, Odom GL. Gene replacement therapies for Duchenne muscular dystrophy using adeno-associated viral vectors. *Curr Gene Ther.* 2012;12(3):139-151.
12. Mack DL, Poulard K, Goddard MA, et al. Systemic AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs. *Mol Ther.* 2017;25(4):839-854. doi:10.1016/j.ymthe.2017.02.004
13. Systemic Gene Delivery Clinical Trial for Duchenne Muscular Dystrophy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03375164>. Accessed July 10, 2019.
14. Gene Transfer Clinical Study in X-Linked Myotubular Myopathy - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03199469>. Accessed July 24, 2019.
15. Al-Zaidy SA, Kolb SJ, Lowes L, et al. AVXS-101 (Onasemnogene Apeparvovec) for SMA1: Comparative Study with a Prospective Natural History Cohort. *J Neuromuscul Dis.* 2019;6(3):307-317. doi:10.3233/JND-190403
16. Roudaut C, Le Roy F, Suel L, et al. Restriction of calpain3 expression to the skeletal muscle prevents cardiac toxicity and corrects pathology in a murine model of limb-girdle muscular dystrophy. *Circulation.* 2013;128(10):1094-1104. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001340
17. Ma J, Pichavant C, du Bois H, Bhakta M, Calos MP. DNA-Mediated Gene Therapy in a Mouse Model of Limb Girdle Muscular Dystrophy 2B. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2017;7:123-131. doi:10.1016/j.omtm.2017.10.005

18. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*. 1990;247(4949):1465-1468. doi:10.1126/science.1690918
19. Wells DJ. Opening the Floodgates: Clinically Applicable Hydrodynamic Delivery of Plasmid DNA to Skeletal Muscle. *Mol Ther*. 2004;10(2):207-208. doi:10.1016/j.ymthe.2004.07.010
20. Bodles-Brakhop AM, Draghia-Akli R, Broderick K, Khan AS. Electroporation of plasmid DNA to swine muscle. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2011;709:257-264. doi:10.1007/978-1-61737-982-6_16
21. Dean DA. Non-viral Gene Transfer to Skeletal, Smooth, and Cardiac Muscle in Living Animals. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005;289(2):C233-C245. doi:10.1152/ajpcell.00613.2004
22. Otten G, Schaefer M, Doe B, et al. Enhancement of DNA vaccine potency in rhesus macaques by electroporation. *Vaccine*. 2004;22(19):2489-2493. doi:10.1016/j.vaccine.2003.11.073
23. Pavlin D, Tozon N, Sersa G, Pogacnik A, Cemazar M. Efficient electrotransfection into canine muscle. *Technol Cancer Res Treat*. 2008;7(1):45-54. doi:10.1177/153303460800700106
24. Tomizawa M, Shinozaki F, Motoyoshi Y, Sugiyama T, Yamamoto S, Sueishi M. Sonoporation: Gene transfer using ultrasound. *World J Methodol*. 2013;3(4):39-44. doi:10.5662/wjm.v3.i4.39
25. Microdystrophin Gene Transfer Study in Adolescents and Children With DMD - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03368742>. Accessed July 10, 2019.
26. Duan D. Myodys, a full-length dystrophin plasmid vector for Duchenne and Becker muscular dystrophy gene therapy. *Curr Opin Mol Ther*. 2008;10(1):86-94.
27. Zhang G, Wooddell CI, Hegge JO, et al. Functional efficacy of dystrophin expression from plasmids delivered to mdx mice by hydrodynamic limb vein injection. *Hum Gene Ther*. 2010;21(2):221-237. doi:10.1089/hum.2009.133
28. Itaka K, Osada K, Morii K, Kim P, Yun S-H, Kataoka K. Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J Controlled Release*. 2010;143(1):112-119. doi:10.1016/j.jconrel.2009.12.014
29. Wooddell CI, Hegge JO, Zhang G, et al. Dose Response in Rodents and Nonhuman Primates After Hydrodynamic Limb Vein Delivery of Naked Plasmid DNA. *Hum Gene Ther*. 2011;22(7):889-903. doi:10.1089/hum.2010.160
30. Yasuzaki Y, Yamada Y, Kanefuji T, Harashima H. Localization of exogenous DNA to mitochondria in skeletal muscle following hydrodynamic limb vein injection. *J Controlled Release*. 2013;172(3):805-811. doi:10.1016/j.jconrel.2013.09.029

31. Qiao C, Li J, Zheng H, et al. Hydrodynamic Limb Vein Injection of Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vector Carrying Canine Myostatin Propeptide Gene into Normal Dogs Enhances Muscle Growth. *Hum Gene Ther.* 2009;20(1):1-10. doi:10.1089/hum.2008.135
32. Guiner CL, Servais L, Montus M, et al. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2017;8:ncomms16105. doi:10.1038/ncomms16105
33. Toromanoff A, Adjali O, Larcher T, et al. Lack of Immunotoxicity After Regional Intravenous (RI) Delivery of rAAV to Nonhuman Primate Skeletal Muscle. *Mol Ther.* 2010;18(1):151-160. doi:10.1038/mt.2009.251
34. Guilbaud M, Devaux M, Couzinié C, et al. Five Years of Successful Inducible Transgene Expression Following Locoregional Adeno-Associated Virus Delivery in Nonhuman Primates with No Detectable Immunity. *Hum Gene Ther.* 2019;30(7):802-813. doi:10.1089/hum.2018.234
35. Toumi H, Hegge J, Subbotin V, et al. Rapid Intravascular Injection into Limb Skeletal Muscle: A Damage Assessment Study. *Mol Ther.* 2006;13(1):229-236. doi:10.1016/j.ymthe.2005.07.699
36. Vigen KK, Hegge JO, Zhang G, et al. Magnetic resonance imaging-monitored plasmid DNA delivery in primate limb muscle. *Hum Gene Ther.* 2007;18(3):257-268. doi:10.1089/hum.2006.115
37. Braun S. *Chapter 9, Non-Viral Vector for Muscle-Mediated Gene Therapy. In Muscle Gene Therapy.* 2nd ed. (Duan D, Mendell J, eds.). Springer International Publishing; 2019. <https://www.springer.com/gp/book/9783030030940>. Accessed September 24, 2019.
38. Hegge JO, Wooddell CI, Zhang G, et al. Evaluation of hydrodynamic limb vein injections in nonhuman primates. *Hum Gene Ther.* 2010;21(7):829-842. doi:10.1089/hum.2009.172
39. Fan Z, Kocis K, Valley R, et al. Safety and Feasibility of High-pressure Transvenous Limb Perfusion With 0.9% Saline in Human Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* 2012;20(2):456-461. doi:10.1038/mt.2011.137
40. Braun S. Gene-based therapies of neuromuscular disorders: an update and the pivotal role of patient organizations in their discovery and implementation. *J Gene Med.* 2013;15(11-12):397-413. doi:10.1002/jgm.2747
41. Peyvandi F, Garagiola I, Young G. The past and future of haemophilia: diagnosis, treatments, and its complications. *The Lancet.* 2016;388(10040):187-197. doi:10.1016/S0140-6736(15)01123-X

42. Arruda VR, Stedman HH, Haurigot V, et al. Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B. *Blood*. 2010;115(23):4678-4688. doi:10.1182/blood-2009-12-261156
43. Sebestyén MG, Hegge JO, Noble MA, Lewis DL, Herweijer H, Wolff JA. Progress toward a non-viral gene therapy protocol for the treatment of anemia. *Hum Gene Ther*. 2007;18(3):269-285. doi:10.1089/hum.2006.186
44. Moreno S, Timón M. DNA vaccination: an immunological perspective. 2004;23(1):15.
45. Khan KH. DNA vaccines: roles against diseases. *Germs*. 2013;3(1):26-35. doi:10.11599/germs.2013.1034
46. Neal ZC, Bates MK, Albertini MR, Herweijer H. Hydrodynamic Limb Vein Delivery of a Xenogeneic DNA Cancer Vaccine Effectively Induces Antitumor Immunity. *Mol Ther*. 2007;15(2):422-430. doi:10.1038/sj.mt.6300046
47. Suschak JJ, Williams JA, Schmaljohn CS. Advancements in DNA vaccine vectors, non-mechanical delivery methods, and molecular adjuvants to increase immunogenicity. *Hum Vaccines Immunother*. 2017;13(12):2837-2848. doi:10.1080/21645515.2017.1330236
48. Bates MK, Zhang G, Sebestyén MG, Neal ZC, Wolff JA, Herweijer H. Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. *BioTechniques*. 2006;40(2):199-208. doi:10.2144/000112088
49. Sridharan K, Gogtay NJ. Therapeutic nucleic acids: current clinical status. *Br J Clin Pharmacol*. 2016;82(3):659-672. doi:10.1111/bcp.12987
50. Montier T, Delépine P, Pichon C, Férec C, Porteous DJ, Midoux P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol*. 2004;22(11):586-592. doi:10.1016/j.tibtech.2004.09.009
51. Braun R, Wang Z, Mack DL, Childers MK. Gene therapy for inherited muscle diseases: Where genetics meets rehabilitation medicine. *Am J Phys Med Rehabil Assoc Acad Physiatr*. 2014;93(11 0 3):S97-S107. doi:10.1097/PHM.0000000000000138
52. Cotrim AP, Baum BJ. Gene therapy: some history, applications, problems, and prospects. *Toxicol Pathol*. 2008;36(1):97-103. doi:10.1177/0192623307309925
53. Kumar SR, Markusic DM, Biswas M, High KA, Herzog RW. Clinical development of gene therapy: results and lessons from recent successes. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2016;3:16034. doi:10.1038/mtm.2016.34
54. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med*. 2018;20(5):e3015. doi:10.1002/jgm.3015
55. Du X, Wang J, Zhou Q, et al. Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. *Drug Deliv*. 2018;25(1):1516-1525. doi:10.1080/10717544.2018.1480674

56. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint Basile G, et al. Gene Therapy of Human Severe Combined Immunodeficiency (SCID)-X1 Disease. *Science*. 2000;288(5466):669-672. doi:10.1126/science.288.5466.669
57. Tabet R, El Bitar S, Zaidan J, Dabaghian G. Spinal Muscular Atrophy: The Treatment Approved. *Cureus*. 2017;9(9). doi:10.7759/cureus.1644
58. Patel U, Boucher M, de Léséleuc L, Visintini S. Voretigene Neparvovec: An Emerging Gene Therapy for the Treatment of Inherited Blindness. In: *CADTH Issues in Emerging Health Technologies*. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2016. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538375/>. Accessed April 22, 2019.
59. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med*. 2017;377(23):2215-2227. doi:10.1056/NEJMoa1708538
60. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5–Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2519-2530. doi:10.1056/NEJMoa1708483
61. Mendell JR, Chicoine LG, Al-Zaidy SA, et al. Gene Delivery for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2D by Isolated Limb Infusion. *Hum Gene Ther*. April 2019. doi:10.1089/hum.2019.006
62. Murphy AP, Straub V. The Classification, Natural History and Treatment of the Limb Girdle Muscular Dystrophies. *J Neuromuscul Dis*. 2015;2(Suppl 2):S7-S19. doi:10.3233/JND-150105
63. Lidov H. Dystrophin, Associated Proteins, and Muscular Dystrophy. In: Squire LR, ed. *Encyclopedia of Neuroscience*. Oxford: Academic Press; 2009:771-784. doi:10.1016/B978-008045046-9.00581-7
64. Gumerson JD, Michele DE. The Dystrophin-Glycoprotein Complex in the Prevention of Muscle Damage. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/210797
65. Walter MC, Reilich P. Recent developments in Duchenne muscular dystrophy: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2017;8(5):681-685. doi:10.1002/jcsm.12245
66. Aartsma-Rus A, Straub V, Hemmings R, et al. Development of Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: A Critical Review and a Perspective on the Outstanding Issues. *Nucleic Acid Ther*. 2017;27(5):251-259. doi:10.1089/nat.2017.0682
67. Miskew Nichols B, Aoki Y, Kuraoka M, Lee JJA, Takeda S, Yokota T. Multi-exon Skipping Using Cocktail Antisense Oligonucleotides in the Canine X-linked Muscular Dystrophy. *J Vis Exp JoVE*. 2016;(111). doi:10.3791/53776

68. Wu S, Zhang J, Huang C, et al. Prolyl hydroxylase domain-2 silencing induced by hydrodynamic limb vein injection enhances vascular regeneration in critical limb ischemia mice through activation of multiple genes. *Curr Gene Ther.* 2015;15(3):313-325.
69. Yasuzaki Y, Yamada Y, Fukuda Y, Harashima H. Condensation of Plasmid DNA Enhances Mitochondrial Association in Skeletal Muscle Following Hydrodynamic Limb Vein Injection. *Pharmaceuticals.* 2014;7(8):881-893. doi:10.3390/ph7080881
70. Yasuzaki Y, Yamada Y, Ishikawa T, Harashima H. Validation of Mitochondrial Gene Delivery in Liver and Skeletal Muscle via Hydrodynamic Injection Using an Artificial Mitochondrial Reporter DNA Vector. *Mol Pharm.* 2015;12(12):4311-4320. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00511
71. Anthony K, Cirak S, Torelli S, et al. Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials. *Brain.* 2011;134(12):3544-3556. doi:10.1093/brain/awr291
72. Sebestyén MG, Hegge JO, Noble MA, Lewis DL, Herweijer H, Wolff JA. Progress toward a non-viral gene therapy protocol for the treatment of anemia. *Hum Gene Ther.* 2007;18(3):269-285. doi:10.1089/hum.2006.186
73. Houk BE, Hochhaus G, Hughes JA. Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma. *AAPS PharmSci.* 1999;1(3):15-20. doi:10.1208/ps010309
74. Lew D, Parker SE, Latimer T, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum Gene Ther.* 1995;6(5):553-564. doi:10.1089/hum.1995.6.5-553
75. Tandia B-M, Vandenbranden M, Wattiez R, Lakhdar Z, Ruyschaert J-M, Elouahabi A. Identification of human plasma proteins that bind to cationic lipid/DNA complex and analysis of their effects on transfection efficiency: implications for intravenous gene transfer. *Mol Ther.* 2003;8(2):264-273. doi:10.1016/S1525-0016(03)00150-3
76. Budker V, Zhang G, Danko I, Williams P, Wolff J. The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle. *Gene Ther.* 1998;5(2):272-276. doi:10.1038/sj.gt.3300572
77. Su Leonard T., Gopal Kapil, Wang Zhonglin, et al. Uniform Scale-Independent Gene Transfer to Striated Muscle After Transvenular Extravasation of Vector. *Circulation.* 2005;112(12):1780-1788. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.534008
78. Bennett HS, Luft JH, Hampton JC. Morphological classifications of vertebrate blood capillaries. *Am J Physiol.* 1959;196(2):381-390. doi:10.1152/ajplegacy.1959.196.2.381
79. Gillies AR, Lieber RL. Structure and Function of the Skeletal Muscle Extracellular Matrix. *Muscle Nerve.* 2011;44(3):318-331. doi:10.1002/mus.22094

80. Negroni E, Henault E, Chevalier F, et al. Glycosaminoglycan modifications in Duchenne muscular dystrophy: specific remodeling of chondroitin sulfate/dermatan sulfate. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2014;73(8):789-797. doi:10.1097/NEN.0000000000000098
81. Schmidt-Wolf GD, Schmidt-Wolf IGH. Non-viral and hybrid vectors in human gene therapy: an update. *Trends Mol Med*. 2003;9(2):67-72. doi:10.1016/S1471-4914(03)00005-4
82. Chang C-W, Choi D, Kim WJ, et al. Non-ionic amphiphilic biodegradable PEG-PLGA-PEG copolymer enhances gene delivery efficiency in rat skeletal muscle. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 2007;118(2):245-253. doi:10.1016/j.jconrel.2006.11.025
83. He Y, Liu Y, Sun Z, et al. The proper strategy to compress and protect plasmid DNA in the Pluronic L64-electropulse system for enhanced intramuscular gene delivery. *Regen Biomater*. January 2019. doi:10.1093/rb/rby028
84. Lieleg O, Baumgärtel RM, Bausch AR. Selective Filtering of Particles by the Extracellular Matrix: An Electrostatic Bandpass. *Biophys J*. 2009;97(6):1569-1577. doi:10.1016/j.bpj.2009.07.009
85. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(16):7297-7301. doi:10.1073/pnas.92.16.7297
86. Rai R, Alwani S, Badea I. Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications. *Polymers*. 2019;11(4). doi:10.3390/polym11040745
87. Tseng W-C, Haselton FR, Giorgio TD. Transfection by Cationic Liposomes Using Simultaneous Single Cell Measurements of Plasmid Delivery and Transgene Expression. *J Biol Chem*. 1997;272(41):25641-25647. doi:10.1074/jbc.272.41.25641
88. Bishop CJ, Majewski RL, Guiriba T-RM, et al. Quantification of Cellular and Nuclear Uptake Rates of Polymeric Gene Delivery Nanoparticles and DNA Plasmids via Flow Cytometry. *Acta Biomater*. 2016;37:120-130. doi:10.1016/j.actbio.2016.03.036
89. André FM, Cournil-Henrionnet C, Vernerey D, Opolon P, Mir LM. Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed. *Gene Ther*. 2006;13(23):1619-1627. doi:10.1038/sj.gt.3302827
90. Zhang G, Gao X, Song YK, et al. Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther*. 2004;11(8):675-682. doi:10.1038/sj.gt.3302210
91. Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y. Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med*. 2004;6(5):584-592. doi:10.1002/jgm.541

92. Andrianaivo F, Lecocq M, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R, Jadot M. Hydrodynamics-based transfection of the liver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection. *J Gene Med.* 2004;6(8):877-883. doi:10.1002/jgm.574
93. Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process. *J Gene Med.* 2000;2(2):76-88. doi:10.1002/(SICI)1521-2254(200003/04)2:2<76::AID-JGM97>3.0.CO;2-4
94. Šatkauskas S, Bureau MF, Mahfoudi A, Mir LM. Slow Accumulation of Plasmid in Muscle Cells: Supporting Evidence for a Mechanism of DNA Uptake by Receptor-Mediated Endocytosis. *Mol Ther.* 2001;4(4):317-323. doi:10.1006/mthe.2001.0465
95. Bai H, Lester GMS, Petishnok LC, Dean DA. Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. *Biosci Rep.* 2017;37(6). doi:10.1042/BSR20160616
96. Lukacs GL, Haggie P, Seksek O, Lechardeur D, Freedman N, Verkman AS. Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem.* 2000;275(3):1625-1629.
97. Pampinella F, Lechardeur D, Zanetti E, et al. Analysis of Differential Lipofection Efficiency in Primary and Established Myoblasts. *Mol Ther.* 2002;5(2):161-169. doi:10.1006/mthe.2002.0528
98. What cells in the human body live the longest? BBC Science Focus Magazine. <https://www.sciencefocus.com/the-human-body/what-cells-in-the-human-body-live-the-longest/>. Accessed July 24, 2019.
99. McMahon J, Signori E, Wells K, Fazio V, Wells D. Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase – increased expression with reduced muscle damage. *Gene Ther.* 2001;8(16):1264-1270. doi:10.1038/sj.gt.3301522
100. Tomasetti L, Liebl R, Wastl DS, Breunig M. Influence of PEGylation on nanoparticle mobility in different models of the extracellular matrix. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2016;108:145-155. doi:10.1016/j.ejpb.2016.08.007
101. Chèvre R, Le Bihan O, Beilvert F, et al. Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(4):1610-1622. doi:10.1093/nar/gkq922
102. Roques C, Fattal E, Fromes Y. Comparison of toxicity and transfection efficiency of amphiphilic block copolymers and polycationic polymers in striated muscles. *J Gene Med.* 2009;11(3):240-249. doi:10.1002/jgm.1304

103. Rey-Rico A, Cucchiarini M. PEO-PPO-PEO Tri-Block Copolymers for Gene Delivery Applications in Human Regenerative Medicine-An Overview. *Int J Mol Sci.* 2018;19(3). doi:10.3390/ijms19030775
104. Bello-Roufaï 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(3):728-739. doi:10.1093/nar/gkl860
105. Guiraud S, Alimi-Guez D, van Wittenberghe L, Scherman D, Kichler A. The Reverse Block Copolymer Pluronic 25R2 Promotes DNA Transfection of Skeletal Muscle. *Macromol Biosci.* 2011;11(5):590-594. doi:10.1002/mabi.201000463
106. Pomel C, Leborgne C, Cheradame H, Scherman D, Kichler A, Guégan P. Synthesis and evaluation of amphiphilic poly(tetrahydrofuran-b-ethylene oxide) copolymers for DNA delivery into skeletal muscle. *Pharm Res.* 2008;25(12):2963-2971. doi:10.1007/s11095-008-9698-9
107. Brissault B, Kichler A, Leborgne C, Jarroux N, Cheradame H, Guis C. Amphiphilic poly[(propylene glycol)-block-(2-methyl-2-oxazoline)] copolymers for gene transfer in skeletal muscle. *ChemMedChem.* 2007;2(8):1202-1207. doi:10.1002/cmdc.200700068
108. Pitard B. Negatively charged self-assembling DNA/poloxamine nanospheres for in vivo gene transfer. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(20):e159-e159. doi:10.1093/nar/gnh153
109. McIlroy D, Barteau B, Cany J, et al. DNA/Amphiphilic Block Copolymer Nanospheres Promote Low-dose DNA Vaccination. *Mol Ther.* 2009;17(8):1473-1481. doi:10.1038/mt.2009.84
110. Chen Y-C, Jiang L-P, Liu N-X, et al. Enhanced gene transduction into skeletal muscle of mice in vivo with pluronic block copolymers and ultrasound exposure. *Cell Biochem Biophys.* 2011;60(3):267-273. doi:10.1007/s12013-010-9149-1
111. Hartikka J, Sukhu L, Buchner C, et al. Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2001;4(5):407-415. doi:10.1006/mthe.2001.0483
112. Alimi-Guez D, Leborgne C, Pembouong G, et al. Evaluation of the muscle gene transfer activity of a series of amphiphilic triblock copolymers. *J Gene Med.* 2009;11(12):1114-1124. doi:10.1002/jgm.1396
113. Huin C, Le Gall T, Barteau B, et al. Evidence of DNA transfer across a model membrane by a neutral amphiphilic block copolymer. *J Gene Med.* 2011;13(10):538-548. doi:10.1002/jgm.1612
114. Eskandani Z, Le Gall T, Montier T, et al. Polynucleotide transport through lipid membrane in the presence of starburst cyclodextrin-based poly(ethylene glycol)s. *Eur Phys J E Soft Matter.* 2018;41(11):132. doi:10.1140/epje/i2018-11743-3

115. Badding MA, Dean DA. Highly Acetylated Tubulin Permits Enhanced Interactions with and Trafficking of Plasmids Along Microtubules. *Gene Ther.* 2013;20(6):616-624. doi:10.1038/gt.2012.77
116. Midoux P, Pigeon L, Gonçalves C, Pichon C. Peptides mediating DNA transport on microtubules and their impact on non-viral gene transfer efficiency. *Biosci Rep.* 2017;37(5). doi:10.1042/BSR20170995
117. Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, et al. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(15):5723-5728. doi:10.1073/pnas.1323842111
118. Shadrach JL, Wagers AJ. Stem cells for skeletal muscle repair. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2011;366(1575):2297-2306. doi:10.1098/rstb.2011.0027
119. van Gaal EVB, Oosting RS, van Eijk R, et al. DNA Nuclear Targeting Sequences for Non-Viral Gene Delivery. *Pharm Res.* 2011;28(7):1707-1722. doi:10.1007/s11095-011-0407-8
120. Badding MA, Vaughan EE, Dean DA. Transcription Factor- Plasmid Binding Modulates Microtubule Interactions and Intracellular Trafficking During Gene Transfer. *Gene Ther.* 2012;19(3):338-346. doi:10.1038/gt.2011.96
121. Mesika A, Grigoreva I, Zohar M, Reich Z. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther.* 2001;3(5 Pt 1):653-657. doi:10.1006/mthe.2001.0312
122. Gonçalves C, Ardourel M-Y, Decoville M, et al. An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med.* 2009;11(5):401-411. doi:10.1002/jgm.1312
123. Breuzard G, Tertilt M, Gonçalves C, 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(12):e71. doi:10.1093/nar/gkn287
124. Messina S, Vita GL, Aguenouz M, et al. Activation of NF-kB pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Acta Myol.* 2011;30(1):16-23.
125. Nishikawa M, Nakayama A, Takahashi Y, Fukuhara Y, Takakura Y. Reactivation of silenced transgene expression in mouse liver by rapid, large-volume injection of isotonic solution. *Hum Gene Ther.* 2008;19(10):1009-1020. doi:10.1089/hum.2008.020
126. Gaymalov ZZ, Yang Z, Pisarev VM, Alakhov VY, Kabanov AV. The effect of the nonionic block copolymer pluronic P85 on gene expression in mouse muscle and antigen-presenting cells. *Biomaterials.* 2009;30(6):1232-1245. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.10.064

127. Dames P, Laner A, Maucksch C, Aneja MK, Rudolph C. Targeting of the glucocorticoid hormone receptor with plasmid DNA comprising glucocorticoid response elements improves nonviral gene transfer efficiency in the lungs of mice. *J Gene Med.* 2007;9(9):820-829. doi:10.1002/jgm.1082
128. Young JL, Benoit JN, Dean DA. Effect of a DNA nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Ther.* 2003;10(17):1465-1470. doi:10.1038/sj.gt.3302021
129. Mahindhoratep S, Bouda HA, El Shafey N, et al. NF- κ B related transgene expression in mouse tibial cranial muscle after pDNA injection followed or not by electrotransfer. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(11):3257-3263. doi:10.1016/j.bbagen.2014.06.013
130. Ramos JN, Hollinger K, Bengtsson NE, Allen JM, Hauschka SD, Chamberlain JS. Development of Novel Micro-dystrophins with Enhanced Functionality. *Mol Ther.* 2019;27(3):623-635. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.002
131. Wooddell CI, Subbotin VM, Sebestyén MG, et al. Muscle Damage After Delivery of Naked Plasmid DNA into Skeletal Muscles Is Batch Dependent. *Hum Gene Ther.* 2010;22(2):225-235. doi:10.1089/hum.2010.113
132. Sriadibhatla S, Yang Z, Gebhart C, Alakhov VY, Kabanov A. Transcriptional Activation of Gene Expression by Pluronic Block Copolymers in Stably and Transiently Transfected Cells. *Mol Ther.* 2006;13(4):804-813. doi:10.1016/j.ymthe.2005.07.701
133. Braun S, Jenny C, Thioudellet C, et al. In vitro and in vivo effects of glucocorticoids on gene transfer to skeletal muscle. *FEBS Lett.* 1999;454(3):277-282. doi:10.1016/S0014-5793(99)00818-2
134. Ochiai H, Fujimuro M, Yokosawa H, Harashima H, Kamiya H. Transient activation of transgene expression by hydrodynamics-based injection may cause rapid decrease in plasmid DNA expression. *Gene Ther.* 2007;14(15):1152-1159. doi:10.1038/sj.gt.3302970
135. Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines.* 2016;15(3):313-329. doi:10.1586/14760584.2016.1124762
136. Williams JA. Vector Design for Improved DNA Vaccine Efficacy, Safety and Production. *Vaccines.* 2013;1(3):225-249. doi:10.3390/vaccines1030225
137. Hong K, Sherley J, Lauffenburger DA. Methylation of episomal plasmids as a barrier to transient gene expression via a synthetic delivery vector. *Biomol Eng.* 2001;18(4):185-192.
138. Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol.* 2008;26(5):549-551. doi:10.1038/nbt1399

139. Lindberg MF, Le Gall T, Carmoy N, et al. Efficient in vivo transfection and safety profile of a CpG-free and codon optimized luciferase plasmid using a cationic lipophosphoramidate in a multiple intravenous administration procedure. *Biomaterials*. 2015;59:1-11. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.04.024
140. Zhang G, Wooddell CI, Hegge JO, et al. Functional Efficacy of Dystrophin Expression from Plasmids Delivered to mdx Mice by Hydrodynamic Limb Vein Injection. *Hum Gene Ther*. 2009;21(2):221-237. doi:10.1089/hum.2009.133
141. Coban C, Ishii KJ, Gursel M, Klinman DM, Kumar N. Effect of plasmid backbone modification by different human CpG motifs on the immunogenicity of DNA vaccine vectors. *J Leukoc Biol*. 2005;78(3):647-655. doi:10.1189/jlb.1104627
142. Ho PP, Lahey LJ, Mourkioti F, et al. Engineered DNA plasmid reduces immunity to dystrophin while improving muscle force in a model of gene therapy of Duchenne dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018;115(39):E9182-E9191. doi:10.1073/pnas.1808648115
143. Gene Transfer Clinical Trial for Duchenne Muscular Dystrophy Using rAAVrh74.MCK.GALGT2 - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02704325>. Accessed July 11, 2019.
144. Evaluating the Safety and Immunogenicity of pDNA Vaccines Expressing HIV M Group p24^{Gag} Conserved Elements and/or p55^{Gag}, Administered With IL-12 pDNA by Intramuscular Electroporation, in Healthy, HIV-Uninfected Adults - Full Text View - ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03181789>. Accessed July 11, 2019.

Tables

Table 1. Comparative of HLV injection with other methods to target skeletal muscles.

	HLV	IV	IM	EP	SP
Ease to practice ^a	**	*	*	**	**
Extent	Regional	General	Local	Local	Regional
Area treated	Limb	BW	Patch	Patch	Local
Scaling-up ^b	Yes	Yes	No	Yes	Yes
Clinical trials ^c	9,39	13,25	143	144	None

IV, systemic intravenous; HLV, hydrodynamic limb vein; IM, intramuscular; EP, electroporation; SP, sonoporation; BW, bodywide. a, need of specific materials/skills, number of star represents the increase difficulty of performing the method; b, efficiency demonstrated from small to large animal models. c, clinical trials conducted with corresponding method for skeletal muscles gene transfer applications.

Table 2. HLV delivery implemented in various gene transfer studies and applications.

Application	Target	Vehicle + NA	Model, ref.
DNA vaccination	Antitumor treatment	Naked pDNA	Murine ⁴⁶
	Immunization	Naked pDNA	Murine, lagomorph ⁴⁸
Protein factory	Hemophilia	AAV + pDNA	Canine ⁴²
	Anemia	Naked pDNA	Murine, primate ⁷²
Gene therapy	DMD	Naked pDNA	Murine ²⁷
		AAV + pDNA	Canine ³²
		AAV + AON	Canine ¹⁰
		AAV + pDNA	Canine ³¹
	LGMD	Naked pDNA	Murine ¹⁷
	Mitochondrial disorder	Polymer + pDNA	Murine ^{30,69}
	Ischemia	Naked pDNA	Murine ⁶⁸

NA, nucleic acids; DMD, Duchenne Muscular Dystrophy; LGMD: Limb Girdle Muscular Dystrophy. For the moment, no clinical trials using HLV have been performed to our knowledge, except one with NaCl 0.9% to evaluate the feasibility of this delivery method in dystrophic patients (Limb Girdle Muscular Dystrophy, Emery-Dreifuss muscular dystrophy and Becker muscular dystrophy).

Table 3. Validated or hypothetical solutions to increase gene transfer at different steps following HLV delivery.

Step ^a	Potential solution	Previous demonstration(s) ^b
S1 & S2	Pre-conditioning	None
S3	Enzymatic	IM, ⁹⁹ EP ⁹⁹
	PEGylation	HLV ²⁸
S4	A-B-A copolymers	IM, ^{104,106,109,112} EP, ¹¹¹ SP ¹¹⁰
	B-A-B copolymers	IM ¹⁰⁵
	Tetronic	IM ^{102,109}
S5	Peptide	HTV ¹¹⁶
	DTS	IM, ¹²⁹ EP, ¹²⁹ HTV ¹²²
S6	DTS	IM, ¹²⁹ EP, ¹²⁹ HTV ¹²²
Post-S6	CpG-free pDNA	IV, ¹³⁹ AE ¹³⁸
	GpG-enriched pDNA	IV ¹⁴²

a, see Figure 4; b, previous *in vivo* assessment suggesting a potential relevance in the context of HLV gene delivery to skeletal muscles; HLV, hydrodynamic limb vein; HTV, hydrodynamic tail vein; IM, intramuscular; EP, electroporation; SP, sonoporation; IV, systemic intravenous; AE, aerosolization.

Figures

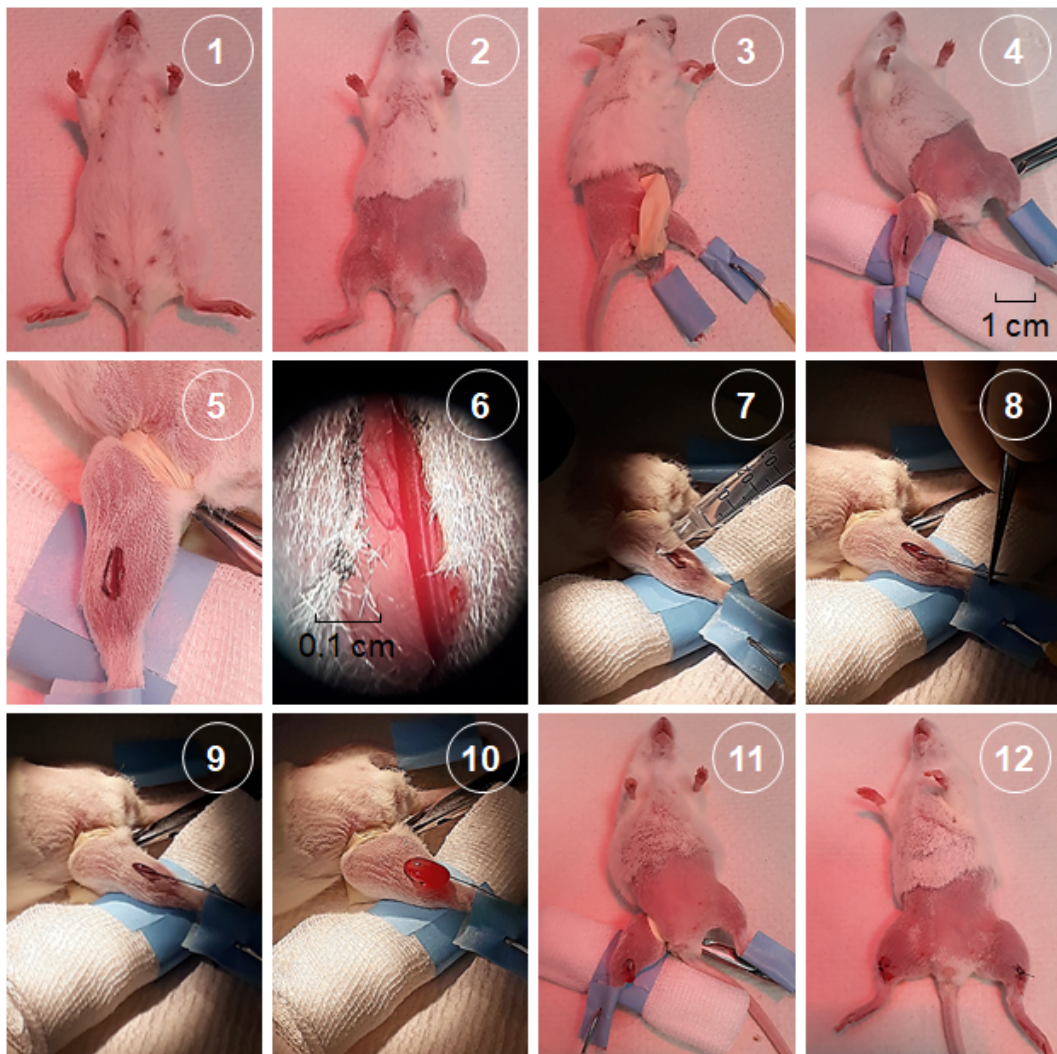


Figure 1. Step-by-step procedure of HLV injection as performed in Swiss mouse. First, the animal is anesthetized (1), e.g. thanks to an intraperitoneal injection of ketamine/xylazine (respectively 100 and 10 mg/kg of body weight). Hind limbs are shaved (2,) a tourniquet is placed around one (3) and then is tightened at its proximal part (4). An incision of the skin (over approximately 0.5 cm) is performed (5) to discover the underlying great saphenous vein (6). A drop of saline solution is deposited over the incision (7). A 30 G needle hold with a tweezer is carefully introduced into the vein (8) and then held in position by hand (9). A large volume of solution containing the transgene of interest is then delivered in a few seconds (10). Of note, for a 25 g animal, this volume is ~ 1 mL which corresponds to ~ half of the body blood volume. Finally, the incision is sutured (11) and the second hind limb can be processed following the same procedure (12). Typically, the animal wakes up approximately 30 min after induction of the anesthesia and it recovers the use of his hind limbs in a few hours. For small rodents, this procedure requires the use of a binocular magnifier. In larger animals like rats, this protocol is less invasive since no incision of the skin is required and the whole procedure can be done with bare eyes.

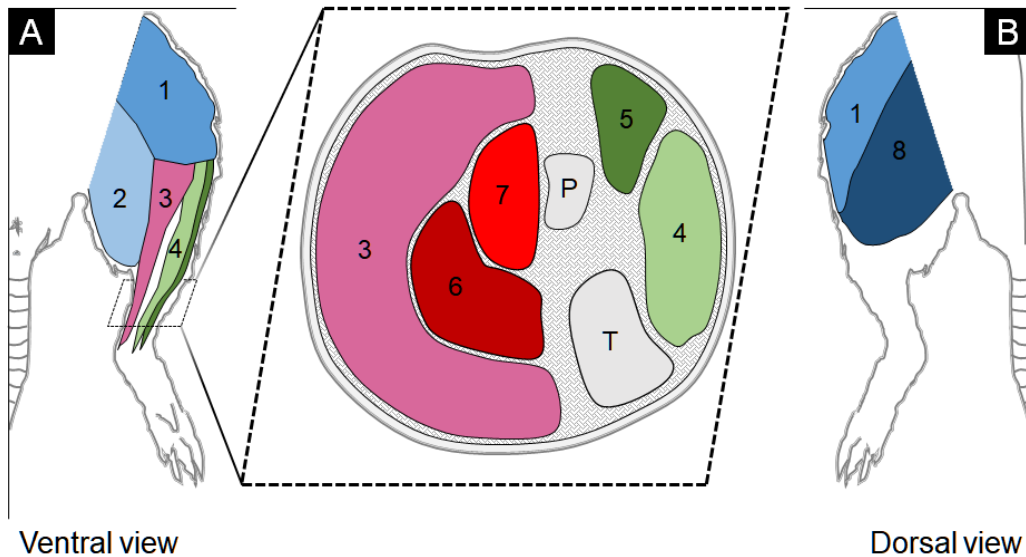


Figure 2. Simplified anatomy of muscle hind limb in the mouse. (A) Ventral view showing (1) quadriceps, (2) posterior muscles, (3) gastrocnemius, (4) tibialis anterior muscle, and (5) extensor digitalis longus (EDL). Insert: sagittal view of the framed area in (A) uncovering (6) plantaris, and (7) soleus; other muscles are not shown. The bones of the distal part of the hind limb are indicated with (“P”) peroneus and (“T”) tibialis. (B) Dorsal view of the hind limb showing (8) hamstring.

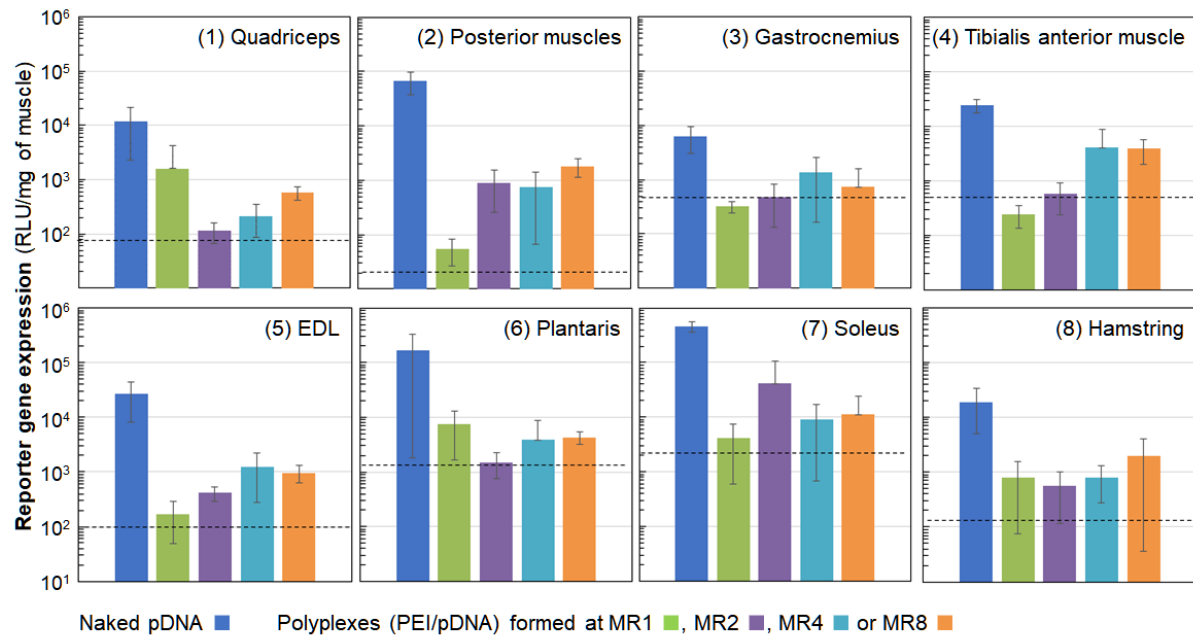


Figure 3. Effect of the cationic polymer 25 kDa branched Polyethylenimine (PEI, Sigma) on the gene transfer efficiency of a luciferase-encoding pDNA following HLV delivery in Swiss mice. Naked pDNA and bPEI/pDNA polyplexes formed at 4 mass ratios (MR) were compared in terms of luciferase activity two weeks after HLV injection. Each graph provides the results obtained for one muscle among the eight distinguished in Figure 2 (the code number being the same in both figures). A horizontal dotted line indicates the background luminescent signal specific of each muscle. Results are expressed in relative light unit (RLU) per mg of muscle corresponding to the mean of n=4 muscles +/- SD (personal unpublished data).

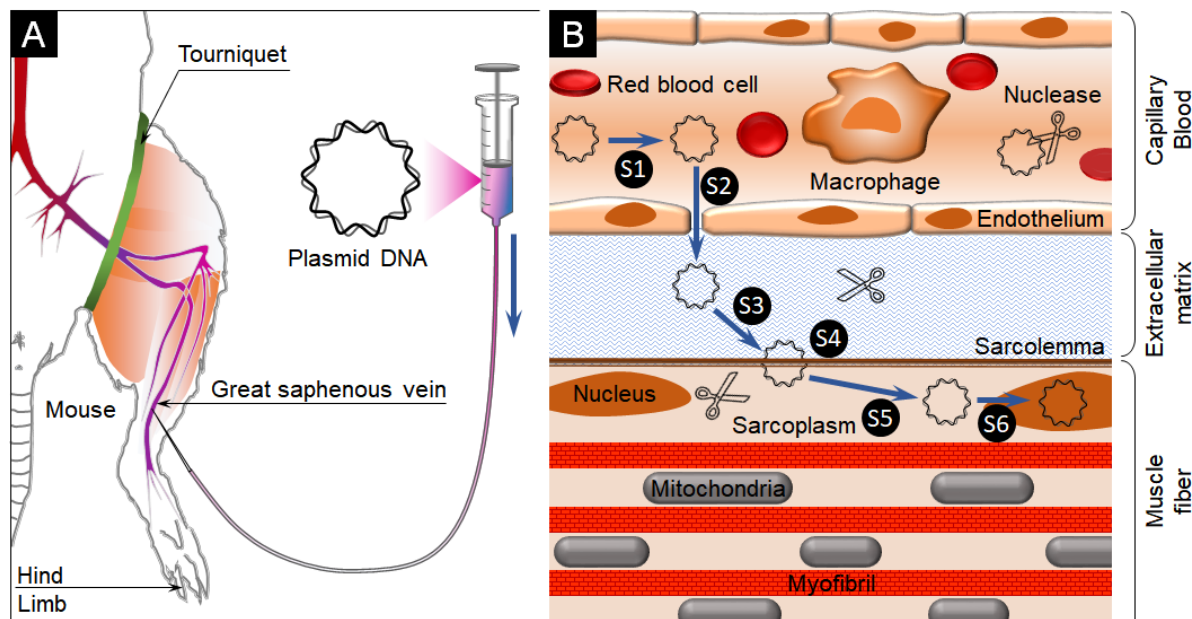


Figure 4. Sequential steps of naked DNA gene transfer following HLV injection. As described in Figure 1, the formulation containing a nucleic acid of interest is rapidly flushed out from the syringe (arrow in panel A). After moving inside the pipe, it crosses through the needle the wall of the saphenous vein, thus gaining direct access to the venous system (step 1, S1). Thanks to the hydrodynamic pressure, extravasation through the blood capillary occurs (S2), bringing the nucleic acid to the underlying tissue. The following steps correspond to the crossing through the ECM (S3), the entry into the muscle fiber through the sarcolemma (S4), the traffic within the sarcoplasm (S5) prior to the translocation into the nucleus (S6) where the NA can finally be expressed.

II) Problématique : injection HLV et efficacité de transfection, quelles pistes d'optimisations ?

Les approches de transfert non-viral de gènes demeurent attractives car elles permettent de s'affranchir de certaines contraintes inhérentes aux vecteurs viraux à savoir **(i)** limite de la taille du transgène vectorisé, **(ii)** difficulté de production, **(iii)** contrôle qualité difficile, **(iv)** coût élevé et **(v)** réaction immunitaire dirigée contre le vecteur. En revanche, elles présentent pour principal désavantage une efficacité de transfection limitée qui ne permet pas ou peu de modifier le tableau clinique. Dans le contexte d'une thérapie génique de la DMD, il est classiquement admis que le nombre de fibres positives au transgène thérapeutique (c'est-à-dire exprimant une dystrophine pleine longueur ou mini / micro-dystrophine) devrait être d'au moins 40% pour obtenir un bénéfice clinique significatif. De plus, l'expression de l'AN devrait être relativement homogène d'un muscle à l'autre dans l'ensemble du membre traité. A notre connaissance, de tels niveaux de transfection n'ont encore jamais été atteints dans un contexte thérapeutique dystrophique par une approche de thérapie génique non-virale.

Dans un contexte préclinique, l'administration HLV d'un plasmide comportant un gène rapporteur a permis d'atteindre 40% de fibres positives au transgène (lac Z) chez le rongeur et le primate mais ceci uniquement dans certains muscles (gastrocnemius notamment) (Wooddell et al. 2011; Hagstrom et al. 2004). Il en est de même après administrations HLV d'un transgène thérapeutique de type dystrophine pleine longueur chez la souris (Zhang et al. 2009). Augmenter l'efficacité du transfert de gènes par injection HLV pourrait donc être particulièrement pertinent. Le travail présenté dans ce manuscrit s'est attelé à la mise en œuvre de plusieurs pistes d'améliorations parmi celles listées dans la revue rédigée au cours de cette thèse « **Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations** ».

Préliminairement à ce travail, le protocole HLV réalisé au sein du laboratoire chez le rongeur a été affiné. Le but était de le rendre standardisé et de minimiser au maximum l'intervention chirurgicale chez la souris, animal modèle utilisé pour toutes les expériences *in vivo* présentées, tout en conservant une bonne efficacité de transfection.

Différentes pistes d'optimisations pour le franchissement du sarcolemme ont été explorées. Différentes formulations de vecteurs synthétiques ont été testées, comprenant notamment des CTAN. Les résultats obtenus figurent dans la section « résultats » sous-partie « HLV et franchissement du sarcolemme ».

Enfin, l'utilisation de plasmides comportant des DTS a été envisagée dans le but d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes par injection HLV à l'étape de translocation dans le noyau. Les résultats qui ont été obtenus sont présentés dans la section « résultats », sous-partie « Injection HLV et facilitation de l'import nucléaire par utilisation de DTS ».

Au total, le travail expérimental de cette thèse a conduit à réaliser près de 300 injections HLV et près de 2300 muscles ont été échantillonnés. Une liste non-exhaustive des pistes d'optimisations explorées est disponible en annexe (**annexes, figure 1**).

En outre, il faut signaler que les différents travaux effectués au cours de ces trois années de thèse ont aussi été rendus possibles grâce à des collaborations avec d'autres laboratoires partenaires. Je tiens donc ici à remercier le Professeur Patrick Midoux du CBM d'Orléans (France), le Professeur Philippe Guégan de l'IPCM (Université Paris Sorbonne) (France), le Professeur Paul-Alain Jaffrès de l'Université de Bretagne Occidentale (France) et le Professeur Ulrich Jonas de l'Université de Siegen (Allemagne) ainsi que leurs équipes.

III) Matériel et Méthodes

Cette section présente les principaux matériels (plasmides notamment) et méthodes utilisés au cours de ce travail de thèse.

1) Matériel

a) Plasmides et vecteurs

a.1 Cartes des plasmides

Différents plasmides ont été utilisés au cours de cette thèse.

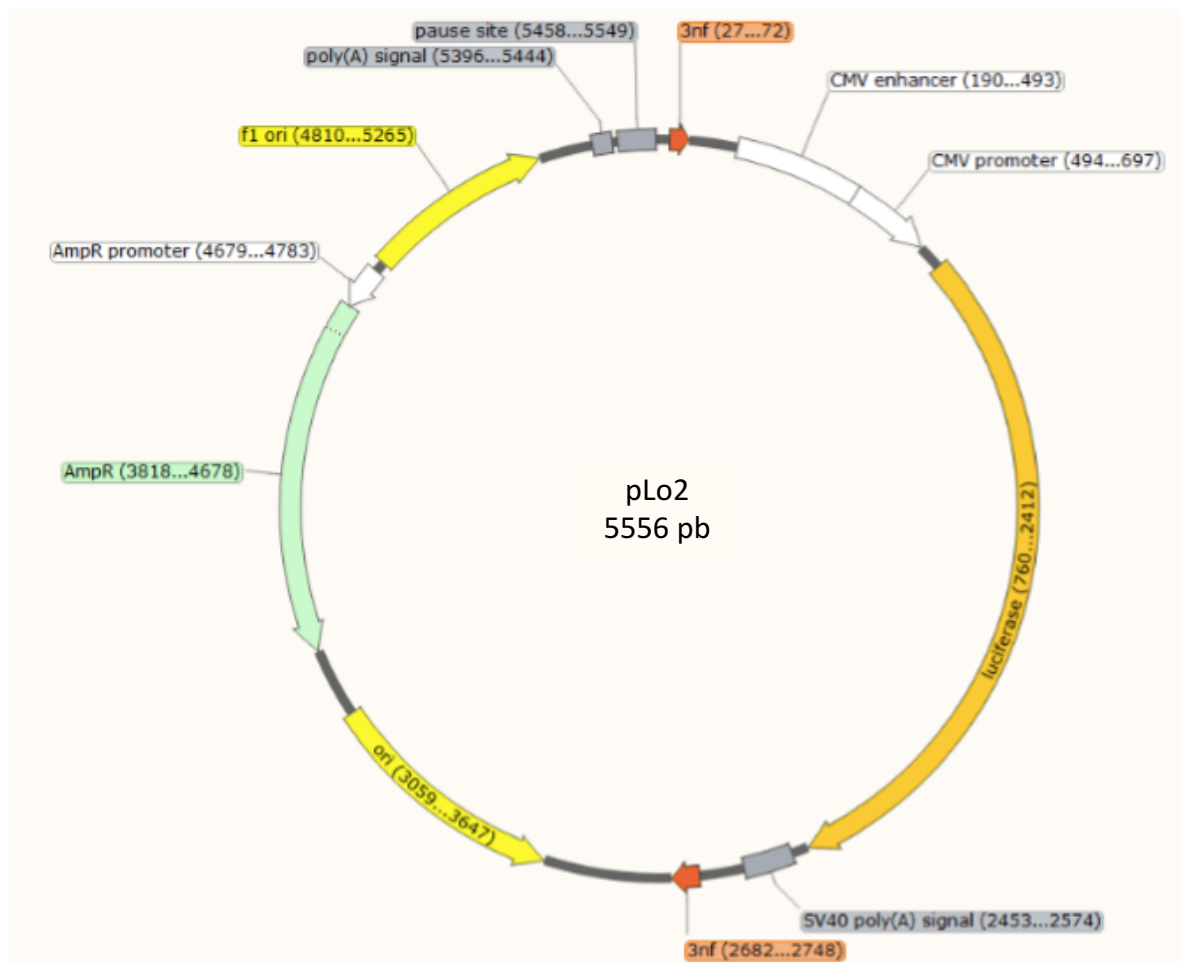


Figure 35 : Carte simplifiée du plasmide pLo2 (aussi appelé p(3NF₁-Luc-3NF₂)m).

Le plasmide pLo2 ou p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (**figure 35**), fourni par le Professeur Patrick Midoux (CBM, Orléans), comporte 5556 pb. Il possède un promoteur CMV contrôlant un gène rapporteur luciférase de luciole. De part et d'autre de celui-ci, se situent des motifs « 3NF »

son caractère optimisé, il a aussi permis de comparer dans des conditions optimales deux systèmes de garrot chez la souris dans le cadre d'injection hydrodynamique des membres inférieurs. Ce plasmide est amplifié à 34°C dans la souche *E. coli* GT115 (souche permettant la réplication du plasmide par la présence du gène Pir).

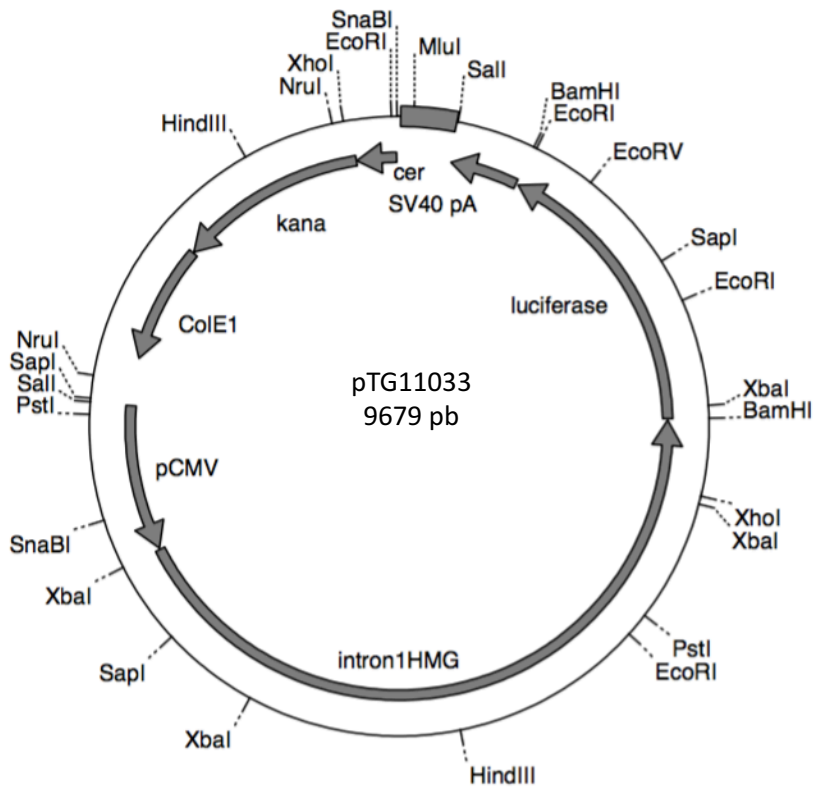


Figure 37 : Carte simplifiée du plasmide pTG11033.

Le plasmide pTG11033 (Transgene) (**figure 37**), fourni par le Docteur Serge Braun, est un plasmide de 9679 pb comprenant un gène rapporteur luciférase (Luc), sous contrôle du promoteur CMV. Le plasmide comporte un intron HMG-1, permettant d'augmenter le taux de synthèse de la luciférase par l'augmentation de l'export nucléaire de son ARNm. Ce plasmide, par sa taille plus proche d'un plasmide thérapeutique contenant un gène mini ou microdystrophine, a été utilisé pour évaluer l'efficacité de transfection de formulations contenant des blocs copolymères, en particulier *in vivo* par injection HLV, mais aussi par injection IM. Ce plasmide est amplifié dans la souche *E. coli* MG1665 à 37°C.

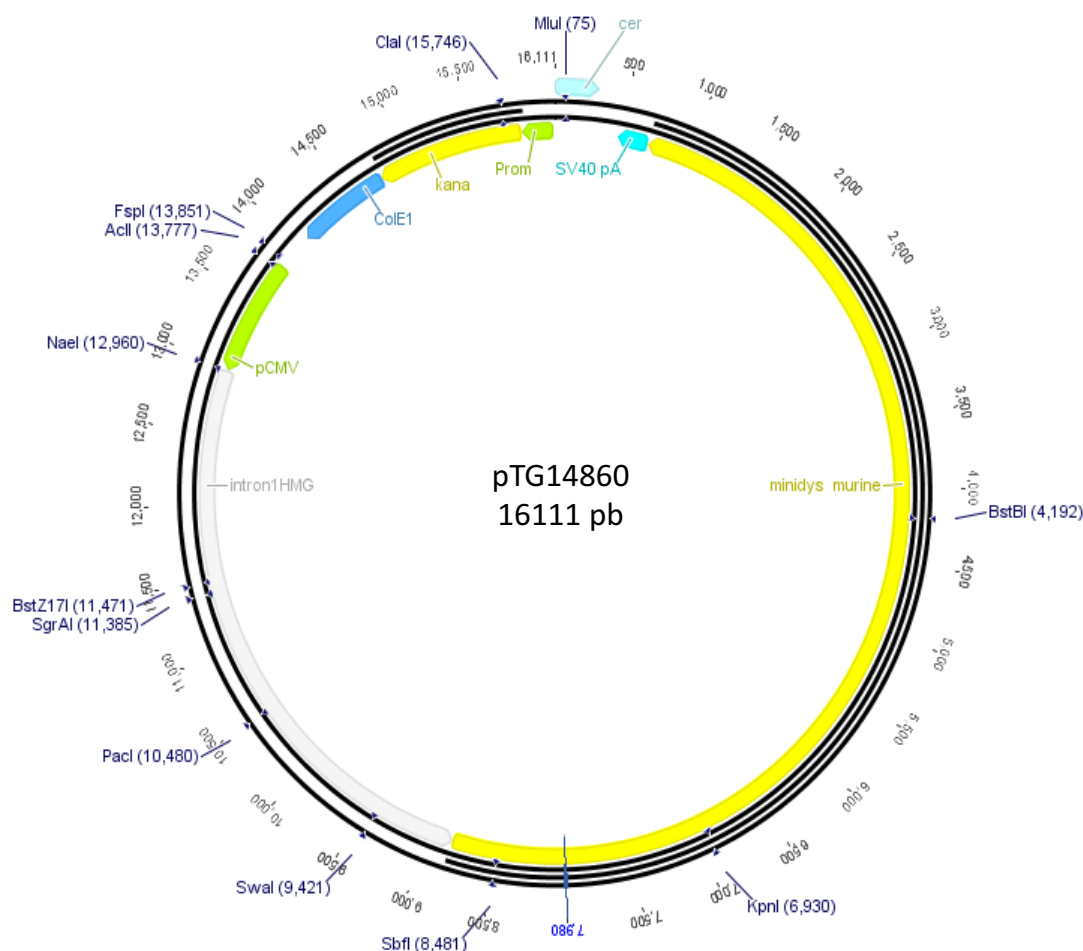


Figure 38 : Carte simplifiée du plasmide pTG14860.

Le plasmide pTG14860 (Trangene) (**figure 38**), fourni comme le PTG11033 par le Docteur Serge Braun, comporte 16111 pb. Ce plasmide possède une cassette d'expression codant une mini-dystrophine murine (minidys murine) sous contrôle du promoteur CMV. Il comporte comme le pTG11033 un intron HMG-1. Cet ADNp à visée thérapeutique a servi à l'évaluation de l'efficacité de transfection d'un CTAN original administré par injection HLV chez la souris *mdx*. Ce plasmide est amplifié dans la souche *E. coli* MG1665, à 37°C.

a.2 Amplification et purification

Afin d'amplifier les différents plasmides utilisés au cours de ce travail, des bactéries chimio-compétentes ont été transformées par choc thermique. L'équivalent de 5 ng de plasmide ont été incubés, selon le cas de 10 à 30 mn, sur glace en présence de 50 µL de bactéries compétentes. La mixture est ensuite plongée durant 30 sec dans un bain-marie 42°C avant d'être de nouveau incubée sur glace durant 2 mn. 250 µL de milieu SOC (Super Optimal Broth) sont ajoutés puis les bactéries sont mises dans un incubateur 1 h, 230 rpm. Par la suite, 100 µL de culture sont

étalés sur milieu LB agar sélectif (Les antibiotiques utilisés à ces fins sont, selon le plasmide amplifié, soit l'ampiciline soit la kanamycine).

L'amplification et la purification des plasmides d'intérêts ont ensuite été réalisées à l'aide du kit Nucleobond PC 10000 (Macherey-Nagel) suivant les instructions du fournisseur. Les puretés des lots produits ont été contrôlées par électrophorèse sur gel d'agarose et par utilisation du rapport A260 /A280. Seuls les lots ayant une valeur pour ce ratio comprise entre 1,8 et 2 ont été gardés et utilisés.

a.3 Vecteurs

Différents vecteurs ont été employés pour mener à bien les travaux présentés dans la section résultats. Pour les expériences de transfection *in vitro*, différents polymères cationiques ont été utilisés, à savoir la bPEI 25 kDa (**figure 39A**) ainsi que sa version histidinilée (greffage 16%).

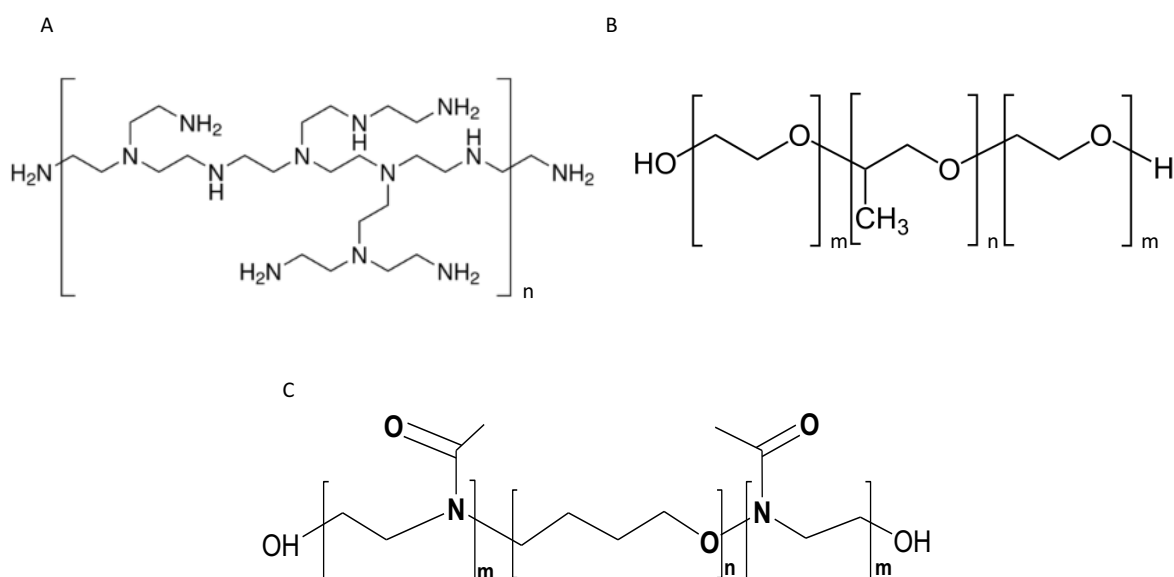


Figure 39 : Structures chimiques des principaux composés utilisés dans les expériences de ce manuscrit. Différents vecteurs ont été utilisés dans les expériences de ce manuscrit, tels que (A) la bPEI, (B) les poloxamères, avec $m=75$ et $n=30$ pour le poloxamère 188, $m=100$ et $n=65$ pour le poloxamère 407 et (C) le BR059.

Pour les injections HLV, plusieurs CTAN ont également servis dont les poloxamères 188 et 407 de structure générale PEO-PPO-PEO (**figure 39B**). Enfin, un CTAN original de structure pMeOXz– pTHF –pMeOXz, nommé BR059, a été testé (**Figure 39C**).

b) Lignées cellulaires et animaux

b.1 Lignées cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées dont des HeLa (cellules épithéliales d'adénocarcinome du col de l'utérus), des C2C12 (myoblastes de souris), des SK-MEL-28 (cellules issues de mélanome Humain) et des A549 (cellules épithéliales d'adénocarcinome alvéolaire). Ces cellules ont été cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 10% de sérum de veaux foetal décomplémenté, 1% d'antibiotiques (10 000 U mL⁻¹ Pénicilline, 10 000 µg mL⁻¹ Streptomycine), et supplémenté avec 1% de L-Glutamine. Les différentes lignées ont été maintenues sous atmosphère humide à 37°C, 5% CO₂. Des entretiens réguliers ont été effectués.

b.2 Animaux

Différentes souches de souris ont été utilisées pour mener à bien les différents travaux. Les injections IM ont été réalisées chez des souris Balb/c (Janvier) (protocole APAFIS 5198). Pour les administrations HLV de plasmides rapporteurs, des souris Swiss (Janvier) ont été utilisées (protocoles APAFIS 2125 et 6560). Pour les injections HLV utilisant le plasmide pTG14860, des souris *mdx* S/C57Bl/10ScSn-DmdMdX JAXSN 1801 mice (Charles River) ont été incluses dans les protocoles.

2) Méthodes

a) Transfection *in vitro*

a.1 Préparation et dépôt de polyplexes

Les solutions de polyplexes ont été préparées (la plupart du temps en HEPES 20 mM) par mélanges équimoléculaires de solution de vecteur / solution d'ADN. Cette étape a été suivie d'une incubation de 30 mn à t° ambiante. Les polyplexes formés ont ensuite été déposés à raison de 20 µL par puit traité.

a.2 Retard sur gel

Afin d'évaluer la complexation des ADNp utilisés par les vecteurs employés, 10 µL des différents mélanges vecteur/ADNp ont été migrés durant 15 mn à 100 V sur gel d'agarose 0,8% coloré au bromure d'éthidium. À la fin de cette migration le gel a été imagé sous UV grâce à un transilluminateur.

a.3 Lyse cellulaire

En règle générale, les cellules ont été lysées 24 h après transfection afin de déterminer et de comparer l'efficacité des différents traitements appliqués. Pour ce faire, le milieu de culture a été délicatement retiré des puits avant d'être remplacé par 75 µL de Passive Lysis Buffer (PLB) 0,5x (Promega). Un cycle congélation/décongélation a ensuite été réalisé.

a.4 Dosage de l'activité luciférase

L'activité luciférase a été mesurée pour les différents traitements sur 25 µL de lysat cellulaire grâce au kit Luciferase Assay System (Promega). Pour chaque réaction, 20 µL de substrats ont été déposés à l'aide d'un automate (Mithras2, Berthold).

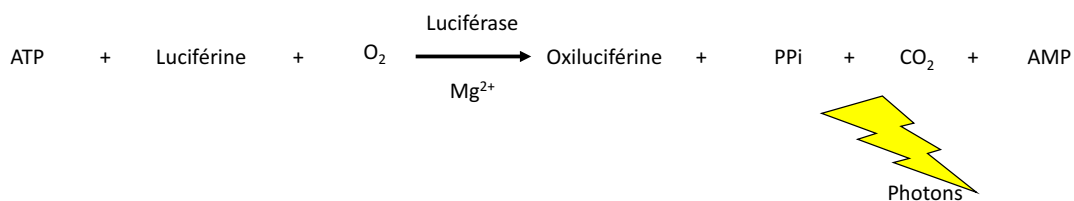


Figure 40 : Schéma illustrant la réaction chimique permettant l'évaluation de l'activité luciférase avec le kit Luciferase Assay System (Promega).

Ce test repose sur la catalyse de l'oxydation de la luciférine par la luciférase (**figure 40**). La réaction produite résulte en une émission de photon proportionnelle à la quantité de luciférase présente dans le lysat. Ceci permet une estimation indirecte, de l'efficacité de transfection du vecteur utilisé, par mesure du signal de luminescence émis. Ce dernier est exprimé en Relative Light Unit (RLU).

a.5 Dosage des protéines

Afin de normaliser l'expression de la luciférase exprimée en RLU, un dosage des protéines totales de chaque échantillon a été effectué. Les résultats de luminescence précédemment obtenus sont alors exprimés en RLU/mg de protéines. La quantité de protéines est mesurée sur 25 µL de lysat cellulaire grâce au kit BCA protein assay reagent (Interchim) et à une lecture de densité optique (DO) à 540 nm (spectrophotomètre ELx808TM, BioTek Instruments).

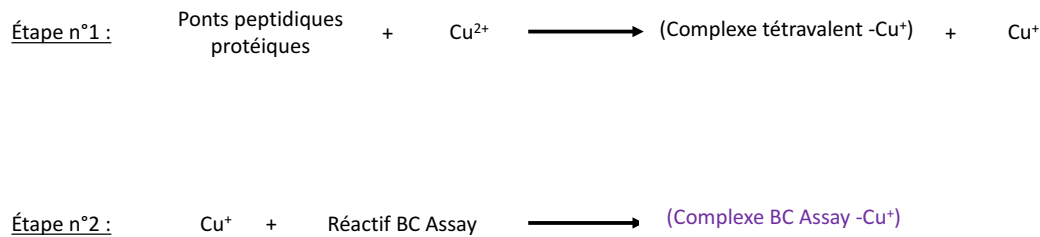


Figure 41 : Réactions chimiques permettant l'évaluation de la quantité de protéines par échantillon avec le kit BCA protein assay reagent (Interchim).

Il s'agit d'un dosage de protéines par méthode photométrique à l'acide bicinchonique (**figure 41**). Ce test est basé sur le pouvoir réducteur des protéines en milieu alcalin et permet la conversion des ions cuivre II en ions cuivre I. Ces derniers forment alors des complexes de couleur pourpre avec l'acide bicinchonique. 200 µL de réactif reconstitué sont ajoutés par réaction suivi d'une incubation à l'obscurité à 37°C durant 30 mn. Afin de quantifier la quantité de protéines présente dans chaque échantillon, une gamme étalon d'albumine de bovin a été réalisée.

a.6 Détermination de la viabilité cellulaire

La détermination des viabilités cellulaires suite aux différents traitements étudiés a été effectuée grâce au kit VialightTM (Lonza). Les mesures ont été réalisées, pour chaque échantillon, sur 25 µL de lysat cellulaire auxquels ont été ajoutés 50 µL de réactif à 0.5x. Les échantillons ont par la suite été incubés à l'obscurité durant 2 mn à 25°C au sein de l'automate Mithras2 (Berthold). Lors de ce test, la luminescence émise reflète la quantité d'ATP présente dans les différents lysats cellulaires. Afin d'établir un pourcentage de viabilité, les résultats obtenus pour les échantillons traités ont été comparés avec ceux obtenus pour des échantillons témoins non-traités (cellules seules).

Ainsi la phase de test *in vitro* a pour principal objectif d'évaluer l'efficacité de transfection et la cytotoxicité des composés.

b) Transfection *in vivo*

Afin de pouvoir mener à bien les procédures décrites dans cette section, des formations en expérimentations animales ont été nécessaires. Ces formations ont permis d'effectuer légalement les différents protocoles tout en respectant la règle des 3R (Réduire, Raffiner et Remplacer). Ainsi, la première formation ayant été suivie est le niveau de conception et de réalisation en expérimentation animale (module rongeurs et lagomorphes) qui s'est déroulée en septembre 2016 à l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort (ENVA) (**annexes, figure 2**). La seconde formation ayant été validée est le module de chirurgie expérimentale dispensé par l'École Nationale Vétérinaire de Nantes (ONIRIS) en mars 2018 (**annexes, figure 3**).

b.1 Préparation des solutions d'injection

Les solutions d'injection ont été préparées sous hotte à flux laminaire, afin notamment de s'assurer d'un certain niveau de stérilité. Les solvants de préparation ont été soit du NaCl 0,9% soit du Tyrode (Alimi-Guez et al. 2009). De manière générale :

- Pour les mélanges utilisant des polymères cationiques, les solutions d'injection ont été obtenues en mélangeant de manière équivolométrique le vecteur dilué en NaCl 0,9% avec de l'ADNp dilué dans le même solvant.
- Pour les solutions de copolymères:ADNp, le vecteur est dilué en H₂O stérile (Versylene Fresenius) puis mélangé de manière équivolométrique avec l'ADNp en Tyrode 2x.

Les mélanges ont tous été incubés 30 mn à t° ambiante.

b.2 Injections intramusculaires

Les souris ont été anesthésiées avec un mélange air / isoflurane. Les animaux sont tondu au niveau du site d'injection (correspondant au tibialis antérieur) afin de mieux le repérer. La patte est maintenue en position de légère extension de sorte à étirer le muscle de la zone d'intérêt. Les injections sont réalisées à l'aide de seringue à insuline. L'aiguille est introduite au niveau du tibialis antérieur, de manière parallèle aux fibres musculaires, puis 50 µL de solution sont

rapidement administrés (environ 3 sec par injection). L'aiguille est ensuite délicatement retirée du point d'injection.

b.3 Injections HLV

Les souris sont d'abord pesées, puis anesthésiées à l'aide d'un mélange de kétamine/xylazine (respectivement 100 et 10 mg/kg pc) injecté par voie intrapéritonéale (IP). Les membres à traiter (ici les membres postérieurs) sont tondués. Un garrot est ensuite placé à l'extrémité proximale. Une incision de 0,5 cm est réalisée au niveau du site d'injection (sous le genou de l'animal) afin de découvrir la grande veine saphène. Le volume de solution injectée est calculé grâce à la formule suivante : $1 + ((\text{poids corporel (en gramme)} - 25)/25 * \frac{1}{2})$. Ce volume correspond, chez la souris, à environ 1 mL de solution par patte traitée.

Les injections se déroulent sous lampe infrarouge afin de maintenir la température des animaux à 37°C. Le geste est ici réalisé sous loupe binoculaire. La solution est administrée à l'aide d'un pousse seringue Harvard PHD 2000 (Harvard Apparatus) à un débit de 6,290 mL/mn au niveau de la grande veine saphène. L'aiguille servant à l'injection est retirée de la veine 20 sec post-injection, le garrot est ensuite levé 1 mn post-administration.

b.4 Bioluminescence in vivo

De manière générale, pour effectuer une cinétique de l'expression du transgène luciférase au niveau des membres injectés par HLV, l'imagerie de bioluminescence (BLI) *in vivo* a été utilisée. Les animaux imagés ont reçu 200 µL de luciférine en IP, soit environ 0,16/kg pc (à 20 mg/mL en tampon Hepes 20 mM ; Luciferins, FluoProbes®, Interchim). Les souris ont ensuite été anesthésiées à l'aide d'un mélange air / isoflurane (4% à l'induction puis 2% pour le maintien de la narcose) puis placées en chambre d'acquisition. La mesure de l'émission de photons est réalisée par le Nightowl II (**figure 42A**) (Berthold Technologies) à l'aide d'une caméra CDD refroidie à -70°C. Les images obtenues ont été traitées par le logiciel Winlight du constructeur.

La BLI est une méthode utile de manière générale car elle permet de suivre l'expression d'un gène rapporteur de manière longitudinale (et ainsi, de diminuer le nombre d'animaux par protocole). Cependant cette dernière est sujette à certaines variations, notamment liées à la position de l'animal lors de l'acquisition d'images.

Pour l'évaluation plus fine de l'efficacité de transfection de certains composés par injection HLV (les poloxamères 188 et 407), des quantifications des aires couvertes par les signaux de bioluminescence ont été réalisées. Un protocole d'imagerie ayant pour but de limiter les variations liées **(i)** à la position des souris, **(ii)** au protocole d'anesthésie et **(iii)** à la cinétique de la consommation de la luciférine, a été mis au point au cours de ma thèse.

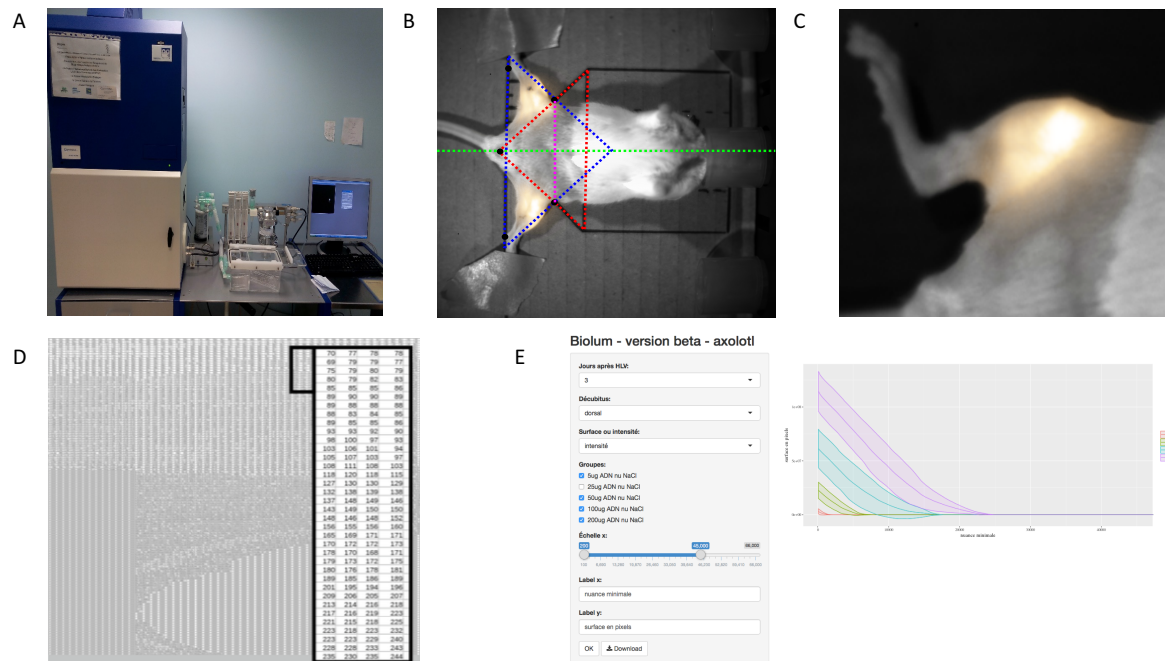


Figure 42 : Les matériels et étapes du protocole de bioluminescence *in vivo* normalisé. L'acquisition d'image de bioluminescence *in vivo* est réalisée grâce à (A) un appareil de bioluminescence *in vivo* (sur cette image, celui utilisé au laboratoire). (B) La position des souris imagées est standardisée à l'aide d'un gabarit. (C) Le signal de bioluminescence est localisé au niveau des pattes traitées. (D) Celui-ci est transformé en matrice attribuant une valeur à chaque pixel de l'image captée. Chaque valeur correspond à une intensité de luminescence. (E) Les résultats sont analysés de manière semi-automatisée par un logiciel « maison », transcrivant les résultats en surface de signaux de luminescence par intensité lumineuse.

Pour chaque animal, la procédure de BLI se déroule alors de la manière suivante :

- 2 mn post-injection de luciférine par IP, une anesthésie est induite avec un mélange air / isoflurane 4%.
- 4 mn post-injection de luciférine, la souris à imager est placée sur un gabarit standardisé **(figure 42B)**. La narcose est alors maintenue par un mélange air / isoflurane 2%.
- 6 mn 20 post-injection de luciférine, une acquisition de BLI est lancée (2x30 sec 2x2b, format une souris) **(figure 42B et C)**.
- Une photo de l'animal imagé est alors prise avec un temps d'exposition de 100 ms.
- L'animal est ensuite placé en décubitus ventral.

- 10 mn post-injection de luciférine, une seconde acquisition de BLI est lancée (2x30 sec 2x2b, format une souris).
- Une photo de l'animal imagé est à nouveau prise. La narcose est ensuite stoppée.

Un logiciel permettant le traitement et l'évaluation des images générées, de manière semi-automatisée, a aussi été créé (**figure 42D et E**). Ce travail fera prochainement l'objet d'un article original.

b.5 Sacrifices et prélèvements

Les souris ont généralement été sacrifiées sept jours post-injection HLV par élongation cervicale. 8 muscles, ou groupe de muscles, de chaque membre traité sont récupérés. Les échantillons sont les suivants : tibialis antérieur, extensor digitorum longus (EDL), gastrocnemius, plantaris, soleus, quadriceps, ischio jambier et muscles postérieurs de la cuisse. Après récupération, les muscles sont refroidis en azote liquide avant d'être conservés à -80°C pour analyse ultérieure.

b.6 Dosage de l'activité luciférase ex vivo

Pour évaluer l'efficacité de transfection *ex vivo*, suite à l'administration de plasmide codant la luciférase, chaque échantillon a été pesé à l'aide d'une balance de précision avant d'être placé dans 1 mL de PLB 0,5x (Promega). Les muscles sont ensuite broyés à l'aide du MPfastprep24 (MP Biomedicals) (3 cycles de broyages espacés d'une minute chaque, minute pendant laquelle les échantillons sont refroidis à 4°C). Les échantillons sont ensuite centrifugés à 2000 g, 10 mn à 4°C. Les surnageants obtenus sont récupérés et stockés à -20°C pour subir un cycle congélation/décongélation. Les différents surnageants sont placés, à raison de 25 µL chaque, en plaque 96 puits blanche puis l'activité luciférase a été dosée grâce au kit Luciferase Assay System (Promega). Le principe est ici le même que pour le dosage de l'activité luciférase sur lysat cellulaire. Les RLU obtenues ici ont cependant été normalisées par rapport au poids en mg des muscles analysés.

b.7 Immunohistochimie

Après injection HLV du plasmide pTG14860 (codant une mini-dystrophine murine) chez les souris *mdx*, un comptage des fibres musculaires positives au transgène a été réalisé par immunohistochimie (Docteur Thibaut Larcher, Plateforme APEX, Nantes). Ceci a permis de mesurer les efficacités de transfections de différents traitements appliqués. Pour ce faire, les différents muscles prélevés ont été mis en colle O.C.T (Optimal Cutting Temperature). Différentes sections transversales ont été traitées avec les anticorps DYS1 (spécifique des exons 25 à 28 de la dystrophine) et DYS2 (spécifique de l'exon 79, codant le domaine C-terminal de la dystrophine, et dans ce contexte expérimental spécifique de la mini-dystrophine) (Laboratoire Novocastra).

IV) Résultats

1) Affinement du protocole HLV chez la souris

Afin de réduire les potentielles variations d'une série d'injection HLV à l'autre ainsi que l'impact du geste chirurgical chez la souris, des ajustements du protocole initial ont été réalisés. Étant donné la taille des animaux utilisés, la procédure HLV dans ce cadre a lieu sous loupe binoculaire et nécessite donc une certaine dextérité.

a) Standardisation de l'incision chez la souris Swiss

Pour pratiquer l'injection hydrodynamique chez le petit rongeur (souris Swiss), il est nécessaire d'effectuer une incision afin de découvrir la veine saphène au site d'injection. Nous avons décidé d'en réduire au maximum la taille, soit à 0,5 cm. Son emplacement a également été standardisé (**figure 43**), soit le long de la saphène (repérée par transparence après passage d'un papier imbibé d'éthanol) en remontant du côté proximal (**voir figure 1 de la revue « Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations »**).

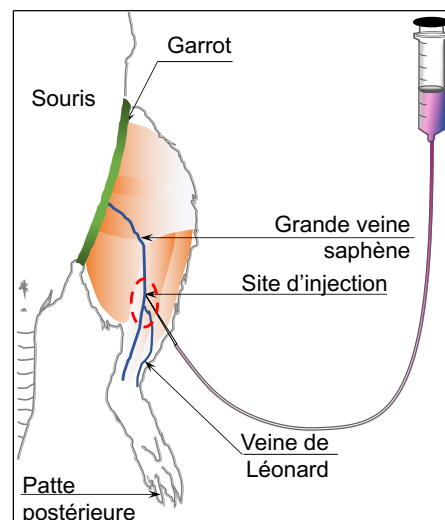


Figure 43 : Site d'injection standardisé pour l'injection hydrodynamique via la veine saphène chez la souris. Pour les injections HLV telles que pratiquées au sein du laboratoire, le site d'injection a été standardisé. La zone d'incision est entourée en ligne pointillée rouge et permet de découvrir la veine saphène au niveau de son embranchement avec la veine de Léonard. L'aiguille permettant de délivrer la solution d'injection est introduite juste au dessus de celui-ci.

Ceci a présenté pour intérêt de permettre un gonflement du membre répétable d'un animal à un autre, permettant d'améliorer la reproductibilité et le pouvoir discriminant entre traitements comparés. En outre, le nombre de points de sutures à pratiquer peut ainsi se limiter à un et les suites post-opératoires pour l'animal peuvent être imaginées comme mieux tolérées. Cette mesure est en parfait accord avec la règle dite des 3R en expérimentation animale.

b) Comparaison de deux systèmes de garrot

Afin de raffiner au mieux le protocole chez la souris, deux types de garrots ont également été testés. Le but de cette expérience était de choisir un système de garrot facile à manipuler, à placer et facilement reproductible sans impacter sur l'efficacité de l'injection HLV.

Le premier système de garrot est réalisé à l'aide d'un lacet de 2 mm de diamètre. Celui-ci n'ayant aucune élasticité à l'avantage de ne pas se distendre au fur et à mesure des utilisations. Un nœud coulant est effectué puis placé au niveau de l'extrémité proximale du membre à traiter. Le garrot est serré puis maintenu à l'aide d'une pince hémostatique.

Le second système est conçu à l'aide de doigts de gant en latex. Pour ce faire, deux portions de doigts de gant sont entrelacées (un morceau de majeur et un morceau d'index). Ce garrot est glissé jusqu'à l'extrémité proximale du membre à transférer, puis serré. Le système est maintenu sous tension grâce à une pince hémostatique.

Afin de se placer dans des conditions expérimentales optimales du point de vue du plasmide administré, le plasmide optimisé, codant la luciférase, pGM144, a été utilisé. Les injections ont été faites en NaCl 0,9% à raison de 0.5 µg d'ADNp / mL de solution délivrée. Le volume injecté par membre était d'environ 1 mL et a été ajusté selon la formule figurant dans la section « injections HLV » du matériel et méthodes. Le reste de la procédure a d'ailleurs été réalisé suivant les paramètres indiqués dans ladite section et a été effectuée chez la souris Swiss. Les animaux ont été sacrifiés sept jours après injection. Les muscles des membres ont été prélevés et analysés selon la section matériel et méthodes.

Durant la semaine suivant l'injection, les animaux ont été observés afin d'évaluer leur démarche. Aucune différence significative n'a pu être objectivée entre le groupe de souris injecté avec le système « lacet » et « doigts de gant », quel que soit le temps après injection.

Sept jours après administration, les mesures de l'activité luciférase *ex vivo* sur broyats de muscles ont fourni les résultats suivants :

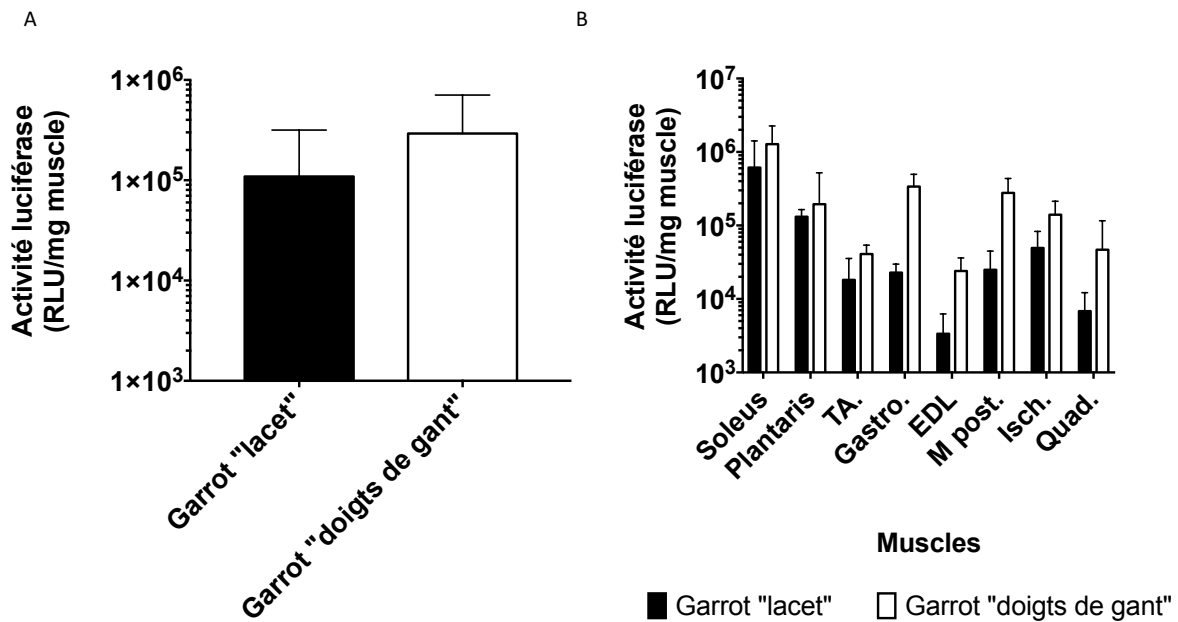


Figure 44 : Injection HLV et systèmes de garrot. Les moyennes des signaux de luminescence pour chaque groupe sont représentées en (A). Les moyennes des signaux de luminescence pour chaque muscle récupéré sont représentées en (B). Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs de luminescence +/- SD en Relative Light Unit par mg de muscle (RLU/mg muscle) avec pour le groupe « lacet » n (nombre de patte traitée) = 3 et pour le groupe « doigts de gant » n= 4. TA, tibialis antérieur ; Gastro, gastrocnemius ; M post, muscles postérieurs ; Isch, ischio-jambiers ; Quad, quadriceps.

Les signaux de luminescence selon les deux types de garrots ne sont pas statistiquement significativement différents. Cependant, une tendance en faveur du groupe « doigts de gant » est constatée (**Figure 44A**). En détaillant le signal de luminescence par muscle analysé, le même phénomène est observé quel que soit le muscle analysé. Cependant, ces résultats sont à nouveau non statistiquement significatifs (**Figure 44B**).

Ces résultats ne sont finalement pas tellement surprenants. L'administration HLV est une méthode décrite comme étant, dans une certaine mesure, peu sensible à la pression exercée par le garrot (Hegge et al. 2010).

La récupération des animaux après procédure HLV étant similaire pour les deux types de garrots, et les efficacités du transfert de gènes étant en faveur du groupe « doigts de gant »,

ce système de garrot a été conservé. Celui-ci s'avère de plus pratique car son placement et son serrage sont relativement faciles à standardiser.

En conclusion, le protocole d'injection HLV chez la souris, employé au sein de notre laboratoire, a été peu à peu affiné. Notre procédure a été standardisée autant que possible en déterminant une taille d'incision précise, standard et réduite. Deux systèmes de garrots ont de plus été comparés. Le système « doigts de gant », facilement reproductible, a été conservé. Il permet de plus, une efficacité de transfection par injection HLV, légèrement meilleure par rapport à celle obtenue avec le système « lacet ».

2) Injection HLV et franchissement du sarcolemme

La première étape du transfert de gènes à laquelle ce travail de thèse s'est intéressé est celle du franchissement du sarcolemme (**voir revue : « Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations »**). À cette fin, la combinaison de l'injection HLV avec des vecteurs non-viraux a été évaluée. Dans ce cadre, différentes classes de composés ont pu être testées.

a) Utilisation de vecteurs cationiques

Les vecteurs cationiques se sont révélés être de bons agents transfectant dans des contextes *in vitro* mais aussi *in vivo* (par aérosol notamment) en permettant un franchissement de la membrane plasmique des cellules ciblées (Bouraoui, Ghanem, et al. 2019; Bouraoui, Berchel, et al. 2019). Durant ce travail de thèse, différents lipides cationiques originaux synthétisés par l'équipe du Professeur Paul-Alain Jaffrès (UMR CNRS 6521, Brest) ont été testés sur plusieurs lignées cellulaires, dont des myoblastes de souris (lignée C2C12). Les résultats obtenus ont donné lieu à la publication : **« Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery »**.

Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery

Authors section: Bouraoui A¹, Ghanem R², Berchel M¹, Vié V³, Le Guen Y², Paboeuf G³, Deschamps L¹, Le Gall T², Montier T², Jaffrès PA¹

¹ Univ Brest, CNRS, CEMCA, UMR CNRS 6521, 6 Avenue Victor Le Gorgeu, F-29238, Brest, France.

² Univ Brest, INSERM UMR 1078, IBSAM, UFR Médecine et Sciences de la Santé, CHRU Brest, 22 avenue Camille Desmoulins, F-29238, Brest, France.

³ Univ Rennes, CNRS, IPR - UMR 6251, ScanMAT - UMS 2001, F-35000, Rennes, France.

Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery

Amal Bouraoui,^[a] Rosy Ghanem,^[b] Mathieu Berchel,^[a] Véronique Vié,^[c] Yann Le Guen,^[b] Gilles Paboeuf,^[c] Laure Deschamps,^[a] Tony Le Gall,^[b] Tristan Montier,^[b] and Paul-Alain Jaffrès*^[a]

Cationic amphiphiles featuring two thioether functions in each lipid chain of bicatenar cationic amphiphiles are reported here for the first time. The physicochemical properties and transfection abilities of these new amphiphiles were compared with those of already reported analogues featuring either (i) saturated, (ii) unsaturated or (iii) mono-thioether containing lipid chains. The homogeneity of the series of new compounds allowed to clearly underscore the effect of bis-thioether

containing lipid chains. This study shows that besides previous strategies based on unsaturation or ramification, the incorporation of two thioether functions per lipid chain constitutes an original complementary alternative to tune the supramolecular properties of amphiphilic compounds. The potential of this strategy was evaluated in the context of gene delivery and report that two cationic amphiphiles (i.e. **4a** and **4b**) can be proposed as new efficient transfection reagents.

1. Introduction

Non-polymeric amphiphilic compounds are molecules constituted by a polar head group covalently attached to one (monocatenar) or several (poly-catenar) hydrophobic chains. There exist many classes of amphiphiles including natural derivatives (e.g. phospholipids, sphingolipids, fatty acids)^[1] or synthetic compounds (e.g. bio-inspired phospholipids,^[2] Bola lipids,^[3] gemini^[4]). These amphiphiles were used for a multitude of applications including the extraction and stabilization of proteins,^[5] the stabilization of interfaces (e.g. coaservates^[6]), the design of nano-reactors,^[7] the production of vesicles^[8] and the production of carriers for nucleic acids delivery;^[9] others were designed for their own pharmaceutical properties (e.g. bactericidal agents,^[10] modulation of ion channels activities,^[11] anticancer properties^[12]). Whatever the application, the physico-chemical properties of the amphiphiles must be finely tuned to optimize their potential. To this regards, it must be noticing that the structure of the hydrophobic domain has a dramatic effect on the supramolecular properties of the amphiphilic compounds. As an illustration, the number of lipid chains and their length deeply impact the Critical Micellar Concentration (CMC) and the shape of the amphiphiles can impact the structure of the assemblies (e.g. lamellar *versus* hexagonal).

For nucleic acids delivery, cationic amphiphiles^[2,13,14] were evaluated for different purposes (lung transfection,^[15,16] tendon healing,^[17] cancer therapy,^[18] anticancer vaccination)^[19–21] and the current developments offer new therapeutic perspectives. It must be emphasized that one of the interests of synthetic vectors, when compared to viral vectors, is that they can be produced on large scale and following simple purification processes. To improve the efficacies of cationic amphiphiles for nucleic acids delivery, modifications of the structure of both the polar head group (e.g. nature of the cationic charge^[22] polycationic moieties^[23,24]) and the hydrophobic domain were explored.^[25] In the last case, it was shown that cationic amphiphiles containing saturated lipid chains produced poorly effective pDNA carriers.^[26,27] This is likely explained by the fact that the lipoplexes (association of cationic amphiphiles with nucleic acids), generally enter into cells by endocytosis pathway.^[28] Subsequently, nucleic acid must escape from endosomes to avoid degradation. This process is likely facilitated by lipid mixing between the cationic amphiphiles and the lipids of the endosomal membrane.^[29] Therefore, the introduction of some upset within the lipid chains should produce less tight supramolecular packing favoring better lipid mixing. A first strategy to disturb the packing of the lipid chains consists to use unsaturated lipid chains. For that purpose, oleyl chains (C18:1) that possess one unsaturation with a Z configuration are widely employed.^[30] As a second strategy, naturally available branched (e.g. phytanyl chains)^[26,31,32] or synthetically prepared ramified (e.g. through thiol-ene click chemistry) lipid chains can be used.^[33] The presence of lateral moieties decreases the strength of the packing^[34–36] but can also affect the supramolecular organization (e.g. production of inverted hexagonal phase).^[33] Beside these two strategies (unsaturation and ramification), the incorporation of poly-unsaturated lipid chains in the structure of cationic amphiphiles was also investigated. These various derivatives were used for pDNA^[16,37,38] or siRNA delivery (the first formulation used for

[a] A. Bouraoui, Dr. M. Berchel, Dr. L. Deschamps, Prof. Dr. P.-A. Jaffrès
Univ Brest, CNRS, CEMCA, UMR CNRS 6521, 6 Avenue Victor Le Gorgeu, F-29238 Brest, France
E-mail: pjaffres@univ-brest.fr

[b] R. Ghanem, Y. Le Guen, Dr. T. Le Gall, Prof. Dr. T. Montier
Univ Brest, INSERM UMR 1078, IBSAM, UFR Médecine et Sciences de la Santé, CHRU Brest, 22 avenue Camille Desmoulins, F-29238 Brest, France

[c] Dr. V. Vié, G. Paboeuf
Univ Rennes, CNRS, IPR - UMR 6251, ScanMAT - UMS 2001, F-35000 Rennes, France

Supporting information for this article is available on the WWW under <https://doi.org/10.1002/cphc.201900626>

siRNA delivery was recently approved by the FDA for hereditary transthyretin-mediated hATTR amyloidosis).^[39,40] It must be however noticed that polyunsaturated lipid chains can be unstable due to their sensitivity to oxidation. Very recently, we investigated an alternative to the use of unsaturation or ramification to modulate the supramolecular packing of cationic amphiphiles. For that purpose, we constructed new lipid chains featuring one thioether function within a linear saturated hydrophobic chain.^[41] We demonstrated that the presence of one thioether function did not modify the amphiphilic nature of the molecules but affected their physico-chemical properties (e.g. fluidity and molecular surface area); efficient gene carriers could thus be obtained depending on the position of the thioether function within the lipid chain. These results echo other studies showing that the incorporation of a thioether functional group affected the temperature of fusion of ionic liquids^[42] or the temperature of transition (T_m) of bolaamphiphiles.^[43] In the current work, we further investigate the use of thioether function to prepare cationic amphiphiles featuring two such functions in each hydrophobic chain of bicatenar amphiphiles. The first goal of this study was to propose a simple synthesis procedure to prepare lipid chains incorporating two thioether functions and then to incorporate these new lipid chains in the structure of cationic amphiphiles. The second goal consisted to evaluate the different physico-chemical behavior of the new cationic amphiphiles when compared to similar amphiphiles (identical polar head groups) but possessing either saturated or mono-unsaturated lipid chains or lipid chain containing a single thioether function. The third goal consisted to evaluate the transfection efficacies and the cytotoxicity of the new cationic amphiphiles. We also compared their transfection efficacies to the other benchmark (commercial or from our laboratory i.e. "Brest Synthetic Vectors") compounds. To reach these goals, the new cationic amphiphiles (compounds **4a-c**; Figure 1) were systematically compared to compound BSV-S12 (which is an efficient vector for gene delivery and that features one thioether function per lipid chain)^[41] and the reference

compounds **BSV36** (incorporating oleyl lipid chains) and **BSV101** (featuring stearyl lipid chains). It is worth noticing that all these compounds possess a closely related chemical structures; they all possess the same polar headgroup (trimethylammonium) and spacer (phosphoramidate) varying only according to the number and position of thioether functions within lipid chains of exactly the same length (incorporating 18 atoms in its backbone). These structural similarities are helpful to draw conclusions on the impact of the molecular structural variations (presence of two thioether functions and their location in the hydrophobic chains).

2. Results and Discussion

The reaction of alkylthiol with a mono-substituted alkene (terminal alkene) in presence of UV light and with a radical initiator (photo-click reaction) is a regio-selective reaction that produces the linear compound possessing one thioether function.^[44,45] This reaction is very efficient and was applied for the synthesis of polymers^[46] or dendrimers.^[47] With the aim to incorporate two thioether functions within the hydrophobic chains of cationic amphiphiles, we investigated their construction by applying a double thiol-ene reaction that involved one ω -alkyl-dithiol and two compounds possessing each a terminal alkene. One of these alkenes possesses one alcohol function in terminal position (Scheme 1) whereas the second alkene is non-functionalized. The thiol-ene reaction was achieved in presence of DMPA (2,2-Dimethoxy-2-phenylacetophenone) in presence of UV light (365 nm) for 18 hours without solvent. We anticipated that this reaction produced three products (statistical reaction): one functionalized with two alcohol functions (side products **Aa-c**), the desired products (**1a-c**) possessing one alcohol function and the second side product **Ba-c** that is devoid of any alcohol function. Thanks to their different polarity, these compounds were separated by chromatography to produce compounds **1a-c** (Scheme 1) in correct yields (45 to 53%) and reasonable amounts (1.2 to 1.5 g per synthesis). It must be noted that the stoichiometry of the reaction was optimized. We observed that the use 1/1/1 stoichiometry (alkene/dithiol/alkenol) did not produce the best yields (10%) likely because the alkenes (pentene and hexene) are volatile. In consequence, we increased the quantity of alkene up to 4 equivalents (4/1/2 stoichiometry respectively for alkene/dithiol/alkenol) to obtain better yields (43–53%).

Then, we engaged the alcohols **1a-c** in a transesterification with diphenylphosphite (reaction without solvent in a kugelrohr apparatus following a method previously employed)^[48] that produced the phosphites **2a-c** in quantitative yields. The incorporation of the polar head group was then achieved following a two synthesis steps. First, an Atherton-Todd reaction^[49] with *N,N*-dimethylethylenediamine produced the phosphoramides **3a-c** in 62 to 72% yields. In the last step, the more nucleophilic nitrogen atom was alkylated with iodomethane to produce the cationic amphiphiles **4a-c** in good yields (95 to 98%). Altogether, the new cationic amphiphiles were obtained in four steps with a global yield ranging from 27 to 35% (synthesis protocols and characterization available in Supporting Information S11 and S12).

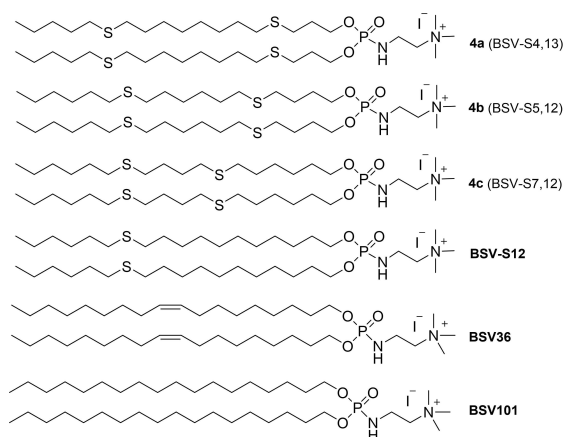
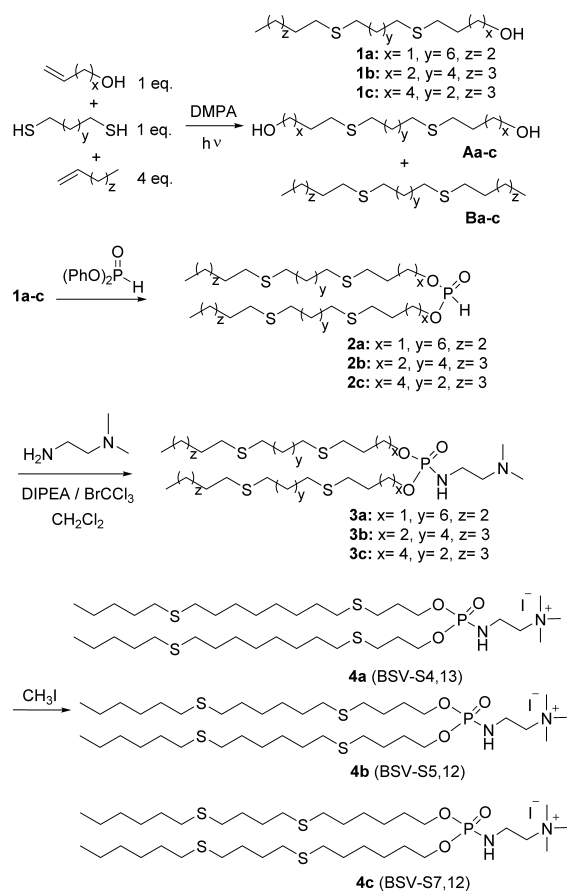


Figure 1. Chemical structure of the new cationic amphiphiles possessing two thioether functions per lipid chain (**4a-c**) and the reference structure **BSV-S12** (one thioether function per lipid chain), **BSV36** (oleyl chains) and **BSV101** (stearyl chains).²



Scheme 1. Synthesis of the new cationic amphiphiles **4a-c**.

The Critical Aggregation Concentration (CAC) of the cationic amphiphiles **4a-c** were determined by using Nile red as fluorescent probe that is sensible to the hydrophobic environment. By this method, we concluded that all the cationic amphiphilic compounds **4a-c** feature a CAC below $2.0 \cdot 10^{-5}$ M (supporting information S13). The new cationic amphiphiles **4a-c** were formulated as liposomal solutions by hydration of a lipid film. After a hydration period of 18 h at 4°C , the solutions were sonicated (30 min.) thus producing homogeneous solutions that were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) and zeta potential measurements (Table 1 and S14). We have

	Size [nm]	Pdl	Zeta [mV]
4a (BSV-S4,13)	89.3 ± 2.1	0.34	$+69 \pm 3$
4b (BSV-S5,12)	83.5 ± 1.7	0.28	$+44 \pm 2$
4c (BSV-S7,12)	82.1 ± 3.8	0.38	$+71 \pm 4$
BSV-S12	94.0 ± 1.6	0.34	$+69 \pm 1$
BSV36	200.3 ± 4.5	0.35	$+48 \pm 2$
BSV101	198.3 ± 3.3	0.31	$+59 \pm 1$

previously observed that the cationic lipophosphoramidates possessing one thioether function per hydrophobic lipid chain produced liposomes featuring sizes ranging from 75 to 94 nm^[41] whereas the cationic amphiphiles possessing the same polar head group but oleyl or stearyl lipid chains produced liposomes with sizes around 200 nm according to DLS measurements. This trend was confirmed herein, since the cationic amphiphiles **4a-c** possess a size ranging from 82 to 89 nm (Table 1). We can therefore conclude that the phosphoramidates featuring hydrophobic chains functionalized with one or two thioether functions per lipid chain produced, according to our protocol, liposomes featuring a size below 100 nm. These liposomes, prepared from **4a-c**, were kept at 4°C for 3 months and only a few differences were observed by DLS and zeta measurements attesting of their stabilities (supporting information S15). These results suggest that the incorporation of this type of hydrophobic chain could be a strategy to produce liposomes with a small size (<100 nm). It also suggests that this type of lipid chain accept high curvature when compared to cationic amphiphiles featuring oleyl or stearyl chains. This property can likely be related to the flexibility of the lipid chain.^[50] Regarding the zeta potential, all the liposomal solutions prepared have a strong positive zeta potential values as usually observed for cationic liposomes (Table 1).

Then, we recorded the compression isotherms at the air-water interface for the new cationic amphiphiles **4a-c** (Figure 2) and the three benchmark compounds (supporting information S16). The more important data extracted from these isotherms are shown in Table 2. First we observed that the minimal surface area at which the surface pressure started to increase A_0 (lift-off value; Table 2) is ranging from 154 to $227 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ for the compounds **4a-c** (a similar value is observed for **BSV-S12**: $180 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$) whereas this value was $80 \text{ \AA}^2/\text{molecule}$ for compound **BSV101** (stearyl chains). The presence of one or two thioether functions per lipid chain (compounds **4a-c** and **BSV-S12**) produces amphiphiles that cover a more important surface than **BSV101**. Weak hydrogen bonds involving the thioether functions and the water surface could explain this behavior. The molecular surface area at the collapse is another parameter that indicates how the amphiphiles can reduce their surface area before the monolayer was disrupted. To this

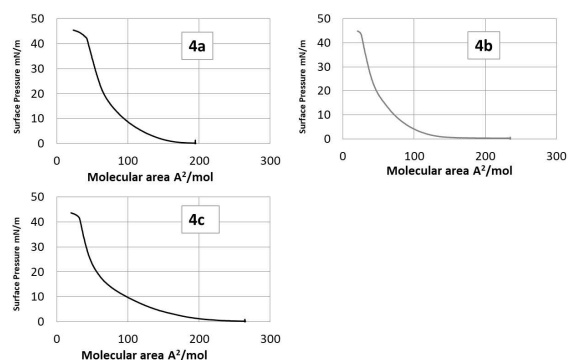


Figure 2. Compression isotherms for the new compounds **4a-c**

Table 3. Ellipsometry results extracted from compression isotherms.

	Delta min ^[a] (n = 2 or 3) $\Delta, ^\circ$	Delta max ^[b] (n = 2 or 3) $\Delta, ^\circ$	Delta max – Delta min $\delta\Delta, ^\circ$
4a (BSV-S4,13)	3.6 ± 0.1	10.1 ± 0.2	6.5 ± 0.2
4b (BSV-S5,12)	2.0 ± 0.1	9.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1
4c (BSV-S7,12)	3.3 ± 0.1	10.6 ± 0.1	7.3 ± 0.1
BSV-S12	1.5 ± 0.1	7.7 ± 0.1	6.2 ± 0.1
BSV36	3.5 ± 0.1	5.8 ± 0.1	2.3 ± 0.1
BSV101	6.1 ± 0.1	9.3 ± 0.1	3.2 ± 0.1

[a] Delta at the Minimal surface area at the surface pressure equal to 0 mN/m. [b] Delta at high pressure (just before the collapse).

respect, the compression isotherms clearly show that the amphiphiles **4a–c** occupied a lower surface area at the collapse (from 25 to 41 Å²/molecule) when compared to **BSV36** (75 Å²/molecule) or to a less extent **BSV101** (45 Å²/molecule) or **BSV-S12** (45 Å²/molecule). The differences observed between **4a–c** and **BSV-S12** indicate that the presence of a second thioether function per lipid chain can provide additional effects. This feature is also consistent with the formation of small liposomes because such supramolecular assemblies require, in the inner leaflet, amphiphilic compounds that occupy a reduced surface area whereas in the outer leaflet the lipid chain have more space due to the curvature. Finally, the surface pressure at the collapse indicates how the supramolecular assembly supports the lateral compression and also informs on its stability. The more is the pressure at the collapse the more is the film stability. To this respect, the highest surface pressure at the collapse is logically observed for **BSV101** that possesses C18:0 lipid chains. The cationic amphiphiles **4a–c** feature the lowest values (42 to 43 ± 0.5 mN/m). These values are even lower than for **BSV36** (oleyl chains) and **BSV-S12** (one thioether function per hydrophobic chain).

Altogether, the compression isotherms indicate that the hydrophobic chains of compounds **4a–c** are more adaptable to compressive stress than the other lipid chains included in this study (featuring either stearyl, oleyl, or mono-thioether lipid chains). The position of the two thioether functions within the hydrophobic chain has in this series of compounds a limited impact since compounds **4a–c** feature very close behaviors at the

Table 2. Principal data extracted from the compression isotherm experiments

	Lift off value (n = 2 or 3) A ₀ ^[a] [Å ² / molecule (± 2 Å ² /molecule)]	Collapse molecu- lar area (n = 2 or 3) [Å ² / molecule (± 2 Å ² /molecule)]	Collapse surface pressure (n = 2 or 3) [mN/m (± 0.25mN/m)]
4a	165	41	42
4b	154	25	45
4c	227	30	42
BSV-S12	180	45	47
BSV36	160	75	47
BSV101	80	45	58

[a] Minimal surface area at the surface pressure equal to 0 mN/m.

air-water interface except for the lift-off with values ranging from 154 to 227 Å²/molecule.

The reflectivity of the surface (reflective index and thickness) is the property of the film which is detected by measuring the ellipsometric angle (Delta, °).^[51] These measurements were achieved all along the compression isotherms (simultaneously with the surface pressure); two important values (at the lowest compression A₀ (Delta Min), and at the highest compression (Delta Max) just before the collapse) are reported in Table 3 for each sample (supporting information SI7). The ellipsometric values are correlated to the thickness of the lipid surface at the air-water interface and only the comparison of these values worth to be discussed. It must be emphasized that we hypothesize that all the lipid chains have a comparable reflective index despite the presence of sulfur atom in compounds **4a–c** and no sulfur atom in compounds **BSV36** and **BSV101**. First, the delta max values revealed that the presence of one unsaturation (**BSV36**) deeply limits the thickness of the lipid layer at the highest compression (5.8° for **BSV36** when compared to almost 10° for **4a–c**). The delta max values also indicates that the presence of two thioether functions per lipid chain produced thicker lipid layers. These layers are even thicker than with lipid chains containing only one thioether function (**BSV-S12**). These results indicate that under lateral pressure the lipid chains possessing two thioether functions can adopt a straight conformation likely orthogonal to the surface thus producing a lipid layer having a comparable thickness than with saturated lipid chain (**BSV101**). Second, at the lift-off pressure (A₀), as expected all delta values are less than those recorded at higher pressure because the lipid chains have more space and therefore the lipid monolayer is less thick. However, we can emphasize some marked differences depending on the structure of the lipid chain. With the saturated lipid chains (**BSV101**), the ellipsometric angle is up to 3 times higher than for the compounds **4a–c**. This suggests that compounds **4a–c** at low compression pressure can cover more surface than with the saturated lipid chains (**BSV101**). This could be explained by the presence of weak hydrogen bonds between the thioether function and the water surface. The presence of one unsaturation (**BSV36**) produces reflexivity comparable to those recorded for compounds **4a–c** meaning that at low pressure the thickness of the layer should be comparable. The last column of Table 3 reports the difference between maximal and minimal ellipsometric angle ($\delta\Delta, ^\circ$). More this difference is high more the lipid can adapt its conformation to respond to the lateral pressure. To this respect, compounds **4a–c** feature the highest differences. Considering that the polar head groups are identical in all this series of cationic amphiphiles whereas the volume occupied by the lipid chains varies depending on the lateral pressure, we can conclude that these amphiphiles **4a–c** could have a positive curvature or a negative curvature depending on the constraint.^[52] This adaptability could favor the stabilization of nanoparticles with higher curvatures and could explain the formation of smaller supramolecular assemblies with the compounds **4a–c** (Table 1).

Fluorescence anisotropy of a hydrophobic probe is another technic that can be used to assess the rigidity/fluidity of the

non-polar domains of supramolecular assembly of amphiphiles. For that purpose the compounds **4a–c** were formulated as liposomal solutions and the fluorescent probe diphenylhexatriene (DPH) was added.^[53] We recorded the anisotropy of fluorescence of liposomes **4a–c** in water from 5 to 65 °C (Figure 3 and supporting information S18). We observed that

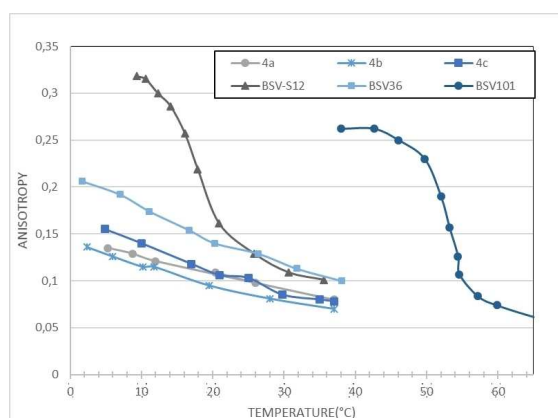


Figure 3. Fluorescence anisotropy from 2 to 65 °C for liposomal solution (20 mM) with 0.5% of DPH as fluorescent probe.

the compounds **4a–c** exhibited a low anisotropy but no transition between a gel to a liquid phase was detected in the range of temperature considered suggesting that the main transition (T_m) was below 5 °C. This result contrasts with our previous study reporting a transition at 16 °C for **BSV-S12**. We can conclude that the compounds **4a–c** exist in a fluid phase at temperature upper than 5 °C. This result is fully consistent with the compression isotherms that concluded that the amphiphiles **4a–c** were very flexible and more fluid than the compounds featuring only one thioether function per lipid chain (**BSV-S12**) as shown by the pressure at the collapse, which is lower for the compounds **4a–c**. We can therefore conclude on a cumulative effect induced by increasing the number of thioether function per lipid chain on the fluidity of the hydrophobic domains.

The physicochemical characterizations of the cationic amphiphiles **4a–c** emphasize the specificities induced by the presence of two thioether functions within the lipid chains. We have shown an increase of the fluidity and a capacity to adapt the conformation of the lipid chains when a lateral pressure is applied. All these features prompted us to explore the use of these cationic amphiphiles as nucleic acids' carriers. Indeed, the adaptability of the conformation of the lipid chains should stabilize the nanoparticles formed by the auto-assembly of a plasmid DNA (pDNA) with cationic amphiphiles (lipoplexes). On the other hand, the fluidity should favor the escape of the lipoplexes from the endosomes after cell internalization. First, we assessed the capacity of the cationic amphiphiles **4a–c** to compact pDNA by mixing these amphiphiles at different charge ratio (CR) with a pDNA (pGM144^[54]). DLS measurements of the lipoplexes prepared at different CR (CR=2, 4, 6) (Supporting

Information S19) indicated an increase of the size whereas the zeta potential consistently increased from CR=2 to CR=6. As shown with the electrophoresis gel retardation assays (Figure 4A), all three compounds **4a–c** were able to compact pDNA.

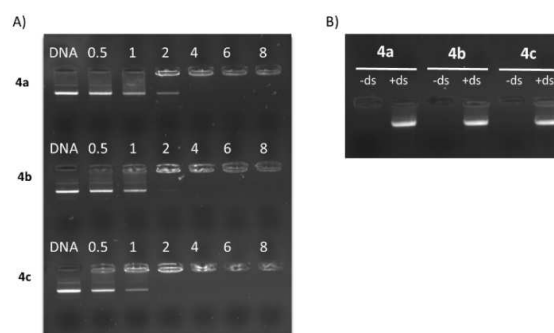


Figure 4. A) DNA binding ability of compounds **4a–c** at charge ratio (CR) = 0.5, 1, 2, 4, 6 and 8. B) Gel electrophoresis of lipoplexes prepared at CR=4 in the absence (-ds) and in presence (+ds) of dextran sulfate. The pGM144 pDNA was used in all these experiments.

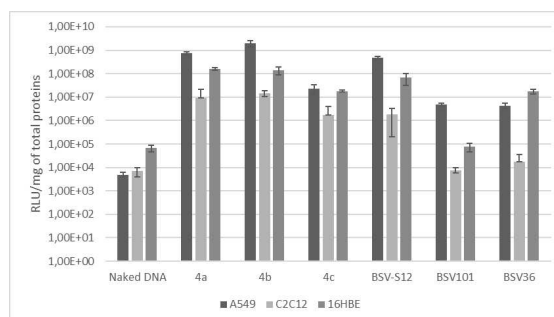


Figure 5. Transfection efficiency of compounds **4a**, **4b** and **4c** in comparison to **BSV-S12** and two references **BSV101** and **BSV36** at CR=4 on three different cell lines (A549, C2C12 and 16HBE). As negative control, free pDNA (pGM144, luciferase-encoding plasmid, 0.25 µg/well) was used. 24 h after deposition, transfection efficiency was determined by luciferase assay. Results are expressed as the Relative Light Units/mg of total proteins, as the mean ± SD of 3 wells.

A full compaction was observed at CR=2 for **4b** and **4c** whereas it was observed at CR=4 for **4a**. The addition of the polyanionic polymer dextran sulfate (ds) on preformed lipoplexes (CR=4) allowed to restore the migration of free pDNA as shown in Figure 4B. By contrast, only very partial pDNA release was observed after addition of dextran sulfate on **BSV101** lipoplexes, suggesting a stronger compaction within such complexes (Supporting Information S110).

The newly reported cationic amphiphiles **4a–c** were evaluated as regards their ability to deliver the luciferase-encoding pDNA pGM144 in three different cell lines (A549, C2C12 and 16HBE). These transfections were achieved at different Charge Ratio (CR from 0.5 to 8). It was observed that the best CR was 4 in term of transfection efficacies. Accordingly, we present in figure 5, the transfection results at CR 4 for **4a–c**

and three reference compounds. All the transfection assays were achieved the same day under identical experimental conditions thus allowing to make a straight comparison of the transfection efficacies. It must be emphasized that **BSV36** was previously compared to Lipofectamine^[26] and also to the benchmark compound from our laboratory (KLN47) and demonstrated its efficacy.^[55] The results obtained indicate that the transfection efficacy was dependent of the cell line (A549 and 16HBE were more easily transfected than C2C12). The most efficient carriers were **4a** and **4b**, irrespective of the cell line considered.

In parallel, cells viability was measured under identical experimental conditions, i.e. 24 h after transfection with lipoplexes formed at the same CR as before (CR 2, 4 and 6 ; Figure 6). As for 16HBE and A549 cell lines, the results showed that **4a** and **4c** were almost safe (with cell viabilities remaining between 80 to 100%). However, **4b** used at CR=4 exhibited some toxicity towards A549 (with about 60% of viability). Unexpectedly, for a higher CR, **4b** and **BSV-S12** were found less toxic towards A549. It is noteworthy that the best transfection efficiencies were measured at CR=4, for which cell viability was in most of the cases the lowest. For instance, compound **4b** was both less efficient and less cytotoxic when increasing the CR above 4 (i.e. at CR 6). As for C2C12, it appeared to be more sensitive to all lipoplexes, especially **4b**, independently of the CR used.

3. Conclusions

The synthesis of hydrophobic chains that incorporate two thioether functions can be readily achieved by using a statistical double thiol-ene photo-click reaction. Accordingly, the structure of the dithiol used as substrate defines the number of methylene units that separate the two thioether functions in the final hydrophobic chain. Bicatener cationic amphiphiles possessing these thioether-functionalized hydrophobic chains were synthesized. These cationic amphiphiles can more easily adapt the conformation of their lipid chain to support lateral pressure as illustrated by the lower value of the molecular surface area at

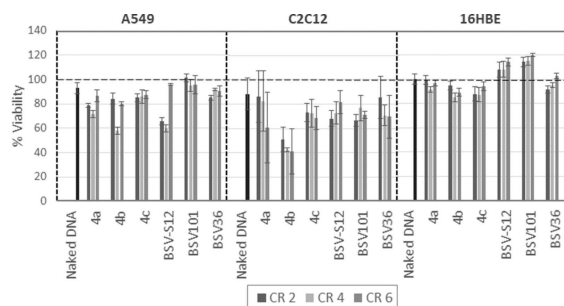


Figure 6. Cell viability of A549, C2C12 and 16HBE 24 h after treatment with lipoplexes formed at different CR (2, 4 and 6). Naked pDNA was used as negative control. Results are expressed as a percentage of the viability determined with un-transfected cells, as the mean \pm SD of 3 wells.

the collapse for **4a-c** when compared to **BSV101**, **BSV36** and **BSV-S12**. This adaptability to the lateral pressure is also evidenced by the thickness of the supramolecular assemblies (determined by ellipsometric measurements) at the air-water interface. To this respect, the cationic amphiphiles possessing the new lipid chains (**4a-c**) feature the highest adaptability when compared to cationic amphiphiles possessing oleyl chains (**BSV36**) or stearyl chains (**BSV101**). The fluorescence anisotropy also emphasizes the additional effect induced by the presence of two thioether functions per lipid chain as shown by the lower values of the transition between rigid to fluid phase. All these physico-chemical properties suggest that the incorporation of two thioether functions per hydrophobic chain (**4a-c**), in place of one (**BSV-S12**), renders the supramolecular assembly more fluid, with a greater adaptability to lateral pressure (lower molecular surface at the collapse, lower value of the pressure at the collapse, higher variation of the ellipsometry angles). The incorporation of two thioether functions in the hydrophobic domain thus represents another alternative for modulating the strength of the resulting supramolecular assemblies. The effect of subsequent properties towards gene transfection activity was evaluated. We report that two of the new compounds described herein (i.e. **4a** and **4b**) are among the most efficient to transfect three animal or human-derived cell lines.

Experimental Section

Synthesis – General Protocols

Synthesis of compounds 1a-c: Alkenol (1 equivalent), alkene (4 equivalents) and alkanedithiol (1 equivalent) were placed in a Schlenk tube (pyrex) with 2,2-dimethoxy-2-phenylacetophenone DMPA (0.4 equivalent) and degassed under argon for 10 min. The UV Lamp was a Phillips TL-D 18 W/08 BLB ($\lambda = 365$ nm) that was placed close to the Schlenk tube (≈ 1 cm). The mixture was then placed under UV light at 18–20°C for 18 h. The crude product was purified using flash chromatography Hexane/AcOEt to give the desired product.

Synthesis of compounds 2a-c: Compound **1a-c** (2.2 equivalents) and diphenyl phosphite (1 equivalent) were mixed and heated at 130°C in a Kugelroch distillation apparatus under reduced pressure ($4.2 \cdot 10^{-2}$ mbar) for 3 h. Phenol was removed by distillation. The undistilled compounds correspond to the desired products **2a-c**. They were used without further purification.

Synthesis of compounds 3a-c: To a solution of compound **2** (1 equivalent) in CH_2Cl_2 was added *N,N*-dimethylethylenediamine (1.1 equivalent), DIPEA (1.1 equivalent) and BrCCl_3 (1.1 equivalent) at 0°C. The reaction was stirred for 15 min. at 0°C then for 4 h at 20°C. The solvent was evaporated and replaced by diethylether. After agitation for 10 min. the solution was filtrated and the filtrated was concentrated. The residue was then redissolved in CH_2Cl_2 , washed with water, dried over MgSO_4 , filtered and concentrated. The compounds were purified by silica gel chromatography using $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$: 90/10 (v/v) as eluent to produce **3a-c** as colourless viscous oils. The purification by chromatography at this step is important because in the next step (see below), the purification consisted to remove all the volatile compounds.

Synthesis of compounds 4a-c: To a solution of compound **3** (1 equivalent) in CH_2Cl_2 was added methyl iodide (4 equivalents). The

reaction was stirred overnight at 20 °C. The solvent and the excess of methyl iodide were evaporated by leaving under vacuum for 2 to 5 h in order to remove all the volatiles (solvent and excess of methyl iodide) that are the only chemicals present in the crude product. No additional purification was needed. The compound **4a–c** were isolated as pale yellow waxes.

Compression Isotherms

The Langmuir trough was cleaned with ethanol and water then it was filled with the sub-phase (ultrapure water). A good base line in the (π -A) and (Δ -A) isotherms indicated the cleanliness of the interface. The cationic lipid in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1) mixture (25 μL) was slowly spread at the air-water interface using a Hamilton micro syringe. After waiting 10 minutes till the solvents evaporate, the isotherm of the lipid monolayer was recorded by compressing the barriers at the rate of 5 cm^2/min . The surface pressure was measured using a filter paper held by a Wilhelmy balance connected to a microelectronic feedback system (Nima technology). The experiment is stopped once the collapse is reached.

Ellipsometry

The ellipsometric measurements were carried out with a home-made ellipsometer associated to the Langmuir trough and the tensiometer. The software developed recorded simultaneously the value of the surface pressure and the value of the ellipsometric angle during the isotherm compression. The principal of the ellipsometric angle measurement is the following: a polarized He-Ne laser beam ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$, Melles Griot, Carlsbad, CA) is reflected by the air/water interface. The incidence angle of the light was 1° away from the Brewster angle (53.12° value obtained for an air/water interface). After reflection, the laser light passed through a $\lambda/4$ retardation plate, a Glan-Thompson analyzer, and a photo-multiplier. Through a computer-controlled feedback loop, the analyzer automatically rotated toward the extinction light position. In this “null ellipsometer” configuration, the analyzer angle, multiplied by 2, yielded the value of the ellipsometric angle (Δ), i.e., the phase difference between parallel and perpendicular polarization of the reflected light, which reflects the thickness of the molecular film adsorbed at the interface. The laser beam probed a surface of 1 mm^2 and a depth of the order of 1 μm . Values of Δ were recorded every 4 s with a precision of $\pm 0.5^\circ$.

Determination of CAC and Fluorescence Anisotropy

Fluorescence was recorded on Agilent Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer, using automatic polarizers for anisotropy measurements. The fluorescent probe 1,6-diphenylhexatriene (DPH) was used for anisotropy measurements whereas the solvatochromic fluorescent probe Nile red was used for Critical Aggregation Concentration (CAC) determination. Both were purchased from Sigma-Aldrich.

Size and Zeta Measurements

Size and zeta measurements were achieved with a MALVERN Nano ZS.

Compaction of pDNA

Lipoplexes were prepared by mixing pDNA (pGM144 – 3.7 kb)^[54] with each liposomal solution in water, for concentrations corresponding to CR ranging from 0.5 to 8. The resulting mixtures were incubated at room temperature for 30 minutes before being

subjected to electrophoresis in a 0.8% agarose gel at 100 V, 90 mA. The gel previously stained with ethidium bromide nuclei acids gel staining (Dominique Deutsher) was visualized using a UV transilluminator (Fisher Bioblock). In order to recover free pDNA from preformed lipoplexes, dextran sulfate was mixed with the latter and incubated for 30 min at room temperature. Electrophoresis was then performed as detailed before.

Transfection

The *in vitro* reporter gene assay via luciferase measurement was carried out as previously reported.^[16] In short, the three cell lines were grown in either EMEM (16HBE) or DMEM (A549 and C2C12) both supplemented with 10% bovine fetal serum, 1% antibiotic and 1% L-glutamine. All incubations were performed at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 . The day before transfection, the cells were seeded into a 96-well plate at a density of 20 000 cells per well for A549 and C2C12 and 40 000 cells per well for 16HBE. Lipoplexes were prepared as detailed above and then added dropwise into each well; the reference compound **BSV36** was used as a positive transfection control whereas naked DNA was used as a negative control. After 24 h at 37 °C, the culture medium was removed and the cells were lysed with Passive Lysis Buffer (Promega) prior to running a chemiluminescence assay (Luciferase Assay System, Promega) to determine luciferase expression. The total protein content of each cell lysate was determined using the BC assay kit (Uptima). Finally, data were expressed as relative light units (RLU) per milligram of total proteins (mean \pm SD with $n = 3$).

Cell Viability

The Vialight kit (Lonza) was used to determine the ATP content which reflects the number of living cells (transfected or not) in culture. The latter is the result of both cell proliferation and cell mortality that occurred during the experiment. This assay was used as recommended by the manufacturer. The results were expressed as percentages relative to the viability of non-transfected cells used as reference (100% cell viability).

Acknowledgements

We thank Association Française contre les Myopathies (AFM-France), Association Gaétan Saleün (Brest-France), Vaincre La Mucoviscidose (Paris, France), CNRS and INSERM for funding. RG is grateful for a PhD fellowship from Brest Métropole and Association Gaétan Saleün. We thank the platforms (RMN-RPE and spectrométrie de masse) from the University of Brest.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

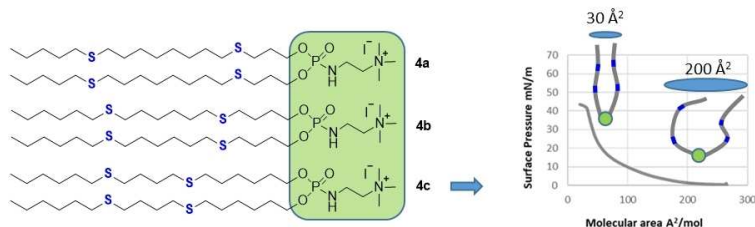
Keywords: cationic amphiphiles · lipids · supramolecular chemistry · thioether · transfection

[1] R. Pichot, R. L. Watson, I. T. Norton, *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 11767–11794.

- [2] M. Berchel, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, J. P. Haelters, T. Montier, P. Midoux, P. Lehn, P. A. Jaffrès, *Biochimie* **2012**, *94*, 33–41.
- [3] S. Drescher, C. Otto, S. Müller, V. M. Garamus, C. J. Garvey, S. Grünert, A. Lischka, A. Meister, A. Blume, B. Dobner, *Langmuir* **2018**, *34*, 4360–4373.
- [4] M. Damen, A. J. J. Groenen, S. F. M. van Dongen, R. J. M. Nolte, B. J. Scholte, M. C. Feiters, *MedChemComm* **2018**, *9*, 1404–1425.
- [5] G. G. Privé, *Methods* **2007**, *41*, 388–397.
- [6] J. P. Douliez, N. Martin, C. Gaillard, T. Beneyton, J. C. Baret, S. Mann, L. Beven, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 13689–13693; *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 13877–13881.
- [7] L. Schoonen, J. C. M. van Hest, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 1109–1128.
- [8] D. Lombardo, M. A. Kiselev, S. Magazù, P. Calandra, *Adv. Cond. Matter Phys.* **2015**, 151683.
- [9] a) X. Guo, L. Huang *Acc. Chem. Res.* **2012**, *45*, 971–979; b) C. Liu, L. Zhang, H. Liu, K. Cheng, *J. Controlled Release* **2017**, *266*, 17–26; c) Y. Rui, D. R. Wilson, J. J. Green, *Trends Biotechnol.* **2019**, *37*, 281–293.
- [10] T. Le Gall, M. Berchel, S. Le Hir, A. Fraix, J. Y. Salaün, C. Férec, P. Lehn, P. A. Jaffrès, T. Montier, *Adv. Healthcare Mater.* **2013**, *2*, 1513–1524
- [11] a) A. Girault, J. P. Haelters, M. Potier, A. Chantôme, M. Pineau, S. Marionneau-Lambot, T. Oullier, G. Simon, H. Couthon-Gourvès, P. A. Jaffrès, V. Joulin, B. Corbel, P. Bougnoux, C. Vandier, *Current Cancer Drug Target* **2011**, *11*, 1111–1125; b) A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, L. Clarysse, G. Fromont, S. Marionneau-Lambot, M. Guéguinou, J. C. Pagès, C. Collin, T. Oullier, A. Girault, F. Arbion, J. P. Haelters, P. A. Jaffrès, M. Pinault, P. Besson, V. Joulin, P. Bougnoux, C. Vandier, *Cancer Res.* **2013**, *73*, 4852–61.
- [12] a) P. Ríos-Marco, C. Marco, X. Gálvez, J. M. Jiménez-López, M. P. Carrasco, *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1859*, 1657–1667; b) P. A. Jaffrès, C. Gajate, A. M. Bouchet, H. Couthon-Gourvès, A. Chantôme, M. Potier-Cartereau, P. Besson, P. Bougnoux, F. Mollinedo, C. Vandier, *Pharm. Ther.* **2016**, *165*, 114–131.
- [13] B. Draghici, M. A. Ilies, *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 4091–4130.
- [14] M. Damen, A. J. J. Groenen, S. F. M. van Dongen, R. J. M. Nolte, B. J. Scholte, M. C. Feiters, *MedChemComm* **2018**, *9*, 1404–1425.
- [15] N. Belmani, P. Midoux, C. Pichon, P. Loyer, C. Passirani, T. Le Gall, P. A. Jaffrès, P. Lehn, T. Montier, *Biotechnol. J.* **2015**, *10*, 1370–1389.
- [16] T. Le Gall, D. Loizeau, E. Picquet, N. Carmoy, J. J. Yaouanc, L. Deschamps, P. Delépine, P. Giamarchi, P. A. Jaffrès, P. Lehn, T. Montier, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 1496–1508.
- [17] A. Delalande, M. P. Gosselin, A. Suwalski, W. Guilmain, C. Leduc, M. Berchel, P. A. Jaffrès, P. Baril, P. Midoux, C. Pichon, *Nanomedicine: NBM* **2015**, *11*, 1735–1744.
- [18] Y. Xiao, K. Shi, Y. Qu, B. Chu, Z. Qian, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* **2018**, *12*, 1–18.
- [19] K. Van der Jeught, S. De Koker, L. Bialkowski, C. Heirman, P. Tjok Joe, F. Perche, S. Maenhout, S. Bevers, K. Broos, K. Deswarte, V. Malard, R. Hammad, P. Baril, T. Benvegna, P. A. Jaffrès, S. A. A. Kooijmans, R. Schiffelers, S. Liennenklaus, P. Midoux, C. Pichon, K. Breckpot, K. Thielemans, *ACS Nano* **2018**, *12*, 9815–9829.
- [20] A. Le Moignic, V. Malard, T. Benvegna, L. Lemiègre, M. Berchel, P. A. Jaffrès, C. Baillou, M. Delost, R. Macedo, J. Rochefort, G. Lescaille, C. Pichon, F. M. Lemoine, P. Midoux, V. Mateo, *J. Controlled Release* **2018**, *278*, 110–121.
- [21] P. Midoux, C. Pichon, *Expert Rev. Vaccines* **2015**, *14*, 221–34.
- [22] V. D. Sharma, J. Lees, N. E. Hoffman, E. Brailoiu, M. Madesh, S. L. Wunder, M. A. Ilies, *Mol. Pharm.* **2014**, *11*, 545–559.
- [23] M. Mével, T. Montier, F. Lamarche, P. Delépine, T. Le Gall, J. J. Yaouanc, P. A. Jaffrès, D. Cartier, P. Lehn, J. C. Clément, *Bioconjugate Chem.* **2007**, *18*, 1604–1611.
- [24] S. S. Le Corre, N. Belmadi, M. Berchel, T. Le Gall, J. P. Haelters, P. Lehn, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1122–1132.
- [25] S. Fujii, S. Yamada, M. Araki, J. H. Lee, R. Takahashi, S. Sakurai, *Langmuir* **2019**, *35*, 3156–3161.
- [26] S. S. Le Corre, M. Berchel, N. Belmadi, C. Denis, J. P. Haelters, T. Le Gall, P. Lehn, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 1463–1474.
- [27] B. Moghaddam, S. E. McNeil, Q. Zheng, A. R. Mohammed, Y. Perrie, *Pharmaceutica* **2011**, *3*, 848–864.
- [28] L. Billiet, C. Gonçalves, J. P. Gomez, J. Lodewick, M. Berchel, P. A. Jaffrès, T. Montier, P. Lehn, E. Bertrand, Y. El-Ghoul, H. Cheradame, P. Guégan, M. Mével, B. Pitard, T. Benvegna, C. Pichon, P. Midoux, *Biomaterials* **2012**, *33*, 2980–2990.
- [29] Y. H. Xu, F. C. Szoka, *Biochemistry* **1996**, *35*, 5616.
- [30] D. F. Zhi, S. B. Zhang, B. Wang, Y. N. Zhao, B. L. Yang, S. J. Yu, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 563–577.
- [31] S. S. Le Corre, M. Berchel, T. Le Gall, J. P. Haelters, P. Lehn, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, 8041–8048.
- [32] L. Wang, R. Koynova, H. Parikh, R. C. MacDonald, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3692–3706.
- [33] D. Afonso, T. Le Gall, H. Couthon-Gourvès, A. Grélard, S. Prakash, M. Berchel, N. Kervarec, E. J. Dufourc, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Soft Matter* **2016**, *12*, 4516–4520.
- [34] D. Poger, B. Caron, A. E. Mark, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 13838–13848.
- [35] M. Lindberg, N. Carmoy, T. Le Gall, A. Fraix, M. Berchel, C. Lorilleux, H. Couthon-Gourvès, P. Bellaud, A. Fautrel, P. A. Jaffrès, P. Lehn, T. Montier, *Biomaterials* **2012**, *33*, 6240–6253.
- [36] M. J. Moghaddam, L. de Campo, L. J. Waddington, C. J. Drummond, *Soft Matter* **2010**, *6*, 5915–5929.
- [37] A. Tschiche, S. Malhotra, R. Haag, *Future Medicine* **2014**, *9*, 667–693.
- [38] N. L. Benner, K. E. Near, M. H. Bachmann, C. H. Contag, R. M. Waymouth, P. A. Wender, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2812–2824.
- [39] S. C. Semple, A. Akinc, J. Chen, A. P. Sandhu, B. L. Mui, C. K. Cho, D. W. Sah, D. Stebbing, E. J. Crosley, E. Yaworski, I. M. Hafez, J. R. Dorkin, J. Qin, K. Lam, K. G. Rajeev, K. F. Wong, L. B. Jeffs, L. Nechev, M. L. Eisenhardt, M. Jayaraman, M. Kazem, M. A. Maier, M. Srinivasulu, M. J. Weinstein, Q. Chen, R. Alvarez, S. A. Barros, S. De, S. K. Klimuk, T. Borland, V. Kosovrasti, W. L. Cantley, Y. K. Tam, M. Manoharan, M. A. Ciufolini, M. A. Tracy, A. de Fougerolles, I. MacLachlan, P. R. Cullis, T. D. Madden, M. J. Hope, *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 172–6.
- [40] D. Adams, A. Gonzalez-Duarte, W. D. O’Riordan, C. C. Yang, M. Ueda, A. L. Kristen, I. Tournev, H. H. Schmidt, T. Coelho, J. L. Berk, K. P. Lin, G. Vita, S. Attarian, V. Planté-Bordeneuve, M. M. Mezei, J. M. Campistol, J. Buades, T. H. Brannagan, B. J. Kim, J. Oh, Y. Parman, Y. Sekijima, P. N. Hawkins, S. D. Solomon, M. Polydefkis, P. J. Dyck, P. J. Gandhi, S. Goyal, J. Chen, A. L. Strahs, S. V. Nochur, M. T. Sweetser, P. P. Garg, A. K. Vaishnav, J. A. Gollob, O. B. Suhr, *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 11–21.
- [41] A. Bouraoui, M. Berchel, R. Ghanem, V. Vié, G. Paboeuf, L. Deschamps, O. Lozach, T. Le Gall, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.* **2019**, *17*, 3609–3616.
- [42] R. A. O’Brien, A. Mirjafari, K. M. Mattson, S. M. Murray, N. Mobarrez, E. A. Salter, A. Wierzbicki, J. H. Davis, K. N. West, *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 10232–10239.
- [43] S. Drescher, A. Meister, G. Graf, G. Hause, A. Blume, B. Dobner, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 6796–6804.
- [44] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 1540–73.
- [45] M. Berchel, T. Le Gall, O. Lozach, J. P. Haelters, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 2846–53.
- [46] T. O. Machado, C. Sayer, P. H. H. Araujo, *Eur. Polym. J.* **2017**, *86*, 200–215.
- [47] K. L. Killops, L. M. Campos, C. J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *130*, 5062–5064.
- [48] A. Fraix, T. Le Gall, M. Berchel, C. Denis, P. Lehn, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11*, 1650–1658.
- [49] S. S. Le Corre, M. Berchel, H. Couthon-Gourvès, J. P. Haelters, P. A. Jaffrès, *Beilstein J. Org. Chem.* **2014**, *10*, 1166–1196.
- [50] H. J. Risselada, S. J. Marrink, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2009**, *11*, 2056–2067
- [51] a) C. Bottier, J. Géan, F. Artzner, B. Desbat, M. Pézolet, A. Renault, D. Marion, V. Vié, *BBA Biomembrane* **2007**, *1768*, 1526–1540; b) C. Bourliou, G. Paboeuf, S. Chever, S. Pezennec, J.-F. Cavalier, F. Guyomarc’h, A. Deglaire, S. Bouhallab, D. Dupont, F. Carrière, V. Vié, *Colloids Surf. B* **2016**, *143*, 97–106.
- [52] I. R. Cooke, M. Desemo, *Biophys. J.* **2006**, *91*, 487–495.
- [53] B. R. Lentz, *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *64*, 99–116.
- [54] S. C. Hyde, I. A. Pringle, S. Abdullah, A. E. Lawton, L. A. Davies, A. Varathalingam, G. Nunez-Alonso, A. M. Green, R. P. Bazzani, S. G. Sumner-Jones, M. Chan, H. Li, N. S. Yew, S. H. Cheng, A. C. Boyd, J. C. Davies, U. Griesenbach, D. J. Porteous, D. N. Sheppard, F. M. Munkonge, E. W. Alton, D. R. Gill, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 549–51.
- [55] M. Berchel, T. Le Gall, J. P. Haelters, P. Lehn, T. Montier, P. A. Jaffrès, *Mol. Pharm.* **2015**, *12*, 1902–1910.

Manuscript received: June 25, 2019
 Revised manuscript received: July 18, 2019
 Version of record online: ■■■■■

ARTICLES



New lipid chains containing two thioether functions are incorporated in the structure of cationic amphiphiles. Physicochemical studies underscore both the fluidity and adaptabil-

ity of these lipid chains to lateral pressure. The cationic lipids are assessed as in vitro synthetic gene carriers.

*A. Bouraoui, R. Ghanem, Dr. M. Berchel, Dr. V. Vié, Y. Le Guen, G. Paboeuf, Dr. L. Deschamps, Dr. T. Le Gall, Prof. Dr. T. Montier, Prof. Dr. P.-A. Jaffrès**

1 – 9

Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery



Tandis que de nombreuses données avec de bons résultats en termes d'efficacité de transfection ont été obtenues en conditions *in vitro*, peu de données concernant l'utilisation de vecteurs cationiques délivrés par injection HLV figurent dans la littérature. Afin d'explorer si de tels composés délivrés par cette voie pourraient être bénéfiques, des injections de polyplexes à base du polymère cationique bPEI ont été réalisées.

Dans cette expérience, le plasmide optimisé codant la luciférase, pGM144, a été utilisé soit nu, soit complexé à différents rapports de masse (à savoir 1, 2, 4 et 8) avec de la bPEI 25 kDa. Les injections ont été faites chez la souris Swiss, en NaCl 0,9% à raison de 0.5 µg de pGM144 / mL de solution délivrée. Le volume injecté par membre était d'environ 1 mL et a été ajusté selon la formule figurant dans la section « injections HLV » du matériel et méthodes. Le reste de la procédure a aussi été réalisé suivant les paramètres indiqués dans ladite section. Les animaux ont été sacrifiés quatorze jours après injection. Les muscles des membres ont été prélevés et analysés afin d'effectuer un dosage de l'activité luciférase.

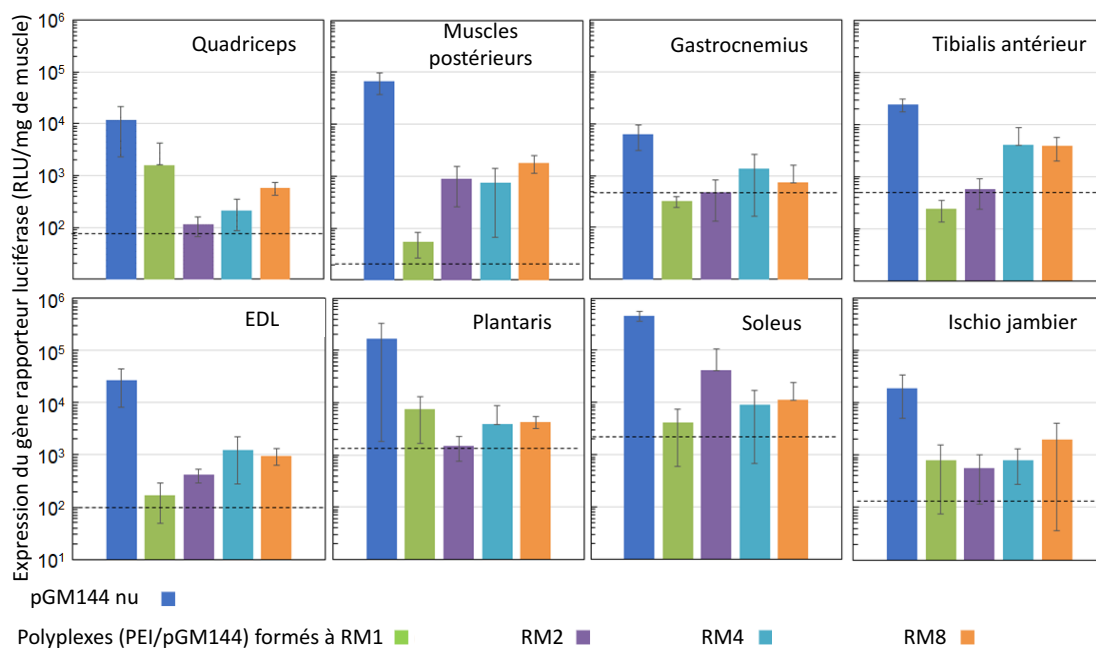


Figure 45 : Effet du polymère cationique bPEI 25 kDa sur l'efficacité du transfert de gènes du plasmide pGM144 codant la luciférase après injection HLV chez la souris Swiss. Chaque graphique rapporte les résultats de transfection par muscle prélevé. La ligne en pointillé représente le bruit de fond par muscle. Les différents résultats sont exprimés en Relative Light Unit par mg de muscle (RLU/mg de muscle) et correspondent à la moyenne des valeurs pour chaque traitement +/- SD avec un nombre de pattes par groupe n= 4.

Pour chaque muscle analysé, l'utilisation du polymère cationique réduit l'efficacité de transfection telle que mesurée en termes d'expression de la luciférase (**Figure 45**). Le signal luminescent obtenu avec l'ADN nu est systématiquement plus important que ceux observés avec les polyplexes, et ceci, quel que soit le rapport de masse utilisé.

Malgré l'utilisation d'un plasmide optimisé de petite taille, la bPEI s'avère délétère pour l'efficacité du transfert de gènes par administration HLV. Ces résultats sont en adéquation avec ce qui peut être observé par voie IM d'un point de vue transfection.

Comme mentionné dans la revue « **Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations** », l'innéficience du polymère cationique - et des vecteurs cationiques de manière plus générale - dans le cadre de l'injection HLV pourrait s'expliquer par des interactions électrostatiques avec des composants chargés de la MEC des muscles.

En conclusion, l'utilisation d'un polymère cationique, et plus généralement de vecteurs cationiques seuls dans le contexte de l'administration HLV, ne permet pas d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes comparativement à l'ADN nu.

b) Utilisation de copolymères tribloc amphiphiles neutres de type poloxamère

Les CTAN, vecteurs synthétiques n'ayant pas démontré d'activité transfectante *in vitro*, se sont révélés bénéfiques pour le transfert de gènes, en comparaison à l'ADN nu, dans le cadre d'administration IM. Le type de composé le plus utilisé dans ces études sont les poloxamères (copolymères de type A-B-A) (Bello-Roufaï, Lambert, and Pitard 2007; Alimi-Guez et al. 2009; Lemieux et al. 2000). Alors que ces vecteurs synthétiques sont sans doute parmi les plus efficaces pour le transfert de gènes appliqué aux muscles squelettiques, aucune étude ne semble mentionner leur utilisation couplée à l'injection HLV.

Afin de déterminer si de telles molécules pourraient permettre d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes par injection HLV chez la souris, deux poloxamères ont été sélectionnés : les poloxamères 188 et 407. Ces derniers se sont révélés augmenter l'expression d'un transgène luciférase d'environ 1 log en comparaison au contrôle ADN seul, lors d'injections IM au niveau du tibialis antérieur de souris (Bello-Roufaï, Lambert, and Pitard 2007; Alimi-Guez et al. 2009). Deux concentrations se sont révélées optimales dans ces études, à savoir 3% w/v pour le poloxamère 188 et 0,05% w/v pour le poloxamère 407. Ces concentrations ont par conséquent été sélectionnées pour les injections HLV. Pour les études *in vivo* de ce travail, les différents composés ont été utilisés avec le plasmide pTG11033, codant la luciférase (voir matériel et méthodes). Comparativement au pGM144, le pTG11033, est d'une taille relativement importante (9676 pb), beaucoup plus proche de celle d'une construction plasmidique thérapeutique pouvant être utilisée par exemple dans le cadre de la DMD.

Les résultats obtenus ont donné lieu au manuscrit intitulé : « **Non-viral gene transfer to skeletal muscles combining Hydrodynamic Limb Vein injection and poloxamers** ». Ce dernier a été rédigé au format du journal PLOS One et est toujours en cours de construction.

Non-viral gene transfer to skeletal muscles combining Hydrodynamic Limb Vein injection and poloxamers

Authors section: Yann T Le Guen¹ et al.

¹ Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGFB, F-29200 Brest, France

Abstract

Skeletal muscle is an interesting tissue for gene therapy. However, due to its body widespread distribution, its efficient and homogenous transfection can be challenging, notably when using non-viral gene transfer approaches. Poloxamers are compounds known to increase transfection *via* intramuscular injection followed or not by electroporation, compared to naked pDNA. However, a limitation of such procedures is the localized gene transfer occurring only around the injection site or in a restricted muscle area. Hydrodynamic Limb Vein (HLV) injection is a potent physical gene delivery method that allows to reach the whole musculature of a given limb. By this way, some naked pDNA can be delivered in every muscle. In the present work, we looked into the potential of poloxamers to enhance the yield of HLV gene transfer to muscle limbs in mice.

Keywords: Skeletal muscles, Hydrodynamic Limb Vein injection, naked pDNA, Poloxamers

Abbreviations: NA, nucleic acids; SM, skeletal muscles; IM, intramuscular injection; HLV, Hydrodynamic Limb Vein; TBCP, triblock copolymer

Introduction

Gene therapy consists of introducing nucleic acids (NA) into cells, to correct and/or to supply, a genetic defect that results in a given disease (1). To bring the NA, (i) viral or (ii) non-viral approaches can be used. The viral approach is the most common and also the most efficient but some drawbacks still remain. Its major limitations relate to host-immune response against the vector (preventing any re-administration), limited encapsidation capacity, production cost and difficulties of quality assessment (2). On the contrary, non-viral approaches are less efficient but far less concerned by these limitations, making them interesting additional tools for gene delivery.

A target tissue of choice for gene therapy purposes is the skeletal muscle (SM) as it can be affected by a wide range of monogenic disorders. However, efficient and homogeneous gene transfer to SM tissue remains particularly challenging, especially using non-viral approaches. For instance, intramuscular injection (IM) has been reported to successfully deliver naked NA to SM, showing long term expression in muscle fibers (3,4). Nevertheless, the gene expression only occurs around the injection site. To dampen this drawback, Wolff and co-worker developed the Hydrodynamic Limb Vein (HLV) injection, a physical gene delivery method that allows to treat at once the whole vascularized musculature of a given limb (5). HLV consists in the rapid and high pressure injection, of an important volume of solution containing NA, through a vein of the limb with both blood inflow and outflow temporarily blocked using a tourniquet (5). HLV has already been successfully applied in several animal models, from small rodents to non-human primates (6–8). Furthermore, two studies part of one clinical trial have been completed, showing the safety and relevance of this delivery method in Humans (9,10). As for IM, naked pDNA can be transfected with some efficacy using HLV injection. However, efficiencies are still suboptimal and enhancement using this latter delivery method would be useful. This should allow higher and more homogeneous transfection, pre-requisites for clinically compatible highly efficient gene therapy, especially for diseases like Duchenne muscular dystrophy (DMD).

Some potential bottlenecks that could limit gene transfer following HLV have been identified (Yann T. Le Guen et *al.* review in preparation). One of these could be sarcolemma

crossing by NA. To address this issue, HLV has rarely been combined with non-viral vectors (11), and some of the classical cationic carriers, efficient *in vitro* (like the widely used bPEI 25 kDa), proved to be deleterious in this context (personal unpublished data). The same holds true for gene transfer to SM upon IM. However, following this path, another class of non-viral vectors, namely neutral amphiphilic Triblock Copolymers (TBCP) has shown some transfection benefits compared to naked pDNA (12–15). Main compounds of this family screened in published work were from the class of poloxamers. These neutral amphiphilic TBCP are structurally composed of 3 hydrophilic/hydrophobic/hydrophilic subunits (so-called “A-B-A block” copolymers) with two poly(ethylene oxide) (PEO) chains on both sides of a central poly(propylene oxide) (PPO) chain (16). IM injection in the tibialis anterior of mice demonstrated the potential P188 or P407 when mixed with pDNA 3% w/v or 0.05% w/v, respectively (12,17). To our knowledge, no studies reported the combination of poloxamers with the HLV procedure yet.

This study was mainly devoted to determine if poloxamers could increase the yield of transfection when delivered using HLV injection. For this demonstration, P188 and P407 were evaluated as regards their effect toward DNA transfection under *in vitro* then *in vivo* experimental conditions.

Materials and methods

Plasmids

For complexation assay (and *in vitro* transfection experiments available in supplementary materials), the optimized CpG free luciferase encoding plasmid pGM144 (3.7 kb) was used (18). For *in vivo* experiments, the plasmid pTG11033 (9.6 kb) comporting a firefly luciferase gene cassette, under control of the strong CMV promoter was chosen. Plasmids were amplified in *E. coli* prior to be extracted by alkaline lysis and purified thanks to the NucleoBond® PC 10,000 purification kit (Macherey-Nagel) following manufacturer instructions. Purified plasmids were then dissolved in injectable water prior to be quantified using a nanodrop system. Batch purities were evaluated using the A_{260}/A_{280} ratio. Only those comprised between 1.8 and 2 were kept for subsequent experiments.

Compounds

bPEI 25 kDa, poloxamers P188 and P407 were purchased from Sigma-Aldrich. Prior to be used, bPEI was kept under the form of a 20 mg/mL solution and poloxamers under the form of 10% stock solutions.

Table 1. Structures and properties of the two poloxamers used in this study.

Structure	Name	MW ¹⁾ (Da)	HLB ²⁾	“a”	“b”
$(\text{PEO})_a\text{-}(\text{PPO})_b\text{-}(\text{PEO})_a$	Poloxamer 188	8,400	29	75	30
	Poloxamer 407	12,600	22	100	65

¹⁾MW: Molecular Weight; ²⁾HLB: Hydrophilic/Lipophilic Balance

Animals

Swiss mice were purchased from Janvier Lab breeding center. Rodents were housed at the animal facility of Brest University. The protocol used for this study was approved by the Laboratory Animal Care Guidelines and the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee at the Faculty of Brest.

bPEI:pDNA and poloxamer:pDNA mixtures for DNA binding assay

bPEI polyplexes were formed in 20 mM HEPES solution at mass ratio (MR) 5:1 (polymer:DNA) by equivolumetric mixing of diluted polymers with diluted pGM144 plasmid. For poloxamer:pDNA mixtures, plasmid pGM144 was diluted in Tyrode 2x at a concentration of 0.025 µg/µL. Solution of P188:pDNA or P407:pDNA were prepared by equivolumetric mixing of compound solved in water with the dedicated pDNA solution to reach desired poloxamer concentrations indicated in w/v (0.01% / 0.05% / 0.1% / 1% and 3%). A typical final reaction volume was 20 µL. The whole mixtures were incubated 30 mn at room temperature prior to be used.

DNA binding assay

For DNA binding assay, 10 μL of each sample were mixed with 2 μL of loading buffer and were electrophoresed in 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide (EtB). Migration was performed for 15 mn at 100 V in TBE 1x. Finally, gel was imaged thanks to a UV trans-illuminator device (Fischer Scientific Bioblock).

Poloxamer:pDNA mixtures for HLV injection

Plasmid pTG11033 was diluted in Tyrode 2x at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Solution of P188:pDNA was prepared by equivolumetric mixing of P188 in water at 6% w/v with plasmid solution. Solution of P407:pDNA was prepared by equivolumetric mixing of P407 in water at 0.1% w/v with plasmid solution. Final poloxamer concentrations of injection solutions were respectively 3% for P188 and 0.05% for P407. Final plasmid concentration was 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Hydrodynamic Limb Vein injection procedure

Prior to HLV delivery, mice were first anesthetized *via* intraperitoneal injection (IP) with a mix of Ketamine/Xylazine (respectively 100 and 10 mg/kg of body weight). The rest of the procedure was done under infrared lamp helping the treated animal to regulate its body temperature. The HLV protocol for one limb was done as follows: the hind limb was shaved and a tourniquet was placed at its proximal part. An incision of 0.5 cm was performed to discover the great saphenous vein. A catheterized needle was then introduced into the latter and the injection solution delivered at a rate of 6.290 mL/mn thanks to a syringe pump Harvard PHD 2000 (Harvard Apparatus). Injected volume was about 1 mL per limb and adjusted in function of the animal weight using the formula: $\text{Volume (ml)} = 1 + ((\text{body weight} - 25)/25 * \frac{1}{2})$. The needle was pulled out of the vein 20 sec post-delivery. The tourniquet was removed 1 mn post-injection. Finally, incision was closed with absorbable suture. After the HLV procedure, the animals received a sub-cutaneous injection of buprenorphine (0.1 mg/kg of body weight).

In vivo Bioluminescence imaging

In vivo follow-up of luciferase transgene expression was performed using bioluminescence Imaging (BLI) at day 3 and 7 post-HLV injection. The procedure for one mouse was performed as follows: the mouse was first injected IP with 200 μ L of luciferin and 2 mn later, the animal was anesthetized using an air/isoflurane mix. At 4 mn post luciferine-IP, mouse was placed in BLI NightOwl device's acquisition chamber (NightOWL NC320, Berthold) and imaged in supine and in prone positions. Results were given as signal surface in pixels (pix) per minimal luminescence intensity threshold in arbitrary unit (AU).

Sacrifices and *ex vivo* luciferase expression measurements

Mice were sacrificed by cervical dislocation and treated hind limbs dissected. Eight muscles or group of muscles were sampled to know, Tibialis; Extensor Digitorum Longus (EDL); Gastrocnemius; Plantaris; Soleus; Quadriceps; Hamstring and Posterior Muscles. Samples were flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C prior analysis. For luciferase activities evaluation, each sample was weighted and dived in 1 mL of Passive Lysis Buffer 0.5x (Promega) prior to be crushed using a MP-Fastprep24 device (MP Biotech). This step was composed by 3 crushing cycles of 40 sec at a speed of 6 m/s, each interspaced of 1 mn incubation on ice. Homogenates were then centrifuged at 2000 g, 4°C , 10 mn. Finally, 25 μ L of supernatant per sample were pipetted for luciferase activity quantification using Luciferase Assay System (Promega). Luciferase activity was expressed in the unit of Relative Light Unit (RLU) per mg of muscle (RLU/mg of muscle).

Statistics

Results are presented as mean of at least 3 measures +/- SD. When stated, the Mann-Whitney test was applied and results considered statistically significant for p value less than 0.05.

Results

DNA binding assay

To investigate the DNA binding capacity of P188 and P407, a DNA retardation assay was performed (**Fig. 1**). Plasmid pGM144 alone was chosen as reference. For positive control, bPEI/pGM144 MR 5 polyplexes were used and as expected, a complete condensation of the plasmid was observed (**Fig. 1A**). For poloxamers P188 and P407, 0.25 µg of pGM144 was mixed with increasing doses of compounds (ranging from 0.01% to 3% w/v). Regardless of the poloxamers concentration, no pDNA shift nor condensation could be detected (**Fig. 1A and B**). Of note, the different mixtures were also assayed for *in vitro* transfection experiments in C2C12 cells (**Fig. S1**). In this context, poloxamers didn't show any transfection activities (**Fig. S1A**) even when a physical force was applied to likely reproduce the hydrodynamic pressure occurring during HLV injection in animals (**Fig. S1B**).

Transfection efficacies of P188 and P407 following HLV injection

Plasmid pTG11033 was used naked (reference), or mixed with P188 or P407. Final compound concentrations in the injection solutions were respectively 3% w/v and 0.05% w/v. Treated mice were imaged using BLI in supine and in prone position at days 3 and 7 post-HLV injection (**Fig. 2**). Transfection efficiencies were measured as luminescence surfaces in pixels (pix) per minimal luminescence intensity thresholds. This quantification method allowed to evaluate the signal distribution all over the treated limb (**Fig. 2A**). In comparison to naked pDNA, at day 3, slight benefits in term of luminescence signals surface were obtained for P188:pDNA mixture. This was particularly true for animals imaged in prone position. However, at day 7, this trend was no longer observed (**Fig. 2B**). For P407:pTG11033 mixture, as for P188, slight benefits in term of luminescence signals surface were obtained at day 3 compared to pDNA alone. At day 7, this trend was still observed, especially in prone position (**Fig. 2C**).

Mice were sacrificed seven days' post-injection and muscles of treated hind-limb were sampled (**Fig. 3A**). Luciferase activities were evaluated per group of treatments prior to be detailed per muscle. Luciferase signals were enhanced with P188 3%:pTG11033 and P407 0.05%:pTG11033 compared to pTG11033 alone (**Fig. 3B**). On average, luminescence

intensities were respectively increased by 286% and 249% for animals that received either P188 or P407. However, such results were not statistically significant. Detailed analysis per muscle revealed that P188 and P407 were able to confer transfection benefits mostly in gastrocnemius and plantaris (**Fig. 3C, muscles 5 and 6**). For these muscles, using P188, luminescence signals were respectively increased by 265% and 1208%. However, results were not statistically significant. For P407, mean luciferase activities enhancement were 451% for gastrocnemius and 517% for plantaris, reaching statistical significance.

Discussion

This work was dedicated to explore the effect of poloxamers in increasing the yield of gene transfer, to mice hind limbs SM, using the potent HLV delivery. The first part of this study was focused on P188 and P407:pDNA binding capacities. In accordance with the literature, no pDNA complexation by using those compounds was evidenced (**Fig. 1**) (17,19). The same holds true for *in vitro* transfection abilities of poloxamers, showing no significant luciferase activities even using a physical force (**Fig. S1**) (20).

The second and main part of this work was dedicated to study the *in vivo* transfection abilities of P188 and P407 following HLV injection. For this purpose, pTG11033 (9.6 kb) was chosen considering the sensitivity of the HLV injection to the size of the delivered nucleic acid constructs. We hypothesized that using small size pDNA e.g pGM144, potential benefits of poloxamers might have been dampened by the already high transfection efficiency conferred by the HLV procedure. Another key point to highlight is the pTG11033 size, close from therapeutic pDNA that could be used in relevant clinical gene therapy contexts dedicated to SM diseases like DMD (6). Poloxamers:pTG11033 mixtures allowed an overall 2.5 folds luciferase signal increases at the limb scale, compared to pTG11033 alone (**Fig. 3B**). This enhancement is less important than the 10 folds increase previously reported following IM delivery of poloxamers:pDNA in mice tibialis anterior (12,17). Some reasons could explain the differences with our results. The first one is that HLV transfection process happens at the limb-scale. Thus, local poloxamer concentration reached in some muscles lodge could be less important than with IM and sub-optimal to confer significant benefits in certain cases. In

support of this hypothesis, in our study, the greatest benefits conferred by P188 and P407 were obtained for plantaris and gastrocnemius muscles (**Fig. 3C, muscles 5 and 6**). Lower leg muscles, especially gastrocnemius, are already known to be the best transfected following HLV injection (6,21). It has been shown by MRI study that transfection efficacies among the muscles more or less correlates with muscle swelling (22). Thus, the increase of gene transfer conferred by P188 and P407 in those muscles might be attributed to a sufficient local concentration of poloxamer reached in this muscle lodge. Supporting this observation, BLI data exhibited greater benefits of poloxamer in prone position, where posterior lower leg muscles are exposed (**Fig. 2**).

The mechanisms of action of poloxamer to increase gene transfer could be varied. It has been shown following IM that such compounds can allow a better homogeneous pDNA distribution among a muscle. It should also be the case following HLV as supported by our BLI results (**Fig. 2B and C**). It has also been shown that these chemicals can create nanopores through the cell membrane. Some poloxamers can also activate cellular pathways enhancing the plasmid nuclear import or activate transgenes transcription. Of note, these two last effects were only observed for compounds with low HLB, which are not the cases of P188 and P407. HLV injection is a potent gene delivery method and hydrodynamic pressure might have limit, to a certain extent, benefits from poloxamers as employed in this study. Also, it should be stressed that using P188 3%:pDNA mixture, a negative deviation by 20% of the injected volume, compared to pTG11033 alone has been measured (**Fig. S2**). This might have limit transfection benefits of P188 3%:pDNA by reducing the amount of delivered plasmid. This phenomenon was probably due to the high viscosity of the P188 3%:pDNA solution. Despite this, P188 conferred similar to better luminescence signals compared to pDNA alone. However, this potential technical limitation should be considered in future studies and it could be interesting to further characterized the viscosity of the injected solutions. This could be achieved by reology studies.

Conclusion

This preliminary study using HLV injection as a non-viral gene transfer approach to deliver poloxamers-based polyplexes showed that slight benefits in term of transfection could be obtained using such combination. This observation was especially true for gastrocnemius and plantaris. Important fact was that poloxamers assayed were not deleterious for skeletal muscles gene transfer following HLV, on the contrary to classic cationic transfection reagents like bPEI (our unpublished data). Thus, poloxamers, and more generally neutral amphiphilic TBCP, could be potent tools to increase the yield of gene delivery using hydrodynamic injection to the limbs. Investigations are currently ongoing in our laboratory to further detail these results. Furthermore, the potential of originals neutral amphiphilic TBCP as efficient transfection reagents to enhance HLV gene transfer is also under evaluation.

References

1. Montier T, Delépine P, Pichon C, Férec C, Porteous DJ, Midoux P. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* 2004 Nov;22(11):586–92.
2. Ramamoorth M, Narvekar A. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J Clin Diagn Res JCDR.* 2015 Jan;9(1):GE01–6.
3. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science.* 1990;247(4949):1465–8.
4. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet.* 1992 Sep;1(6):363–9.
5. Hagstrom JE, Hegge J, Zhang G, Noble M, Budker V, Lewis DL, et al. A Facile Nonviral Method for Delivering Genes and siRNAs to Skeletal Muscle of Mammalian Limbs. *Mol Ther.* 2004 Aug 1;10(2):386–98.
6. Wooddell CI, Hegge JO, Zhang G, Sebestyén MG, Noble M, Griffin JB, et al. Dose Response in Rodents and Nonhuman Primates After Hydrodynamic Limb Vein Delivery of Naked Plasmid DNA. *Hum Gene Ther.* 2011 Feb 22;22(7):889–903.
7. Guilbaud M, Devaux M, Couzinié C, Le Duff J, Toromanoff A, Vandamme C, et al. Five Years of Successful Inducible Transgene Expression Following Locoregional Adeno-Associated Virus Delivery in Nonhuman Primates with No Detectable Immunity. *Hum Gene Ther.* 2019 Feb 27;30(7):802–13.
8. Zhang G, Wooddell CI, Hegge JO, Griffin JB, Huss T, Braun S, et al. Functional Efficacy of Dystrophin Expression from Plasmids Delivered to mdx Mice by Hydrodynamic Limb Vein Injection. *Hum Gene Ther.* 2009 Sep 29;21(2):221–37.
9. Fan Z, Kocis K, Valley R, Howard JF, Chopra M, An H, et al. Safety and Feasibility of High-pressure Transvenous Limb Perfusion With 0.9% Saline in Human Muscular Dystrophy. *Mol Ther.* 2012 Feb;20(2):456–61.
10. Fan Z, Kocis K, Valley R, Howard JF, Chopra M, Chen Y, et al. High-Pressure Transvenous Perfusion of the Upper Extremity in Human Muscular Dystrophy: A Safety Study with 0.9%

Saline. *Hum Gene Ther.* 2015 Sep 1;26(9):614–21.

11. Itaka K, Osada K, Morii K, Kim P, Yun S-H, Kataoka K. Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J Controlled Release.* 2010 Apr 2;143(1):112–9.
12. Bello-Roufaï 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 Feb;35(3):728–39.
13. Pitard B, Pollard H, Agbulut O, Lambert O, Vilquin J-T, Cherel Y, et al. A nonionic amphiphile agent promotes gene delivery in vivo to skeletal and cardiac muscles. *Hum Gene Ther.* 2002 Sep 20;13(14):1767–75.
14. Richard P, Bossard F, Desigaux L, Lanctin C, Bello-Roufai M, Pitard B. Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum Gene Ther.* 2005 Nov;16(11):1318–24.
15. Pomel C, Leborgne C, Cheradame H, Scherman D, Kichler A, Guégan P. Synthesis and evaluation of amphiphilic poly(tetrahydrofuran-b-ethylene oxide) copolymers for DNA delivery into skeletal muscle. *Pharm Res.* 2008 Dec;25(12):2963–71.
16. Rey-Rico A, Cucchiari M. PEO-PPO-PEO Tri-Block Copolymers for Gene Delivery Applications in Human Regenerative Medicine—An Overview. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar;19(3):775.
17. Alimi-Guez D, Leborgne C, Pembouong G, Van Wittenberghe L, Mignet N, Scherman D, et al. Evaluation of the muscle gene transfer activity of a series of amphiphilic triblock copolymers. *J Gene Med.* 2009 Dec 1;11(12):1114–24.
18. Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, Lawton AE, Davies LA, Varathalingam A, et al. CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol.* 2008 May;26(5):549–51.
19. Guiraud S, Alimi-Guez D, van Wittenberghe L, Scherman D, Kichler A. The Reverse Block Copolymer Pluronic 25R2 Promotes DNA Transfection of Skeletal Muscle. *Macromol Biosci.* 2011 May 12;11(5):590–4.
20. Chèvre R, Le Bihan O, Beilvert F, Chatin B, Barteau B, Mével M, et al. Amphiphilic block copolymers enhance the cellular uptake of DNA molecules through a facilitated plasma membrane transport. *Nucleic Acids Res.* 2011 Mar;39(4):1610–22.
21. Guess MG, Barthel KK, Pugach EK, Leinwand LA. Measuring microRNA reporter activity in skeletal muscle using hydrodynamic limb vein injection of plasmid DNA combined with in vivo imaging. *Skelet Muscle.* 2013 Aug 1;3(1):1–9.
22. Vigen KK, Hegge JO, Zhang G, Mukherjee R, Braun S, Grist TM, et al. Magnetic resonance imaging-monitored plasmid DNA delivery in primate limb muscle. *Hum Gene Ther.* 2007 Mar;18(3):257–68.

Figure captions

Figure 1. pGM144 complexation assay using P188, P407 or bPEI 25 kDa. For poloxamer:pGM144 mixtures, various compounds' concentration w/v were used as mentioned on the top of each lane. For bPEI, the mass ratio polymer:DNA was 5 (MR 5). Migration was performed for 15 mn, 100 V, in 0.8% agarose gel stained with EtB.

Figure 2. Quantification of luminescence signal surface/intensity using *in vivo* bioluminescence imaging, principe and measures at days 3 and 7 post-HLV delivery.

(A) Surfaces covered by luminescence signals in function of their intensities were used to compare the transfection efficacies of the different treatments using bioluminescence imaging (BLI). The results were given in signal surface in pixels (pix) per minimal luminescence intensity threshold in arbitrary unit (AU). As illustrated on the bioluminescence image, for a minimal luminescence intensity threshold of 1000 AU (green line), the signal surface was measured in pixels (pix). This was performed by the same way for other thresholds like 5000 AU (red line). Locations of the areas are also indicated on the white-light image. (B) and (C) are respectively the transfection efficacies measured at days 3 and 7 post-HLV injection for P188 3%:pTG11033 and P407 0.05%:pTG11033 compared to pTG11033. Results are mean values +/- SD with the number of treated hind limbs n=6 for pTG11033 or P188 3%:pTG11033 and n=5 for P407 0.05%:pTG11033.

Figure 3. Mouse simplified hind limb anatomy and corresponding *ex vivo* luciferase activities measurements after HLV injection of pTG11033, P188 3%:pTG11033 or P407 0.05%:pTG11033. (A) Anatomy of a mouse hind limb representing the location of the different samples analyzed. The numbers correspond to the following muscles or group of muscles: 1- Tibialis; 2-EDL; 3-Quadriceps; 4-Posterior muscles; 5-Gastrocnemius; 6-Plantaris; 7-Soleus and 8-Hamstring. (B) Mean luciferase signals with pTG11033 alone, P188 3%:pTG11033 and P407 0.05%:pTG11033. Results are given in Relative Light Unit per mg of muscle (RLU/mg muscle) and are mean values of at least 5 treated limbs +/- SD. (C) Mean luciferase signals per sampled muscles. Each number on the top left corner of graphs refers to muscles mentioned in (A). Each dot represents one sample. Results are given in Relative Light Unit per mg of muscle (RLU/mg muscle) and are mean values of at least 3 muscles. *p < 0.05, Mann-Whitney test.

Figures

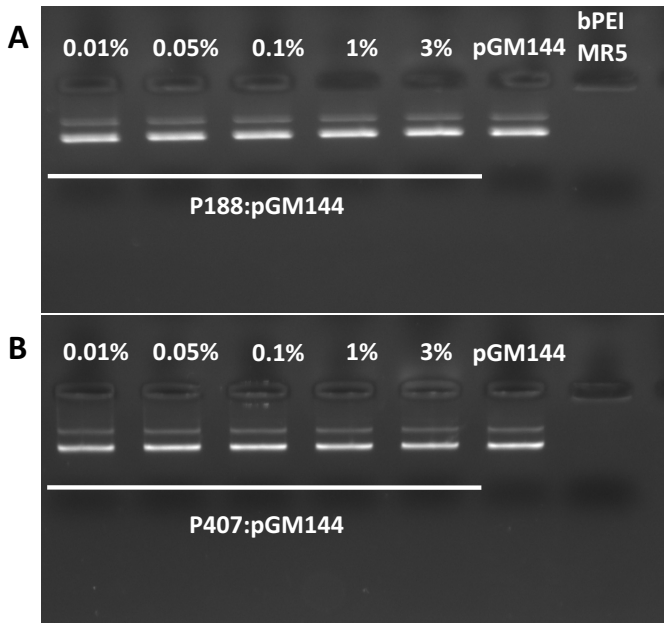


Figure 1. pGM144 complexation assay using P188, P407 or bPEI 25 kDa.

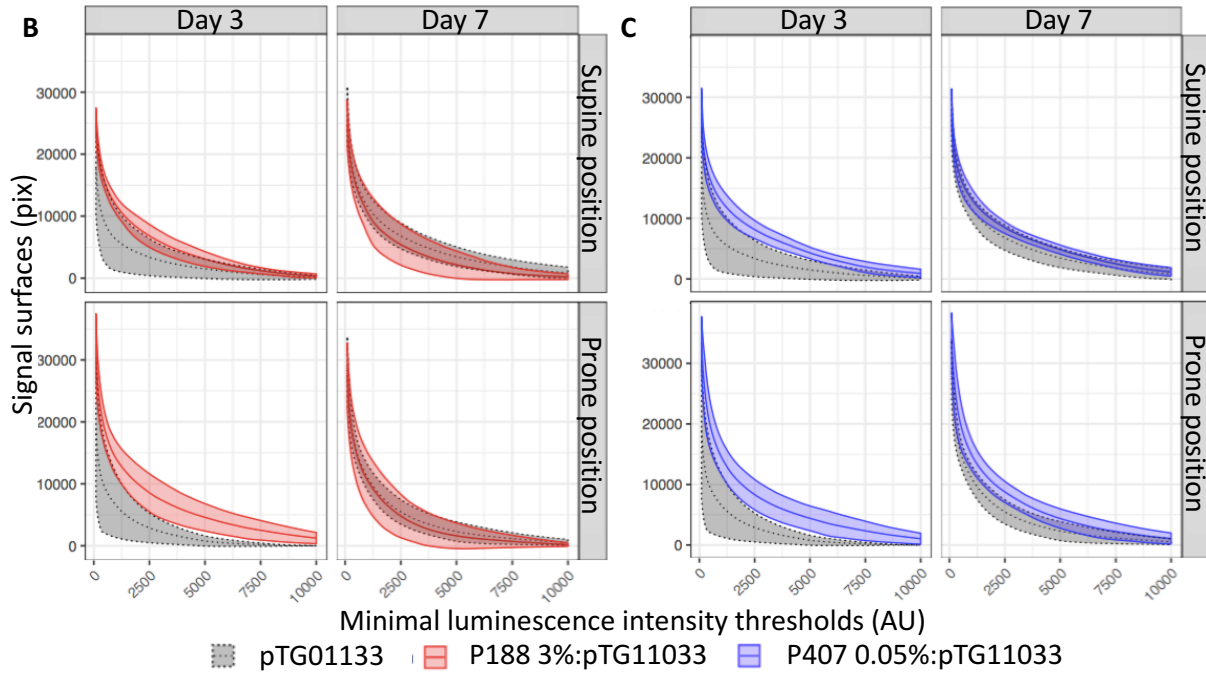
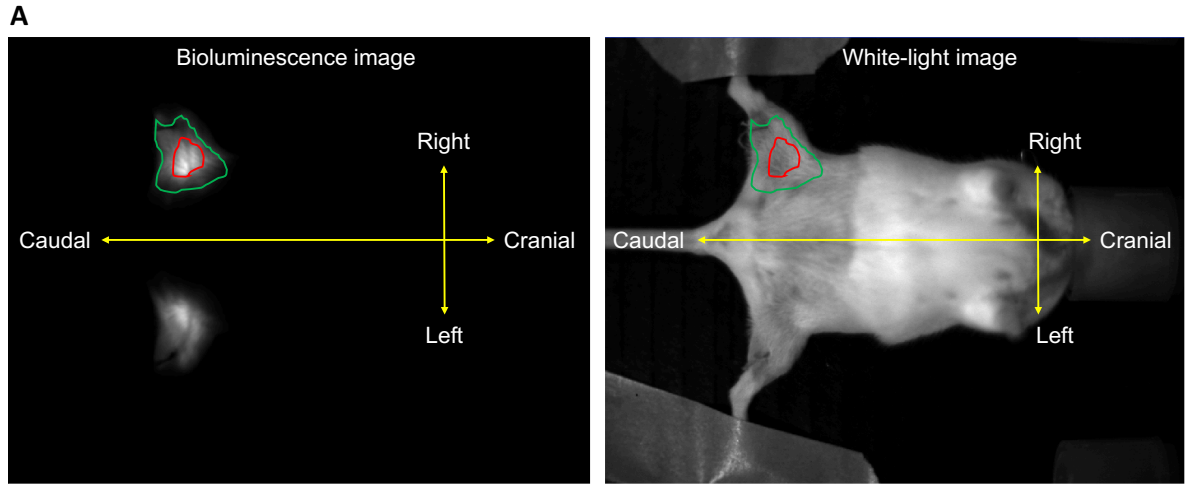


Figure 2. Quantification of luminescence signal surface/intensity using *in vivo* bioluminescence imaging, principle and measures at days 3 and 7 post-HLV delivery.

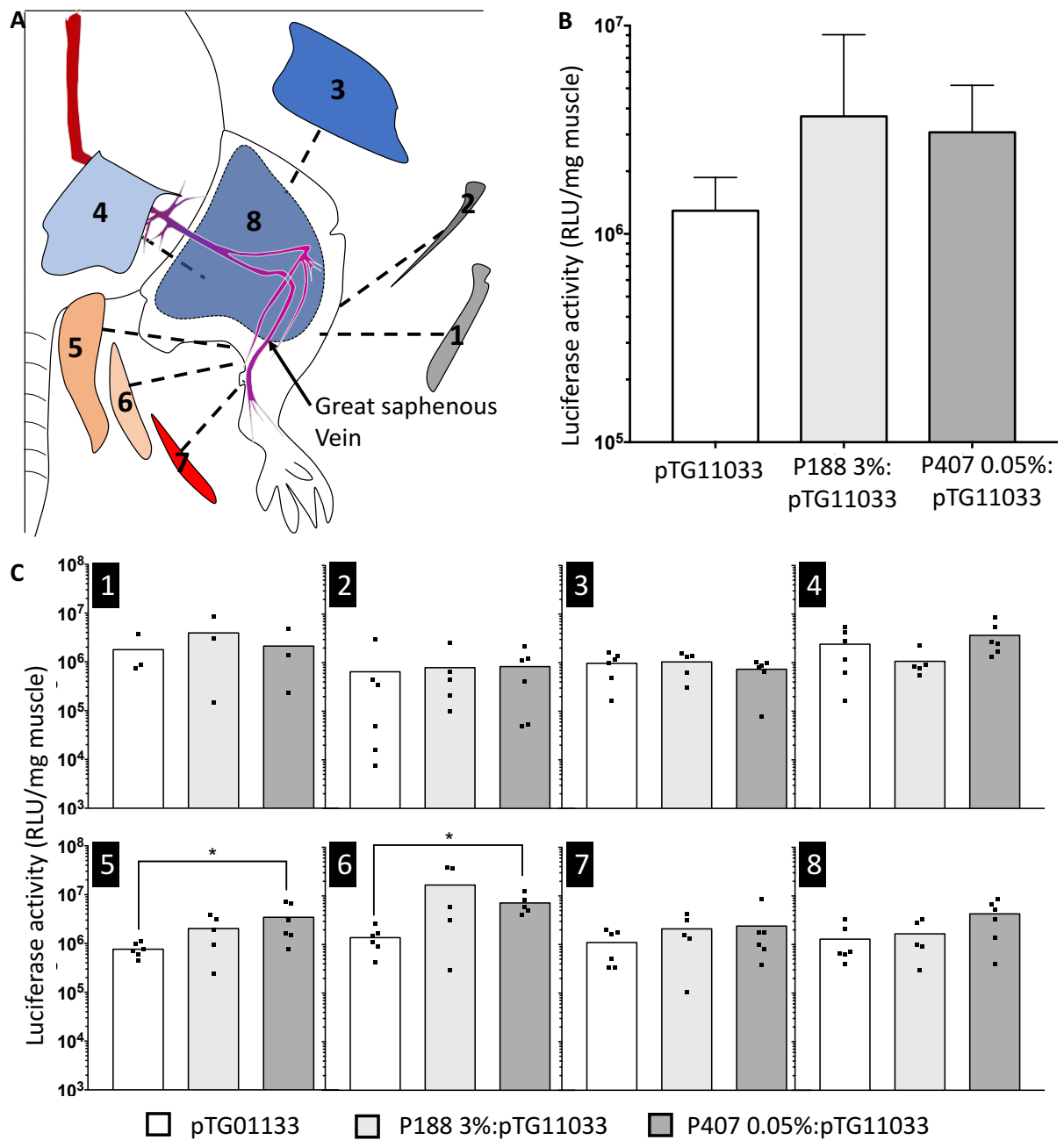


Figure 3. Mouse simplified hind limb anatomy and corresponding *ex vivo* luciferase activities measurements after HLV injection of pTG11033, P188 3%:pTG11033 or P407 0.05%:pTG11033.

Supplementary materials

In vitro poloxamers transfection evaluations

Evaluation of poloxamers *in vitro* gene transfer activities was performed using C2C12 cells (murine myoblast). Cells were seeded 24 h prior transfection in 96 wells plate at 20 000 cells/200 μ L DMEM/ well, and kept at 37°C, 5% CO₂. Transfection was made by deposition of 20 μ L of bPEI/pGM144 MR 5 polyplexes or poloxamer/pGM144 mixtures, corresponding to 0.25 μ g of pGM144 plasmid per well. Transfection was directly followed, or not, by a centrifugation step (30 mn, 500 g at 37°C) likely reproducing the hydrodynamic pressure occurring during the HLV administration process. Transfection efficiency was assayed 24 h later. For this purpose, cell culture medium was removed and then, cell lysis performed using 0.5x Passive Lysis Buffer (Promega). Luciferase expression was measured and expressed in relative light unit (RLU) per mg of protein thanks to the Luciferase Assay System kit (Promega) and the BCA protein assay Kit (Interchim).

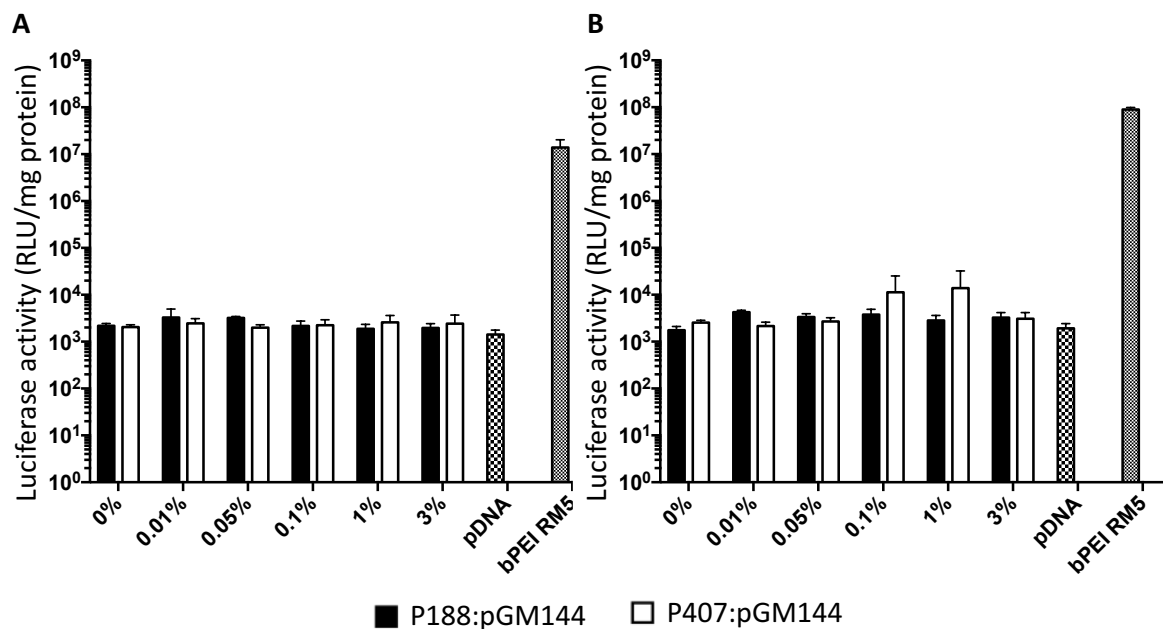


Figure S1. Transfection efficiencies of P188 or P407:pGM144 and bPEI:pGM144 mixtures in C2C12 cells. Transfection efficiencies of P188 or P407:pGM144 mixtures containing different concentrations of poloxamers, and bPEI:pGM144 MR 5 polyplexes were measured at 24 h post-transfection in C2C12. (A) Transfection signals for non-centrifuged cells. Plasmid pGM144

alone, was used as negative transfection control and showed no significant luciferase signals. For bPEI:pGM144 MR 5 polyplexes, used as positive control, a robust luciferase activity was obtained as expected. By contrast, regardless the percentage of compounds contained in transfection mixtures, P188:pGM144 and P407:pGM144 showed no detectable luminescence signal. (B) Transfected cells using centrifugation. As for panel A, pGM144 alone was used as negative control showing no luciferase activity. Positive control bPEI:pGM144 MR 5 polyplexes exhibited a strong luminescence signal. As for non-centrifuged cell, no significant luminescence signals were obtained using poloxamers. For (A) and (B), results are expressed in the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) and are mean values of 3 wells +/- SD.

Poloxamer:pDNA solutions and injected volumes

As poloxamer:pDNA solutions are viscous, effective delivered volumes, using syringe pump, for pTG11033, P188 3%:pTG11033 and P407 0.05%:pTG11033 solutions were assayed. Syringe pump settings were similar to that of used for HLV injections in this study. Delivered volumes were harvested in microtubes and measured thanks to a micropipette. pTG11033 effective volume was chosen as reference.

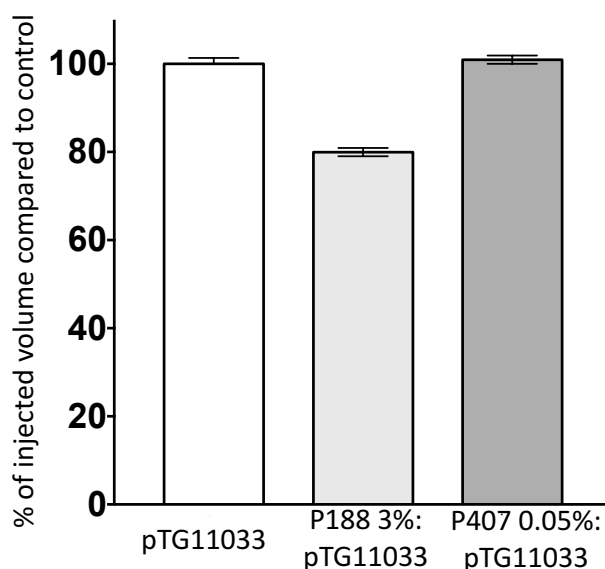


Figure S2. Percentage of injected volume using P188 3%/pTG11033 or P407 0.05%/pTG11033 in comparison to pTG11033 alone. Results are means percentage of volume efficiently delivered by the syringe pump used in this study, compared to a control solution of pTG11033. Values are means of n=3 +/- SEM.

c) Utilisation d'un copolymère tribloc amphiphile neutre original

En plus des poloxamères, il a été montré que d'autres CTAN de type A-B-A permettaient d'augmenter l'efficacité du transfert de gènes aux muscles par voie IM. Ces derniers ont notamment été synthétisés par l'équipe du Professeur Philippe Guégan de l'université Paris Sorbonne. Leur structure est la suivante : pMeOXz- pTHF -pMeOXz. L'un d'entre eux, nommé BR059 a pu être testé au cours de cette thèse.

Des injections IM de BR059 0,1%:ADNp ont été réalisées chez la souris saine de type Balb/c suivant la procédure décrite dans la section « matériel et méthodes » (expérience réalisée au CBM Orléans). La concentration en CTAN était de 0,1% w/v, basée sur des travaux antérieurs. Chaque animal a reçu l'équivalent de 10 µg du plasmide rapporteur luciférase pTG11033 (une nouvelle fois choisi pour sa taille plus proche d'un plasmide thérapeutique pour la DMD que le pGM144). Les efficacités de transfection ont été analysées par bioluminescence *in vivo* sept jours après traitement (analyse réalisée par le Docteur Patrick Baril du CIPA CNRS Orléans). Les souris ont ensuite été sacrifiées puis les muscles traités récupérés afin d'effectuer, *ex vivo*, un dosage de l'activité luciférase. Les résultats suivants ont été obtenus :

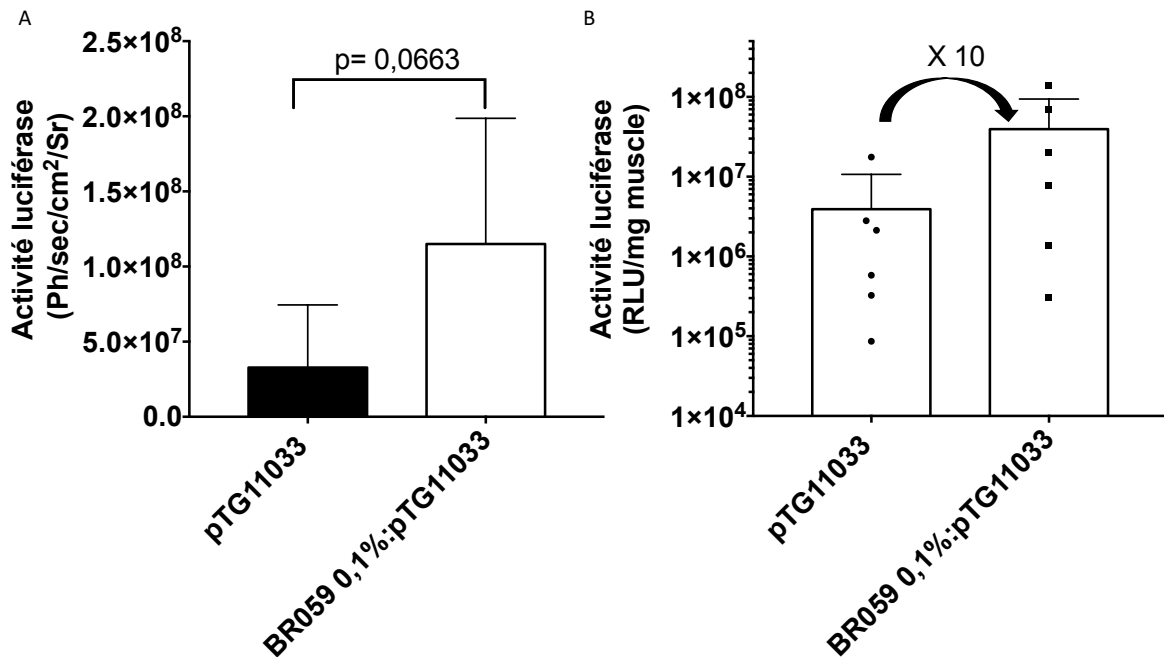


Figure 46 : Injection intramusculaire du plasmide pTG11033 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris Balb/c. Les moyennes des signaux de bioluminescence *in vivo* pour chaque groupe sont représentées en (A). Les moyennes des signaux de luminescence *ex vivo* sont représentées en (B). Chaque barre d'histogramme représente la moyenne du signal de luminescence +/- SD avec un nombre de patte traitées par groupe n= 6.

Par voie IM, les signaux de bioluminescence *in vivo* sept jours après administration révèlent un bénéfice en efficacité de transfection en faveur du groupe BR059 0,1%:pTG11033 comparativement au plasmide pTG11033 seul (**figure 46A**). Les bénéfices obtenus sont proches d'être statistiquement significatifs. Les analyses réalisées sur broyats des muscles tibialis antérieurs, suivent la même tendance (**figure 46B**). Une différence de l'ordre d'un facteur dix en faveur du traitement utilisant le BR059 est constatée.

Cette expérience confirme que le CTAN original testé est capable de conférer un bénéfice en termes d'efficacité du transfert de gènes aux muscles squelettiques par voie IM. Le même composé a donc été injecté par voie HLV chez la souris saine de type Swiss, suivant le protocole détaillé dans la section « matériel et méthodes ». La concentration en bloc copolymère contenue dans la solution d'injection était de 0,1% w/v et la concentration en pTG11033 de 50 µg/mL.

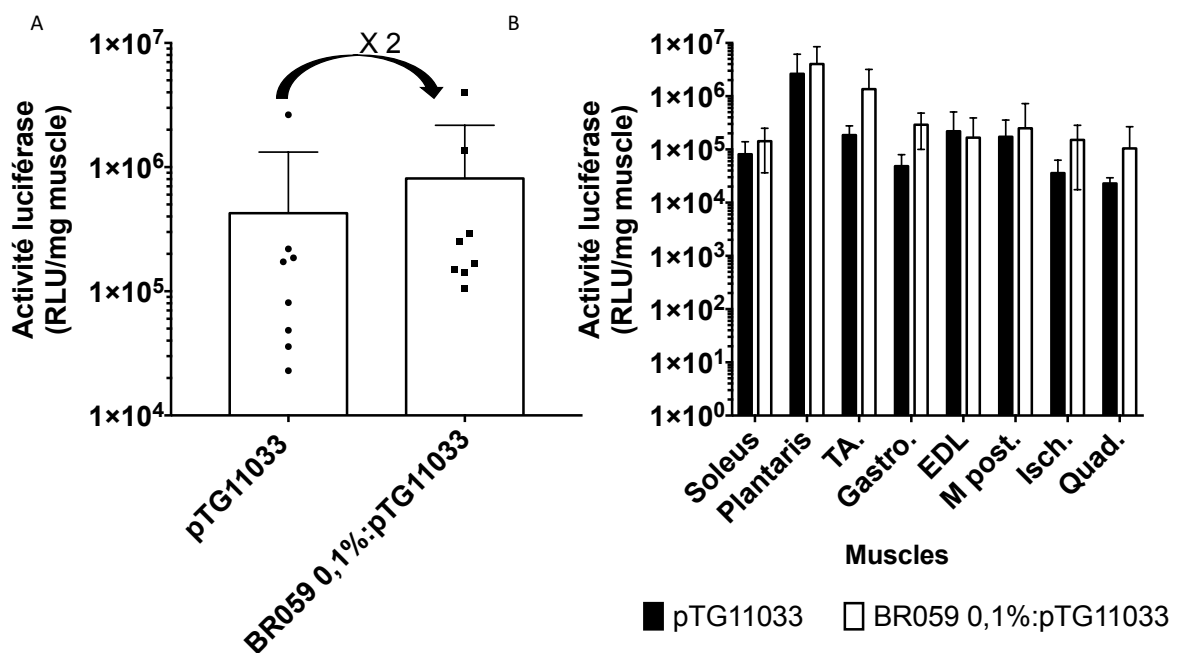


Figure 47 : Signaux de luminescence *ex vivo* 7 jours après injection HLV du plasmide pTG11033 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris Swiss. Les moyennes des signaux de luminescence pour chaque groupe sont représentées en (A). Les moyennes des signaux de luminescence pour chaque muscle récupéré sont représentées en (B). Les résultats correspondent à la moyenne des valeurs de luminescence +/- SD en Relative Light Unit par mg de muscle (RLU/mg muscle). Pour le groupe ADN nu, nombre de patte traitée n=2 ; pour le groupe BR059 n=4. « X » représente le facteur d'augmentation des signaux de luminescence du groupe BR059 comparé au groupe pTG11033 seul. TA, tibialis antérieur ; Gastro, gastrocnemius ; M post, muscles postérieurs ; Isch, ischio-jambiers ; Quad, quadriceps.

Les données de luminescence *ex vivo* par groupe montrent une supériorité du traitement BR059 comparativement à l'ADN seul (**figure 47A**). Le signal de luciférase détaillé muscle par muscle révèle de la même manière une augmentation de l'intensité de luminescence par muscle analysé pour le groupe BR059 (**figure 47B**). Ces résultats tendent à confirmer ceux précédemment obtenus par voie IM, même si les bénéfices sont moins importants.

Le BR059 semblant améliorer l'efficacité du transfert de gènes avec un plasmide comportant un gène rapporteur par administration HLV, le CTAN a été testé dans un cadre préclinique plus pertinent. Des injections HLV du plasmide pTG14860, codant une mini-dystrophine murine ont été effectuées chez la souris *mdx* (telle que décrite dans la section matériel et méthodes). Les injections ont été réalisées en administrant 200 µg de pTG14860 nu ou avec BR059 0,1%. Les animaux participant à l'expérience ont été sacrifiés six jours post-injection. Les muscles récupérés, au nombre de cinq (EDL, Tibialis antérieur, Gastrocnémus, Quadriceps et Soleus) ont été analysés par immunohistochimie (Plateforme Apex, Dr Thibaut Larcher, Oniris, Nantes). Les résultats suivants ont pu être objectivés :

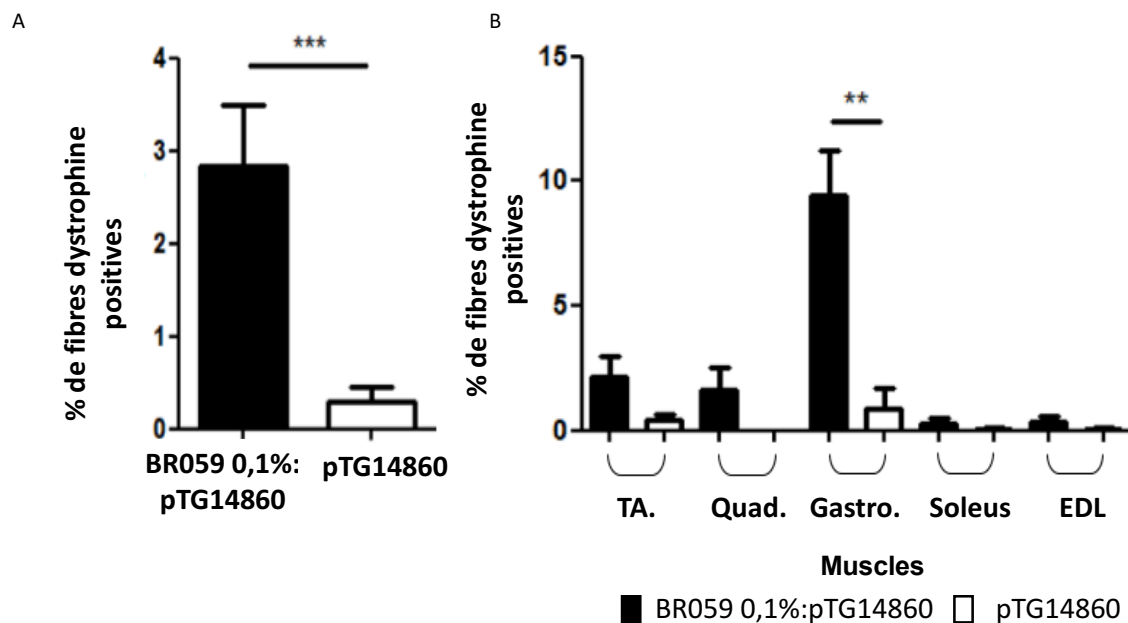


Figure 48 : Fibres musculaires positives au transgène mini-dystrophine 6 jours après injection HLV de 200 µg de pTG14860 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris *mdx*. Les moyennes des pourcentages de fibres positives au transgène mini-dystrophine par traitement sont indiquées en (A). Les moyennes des pourcentages de fibres positives au transgène mini-dystrophine détaillées par muscle pour chaque traitement sont indiquées en (B). Les valeurs sont présentées +/- SEM avec un nombre de patte par groupe n=10. *p < 0,05, t-test. TA, tibialis antérieur ; Gastro, gastrocnemius ; Quad, quadriceps.

Les résultats obtenus en immunohistochimie révèlent un pourcentage de fibres positives au transgène mini-dystrophine d'environ 3% pour le groupe de souris ayant reçu le BR059 0,1% contre environ 0,5% pour le plasmide seul (**figure 48A**). La quantification détaillée des myofibres positivement marquées pour le transgène révèle que pour chaque muscle prélevé, le CTAN confère un bénéfice en termes d'efficacité de transfection (**figure 48B**). Les différences objectivées sont d'ailleurs statistiquement significatives pour le gastrocnemius avec près de 10% de fibres positives au transgène pour le groupe BR059.

Le copolymère démontrant un bénéfice en transfection comparativement au pTG14860 seul, le potentiel d'un effet additif par ré-administrations a été exploré. Des souris *mdx* ont ainsi reçu trois injections HLV à dix jours d'intervalle du pTG14860 seul ou accompagné de BR059 0,1%. Les animaux ont été sacrifiés trente jours après primo-administration. Les résultats suivants ont été obtenus :

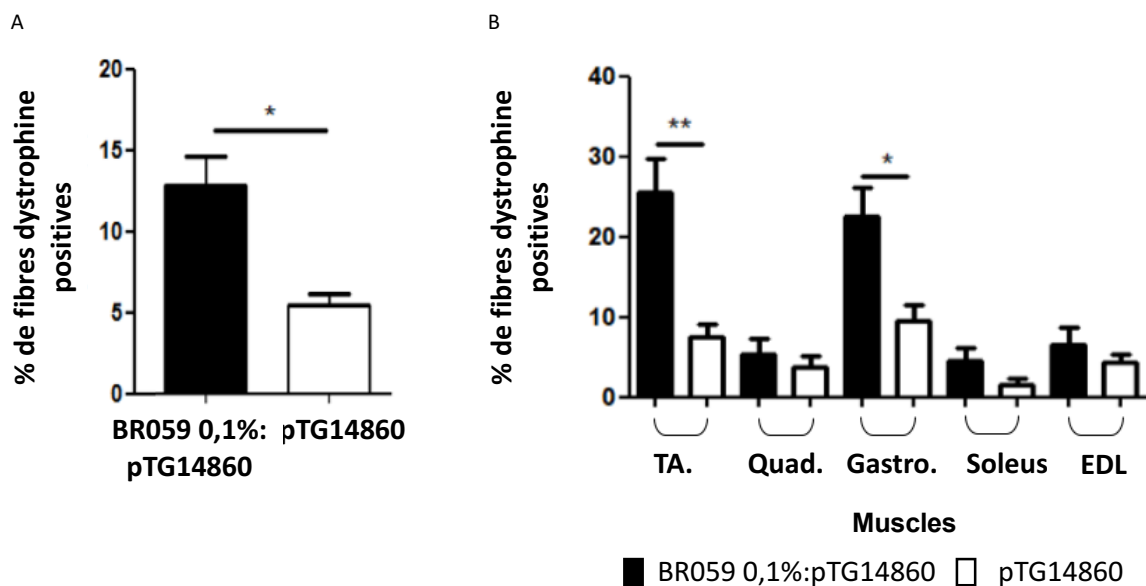


Figure 49 : Fibres musculaires positives au transgène mini-dystrophine après 3 administrations HLV de 500 µg de pTG14860 nu ou avec BR059 à 0,1% chez la souris *mdx*. Les moyennes des pourcentages de fibres positives au transgène mini-dystrophine par traitement sont indiquées en (A). Les moyennes des pourcentages de fibres positives au transgène mini-dystrophine détaillées par muscle pour chaque traitement sont indiquées en (B). Les valeurs sont présentées +/- SEM avec un nombre de pattes par groupe n=10. *p < 0,05, t-test. TA, tibialis antérieur ; Gastro, gastrocnemius ; Quad, quadriceps.

L'analyse immunohistochimique révèle un pourcentage de fibres positives à la mini-dystrophine d'environ 13% pour le groupe de souris ayant reçu le BR059 0,1% contre environ 5% pour le plasmide seul (**figure 49A**). L'analyse muscle par muscle démontre un bénéfice du

CTAN statistiquement significatif pour le tibialis antérieur (environ 25% de fibre dystrophine positive pour BR059 contre environ 7% pour l'ADN seul) et le gastrocnemius (environ 20% de fibre dystrophine positive pour BR059 contre environ 10% pour l'ADN seul). Quel que soit le muscle prélevé, des bénéfices sont obtenus en faveur du groupe de souris traitées avec le CTAN **(figure 49B)**.

L'injection simple ou multiple du mélange BR059 0,1%:pTG14860 confère un bénéfice en termes de transfection par injection HLV comparativement au plasmide seul. Dans le contexte des ré-administrations, un effet additif des bénéfices est d'ailleurs constaté. Ce phénomène est particulièrement important car il permet de se rapprocher du seuil en fibres musculaires transfectées défini comme conférant un réel bénéfice clinique (40%).

3) Injection HLV et facilitation de l'import nucléaire par utilisation de « DTS »

Dans la revue : « **Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations** » différentes étapes potentiellement limitantes pour le transfert non-viral de gènes par administration HLV ont été envisagées. L'une d'entre-elles est l'étape de translocation du plasmide dans le noyau. Cette dernière s'avérait relativement limitante en l'absence de division cellulaire, obligeant le plasmide à passer par le complexe du pore nucléaire (Bai et al. 2017). Les myocytes, principales cibles de l'injection HLV, étant des cellules terminales, le transfert de gènes par cette méthode d'administration se heurte à ce « goulet d'étranglement ».

De manière générale, il existe un moyen répertorié dans la littérature pour augmenter la translocation des plasmides dans le noyau. Il s'agit de l'utilisation de DTS. Celles-ci sont de courtes séquences d'ADN capables de fixer un facteur de transcription permettant d'aider à l'import nucléaire du plasmide. Cette approche a déjà été employée avec succès dans divers contextes, notamment l'administration hydrodynamique à destination du foie (Gonçalves et al. 2009; Breuzard et al. 2008; Mahindhoratep et al. 2014). À notre connaissance, l'utilisation de DTS couplée à l'injection HLV n'est pas encore répertoriée dans la littérature. En exploitant cette piste, l'augmentation de l'efficacité du transfert de gènes par injection hydrodynamique *via* la saphène a donc été explorée dans le cadre de cette thèse.

Pour cette étude, un plasmide luciférase comportant des DTS spécifiques du facteur de transcription NFκB (plasmide pLo2, aussi appelé p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (voir section « matériel et méthodes ») a été choisi, partant du principe que le stress cellulaire engendré, dans divers contextes de transfection, dont l'administration HLV activerait la voie NFκB. Pour étudier le potentiel bénéfique conféré par pLo2 en transfection, une famille de plasmides dérivés, comportant ou non les DTS, a été mise au point. Les différents ADNp ont par la suite été caractérisés avant d'être testés dans différents contextes *in vitro*, puis enfin, *in vivo* par injection HLV chez la souris Swiss. L'injection hydrodynamique permettant l'administration d'ADN nu, permet ainsi d'évaluer le potentiel des DTS sans interférences liées à l'utilisation d'un vecteur. Ces résultats ont donné lieu à la rédaction d'un manuscrit en préparation : « **DNA nuclear targeting sequences for enhanced non-viral gene transfer – An *in vitro* and *in vivo* study** ».

DNA nuclear targeting sequences for enhanced non-viral gene transfer – An *in vitro* and *in vivo* study

Authors section: Yann T Le Guen¹ et al.

¹ Univ Brest, INSERM, EFS, UMR 1078, GGFB, F-29200 Brest, France

Abstract

An important bottleneck for non-viral gene transfer commonly relates to transgene translocation into the nucleus of target cells. 3NFs are optimized sequences able to bind NFκB and previously reported to enhance plasmid nuclear import. In this work, we designed a family of six plasmid DNA only varying according to their equipment in such sequences. This consistent set of nucleic acids constructions was carefully evaluated under various experimental settings. *In vitro*, polymer-assisted pDNA delivery was investigated in several human-derived cell lines. *In vivo*, the hydrodynamic delivery of naked pDNA to mouse muscle hind limbs was used to make a direct, relevant and accurate pDNA comparative, without any eventual carrier-related transfection interferences. Altogether, the results obtained emphasized the implications of various parameters on NFκB-mediated pDNA nuclear import. This allows to show that, under specific conditions, 3NFs could provide modest to substantial advantages for pDNA gene transfer in different cellular contexts, both *in vitro* and *in vivo*. This study thus further underscores the potential of optimized nuclear import for more efficient non-viral gene transfer applications.

Keywords: hydrodynamic limb vein injection; NFκB; nuclear import; plasmid DNA; skeletal muscle; transfection

Introduction

Gene therapy consists in bringing a nucleic acid to target cells in order to supply and/or to correct a genetic defect responsible for a disease.¹ To deliver a therapeutic transgene, several methods – classically dichotomized as viral and non-viral – can be used.^{2,3} Viral gene delivery strategies can be particularly efficient to transduce cells and were employed in most of the gene therapy clinical trials conducted so far.⁴ However, viral-based carriers are also usually characterized with some drawbacks, to know *(i)* the induction of an host immune response against the vector, *(ii)* a limited encapsidation capacity, and *(iii)* both costly and difficult production/quality assessments.⁵ Much less concerned by such limitations, non-viral gene transfer strategies – which can make use of cationic lipids/polymers or amphiphilic triblock copolymers^{6–10} – have however a much lower yield of transfection, especially due to a limited access to the transcriptional machinery of target cells. *In vitro* experiments indeed showed that 24 to 36 h post transfection, only 1 to 10 % of the intracytoplasmic copies of a given plasmid DNA (pDNA) successfully entered into the nucleus.¹¹

To help the nuclear import, DNA nuclear Targeting Sequences (DTS), which are short consensus motifs recognized by specific transcription factors, can be used to actively shuttle – upon activation – a pDNA from the cytosol to the nucleus. Once inside the cytosol, a pDNA equipped with DTS motifs may thus bind to a transcription factor and be moved to the nucleus *via* an importin-mediated process. For instance, the SV40 enhancer (which contains a 72-base pairs (bp) sequence) can be used as DTS since it binds to various transcription factors such as Oct1.¹¹ Other DTS sequences binding the NFκB transcription factor have also been described, e.g. a NFκB optimized DTS motif named “3NF” consisting of three 10-bp κB sites interspaced with a 5-bp optimized spacer.^{12,13} The insertion of two 3NFs in the sequence of a pDNA triggered its efficient, NFκB-mediated nuclear import, as demonstrated through qPCR and

confocal microscopy analyses.^{12,14} Moreover, it was also shown that such 3NF-equipped pDNA mediated a longer sustained gene expression in the liver upon hydrodynamic tail vein injection (HTV) in mice.¹⁴ Such pDNA also proved to yield more efficient gene transfection to skeletal muscle by intramuscular injection followed or not by electroporation.¹³ Beyond this, such 3NF motifs could be beneficial in some diseases characterized with constitutive activation of NFκB pathway.¹⁵ In some conditions, the gene transfer procedure itself could also trigger the NFκB pathway, thus potentially contributing to an active nuclear import of 3NF-bearing pDNA. Hydrodynamic Limb Vein (HLV) injection is a loco-regional physical gene delivery method invented by Jon wolff.¹⁶ This procedure allows to transfect the whole musculature of a given limb isolated by a tourniquet *via* the high-pressure injection of a great volume of solution containing a transgene. HLV has been demonstrated to be safe and clinically relevant.^{17,18} By this method, some naked pDNA can be delivered with a certain efficacy.¹⁹ This makes HLV particularly relevant to study DTS effect, since the use of vectorization system cannot interfere in the gene transfer process. Also, the targeted tissue is ideal for such study since skeletal muscle fibers are non-dividing cells. As a consequence, pDNA translocation into the nucleus cannot rely on nuclear envelope breakdown. Furthermore, this tissue represents a challenging relevant study model and an interesting therapeutic target for non-viral gene delivery since it can be affected by some monogenic disorders like dystrophies.

This study was first devoted to design a consistent set of fully comparable pDNA varying only according to their equipment in 3NF motif(s). These constructions were assayed in a series of experimental conditions, both *in vitro* (using human-derived cell lines originating from diverse organs and tissues) and *in vivo* (using a clinically relevant delivery method to target mouse skeletal muscles). All combined, the data obtained allowed to unveil the

potential specific contribution of DTS for non-viral gene transfer, notably for targeting skeletal muscle cells.

Results

Introducing the 3NF DTS plasmid family

The parental p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (**Figures 1A and S1**) carries (i) a luciferase gene under control of the strong CMV promoter and (ii) 3NF₁ and 3NF₂ respectively upstream and downstream of that reporter gene cassette. Starting from this plasmid, five derivatives were designed (**Figure 1**) by sequential replacement of 3NF₁ and/or 3NF₂ by scramble sequences named Scr₁ and Scr₂, respectively, which showed no similarities with any known DNA consensus sequences according to NCBI Blast. The plasmids p(Scr₁-Luc-3NF₂)m (**Figure 1B**) and p(3NF₁-Luc-Scr₂)m (**Figure 1C**) were first obtained, then p(Scr₁-Luc-Scr₂)m was derived from p(Scr₁-Luc-3NF₂)m (**Figure 1D**). Plasmids were checked by agarose gel electrophoresis, PCR and Sanger sequencing (**Figure S2**). As for concatemers, they were designed following a straightforward (enzymatic cut then ligation) protocol using corresponding monomers. Thus, p(3NF₁-Luc-3NF₂)c and p(Scr₁-Luc-Scr₂)c twice the size of monomers were obtained (**Figure 1E and F**). The plasmids used in this study (4 monomers or 2 concatemers) thus formed a consistent set with a strictly identical size/backbone and varying only by the presence or absence of 3NF DTS (thus, sharing at least 97% of sequence homology). Investigations using this material allowed to underscore fine effect, attributable to the equipment in DTS sequence(s), in terms of transfection efficiency as assessed *via* highly sensitive luminescence measurements.

In vitro investigations

Plasmids were first assayed under a range of *in vitro* conditions using various cell lines. Since *in vitro* transfection requires the use of a gene carrier, two different synthetic cationic vectors

were chosen i.e. the well-characterized 25 kDa branched PEI (bPEI) and a histidinylated bPEI derivative (25 kDa His-bPEI). Histidinylated PEI has been shown to reduce PEI toxicity,¹⁰ enhancing its buffering capacity, thus facilitating the endosomal escape, key step of gene transfer. For pDNA complexation by cationic polymer, a mass ratio (MR) consisting of a mass of polymers / mass of pDNA was defined. Thus, we considered gel retardation assay using either of the 2 cationic polymers, in order to determine the minimal MR from which a complete DNA retardation could be obtained. For bPEI, this MR was 0.5 whereas it was 5 for His-bPEI (**Figure S3**). To use comparable doses of compounds, for both polymers, MR 5 was used in all subsequent experiments.

NF- κ B-assisted *in vitro* transfection: proof of principle

As above mentioned, 3NF DTS used in this work were previously reported to increase transfection efficacy by improving pDNA nuclear translocation.^{12,14} It is noteworthy that, in those studies, the pDNA assayed contained a luciferase cassette under control of the weak TAL promoter whereas in the present work, a CMV promoter was used. To obtain a proof of principle of 3NF-assisted gene transfer with our pDNA constructs, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m were transfected in different cellular contexts, including HeLa (Human epithelial ovarian carcinoma cells), SK-Mel-28_ (Human melanoma cells) and 16HBE (human bronchial epithelial cells) (**Figures 2 and S4**). His-bPEI was chosen as a carrier given its properties, comprising a low toxicity profile. Transfection was done in absence or in presence of TNF- α , a cytokine triggering NF κ B pathway. Of note, the concentrations assayed were in the same range as used in other related studies.^{12,20} Luminescence signals were evaluated shortly (i.e. 24 h) after transfection to limit any effect of cell division. In absence of TNF- α mediated NF κ B activation, no differences in luciferase activity could be seen between plasmids (**Figure 2A and B**). However, in presence of pro-inflammatory cytokine, differences

in favor of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m could be observed. Benefits were increased with TNF- α concentration and were statistically significant in most of the cases for HeLa (**Figure 2A**) and SK-Mel-28 (**Figure 2B**) cells. For the highest cytokine concentration assayed, nearly 3-fold enhancement of the luciferase signal was obtained for p(3NF₁-Luc-3NF₂)m compared to basal condition. These results were confirmed in 16HBE cells, though smaller benefits were obtained (**Figure S4**). It is noticeable that a slight, but non-significant, enhancement of luminescence signal could be detected with p(Scr₁-Luc-Scr₂)m while increasing the TNF- α concentration. This was likely attributable to some activation of transcriptional processes *via* non-optimized NF κ B sites present in the CMV enhancer/promoter region of the plasmid backbone (**Figure S5**).²¹

Can the transfection procedure itself increase the *in vitro* gene transfer helped by 3NF DTS?

To answer this question, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m, p(Scr₁-Luc-3NF₂)m, p(3NF₁-Luc-Scr₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m were challenged in an escalation dose study using His-bPEI or bPEI. These two vectors were interesting for such a study because (i) bPEI has been shown to allow NF κ B translocation into the nucleus and (ii) that this process could be inversely correlated to endosomal buffering capacity of the carrier.^{22,23} We assumed that His-bPEI should have a smaller ability to trigger the NF κ B pathway than bPEI. Transfection were carried out in SK-Mel-28 and in C2C12 (**A549, available in Figure S6**).

For His-bPEI, transfection study with SK-Mel-28 revealed for the smallest pDNA dose an advantage of p(Scr₁-Luc-Scr₂)m compared to p(3NF₁-Luc-3NF₂)m. p(Scr₁-Luc-3NF₂)m, p(3NF₁-Luc-Scr₂)m gave consistent in-between luciferase activities. Differences in luminescence signals previously observed quickly disappeared at a dose of 0.20 μ g pDNA per well. Then, a switch in favor of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m started from 0.26 μ g and benefits increased

when increasing pDNA doses (**Figure 3A**). Cell survival profiles were comparable between constructs, starting from 100% for the smallest doses to reach 40% at 0.50 μg of pDNA/well (**Figure 3B**). For C2C12 transfection using His-bPEI, an advantage of p(Scr₁-Luc-Scr₂)m compared to p(3NF₁-Luc-3NF₂)m was observed from 0.16 to 0.26 μg of pDNA/well. As for SK-Mel-28, p(Scr₁-Luc-3NF₂)m and p(3NF₁-Luc-Scr₂)m provided intermediate luminescence signals. While increasing the pDNA dose, transfection efficiencies of constructs turned similar (**Figure 3C**). Cell survival was stable above 80% for every experimental condition (**Figure 3D**). Luciferase activity profiles observed with A549 confirmed these results, with an overall cell survival of 100% (**Figure S6A and B**)

For bPEI, the best luminescence signals in SK-Mel-28 were obtained with p(3NF₁-Luc-3NF₂)m compared to p(Scr₁-Luc-Scr₂)m whereas p(Scr₁-Luc-3NF₂)m and p(3NF₁-Luc-Scr₂)m exhibited, as previously, luminescence values in-between to really close to that of p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (**Figure 3E**). On the contrary to His-bPEI, the cell viability started at 60% for the lowest pDNA dose and decreased quickly (**Figure 3F**). C2C12 cells transfected with bPEI polyplexes, showed luciferase signals consistently in favor of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m. The benefits of the DTS plasmid were enhanced with the dose of pDNA per well (**Figure 3G**). Cell viability was above 60% for the lowest pDNA doses and progressively decreased to 40% (**Figure 3H**). Similar transfection profiles were obtained in A549 cells, with a cell survival comprised between 90% and 70% (**Figure S6C and D**).

Thus, the transfection process was sufficient by itself to provide benefits for gene transfer using NF κ B DTS. (Those results were supported with bPEI assisted transfection of 0.25 μg of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, following a time course study during 48 h in C2C12 and A549 cells (**Figure S7A and B**)). Comparison of His-bPEI and bPEI in terms of cell viability confirmed that His-bPEI was less toxic than bPEI. Also, in accordance to hypothesis

concerning the link between vectors endosomal buffering capacity and NFkB elicitation, bPEI seemed more efficient to trigger NFkB pathway. Thus, this carrier was kept in following experiments. Further, since p(Scr₁-Luc-3NF₂)m and p(3NF₁-Luc-Scr₂)m provided intermediate results between the 3NF equipped or devoid pDNA, our study then focused on p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m.

Are corticoids deleterious for cell transfection when using 3NF-pDNA?

Since NFkB pathway is activated in some human diseases, 3NF DTS may represent “helper sequences” for expecting an active nuclear import in such pathological contexts. Conversely, corticoids included in the treatment of the same pathologies could inhibit NFkB, thus eliminating the expected benefit of 3NF. To address this contradiction, the effect of a corticoid pretreatment towards the transfection efficiencies of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m in mixture with bPEI was assayed. Dexamethasone, known to induce IκBα – a cytoplasmic inhibitor of NFkB – was used over a range of concentrations added 30 min before transfection.^{24,25} Twenty-four hours after transfection, no statistically significant differences between the pDNA constructions delivered, with or without dexamethasone, could be measured (**Figure 4A**). Luciferase signal was increased for both pDNA. Considering the differences in term of luminescence compared to dexamethasone-free control, luciferase signals were significantly enhanced from a corticoid dose of 1 ng/μL (**Figure 4A**). Cell viability remained around 80% for dexamethasone doses up to 2.67 ng/μL, before sharply decreasing down to about 50% at the highest dose used (**Figure 4B**). Similar transfection results were obtained in A549 cell line, with an overall viability of 80% for every corticoid dose tested (**Figure S8A and B**).

In vivo Investigations

HLV injection is particularly relevant to *in vivo* assay any effect of DTS since (i) naked pDNA can be efficiently transfected by this method and (ii) myofibers are non-dividing cells. Furthermore, expression kinetics of the administrated pDNA constructs could be followed by *in vivo* bioluminescence imaging (BLI) (**Figure S9A**). Thus, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, p(3NF₁-Luc-3NF₂)c and p(Scr₁-Luc-Scr₂)c were assayed under different HLV injection contexts.

Is 3NF-equipped pDNA more efficient for skeletal muscle transfection following HLV delivery?

Healthy Swiss mice, exempt of any pathological inflammation process, received HLV injection of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. In such condition, NFκB activation should only result from HLV injection (**Figure S10**), knowing that it was previously shown that HTV administration can activate the NFκB pathway.²⁶ Injections were done in both hind-limbs with doses of 0.5 μg of pDNA per leg, a suboptimal dose according to our experience. Thus, a progress margin was kept for transfection efficacy, allowing to unveil some DTS effect. Luciferase expression was followed by BLI and about one week after treatment, mice were sacrificed. Eight muscles per limb were harvested for analysis (Simplified anatomy of a mouse leg showing localization of sampled muscles is available in **Figure S9B**).

BLI revealed a trend in favor of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m as compared with p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (**Figure 5A**). This observation was confirmed with luminescence measurements on muscle homogenates. Though results did not show any statistically significant differences, mean of ratio p(3NF₁-Luc-3NF₂)m / p(Scr₁-Luc-Scr₂) was 2.39 (**Figure 5B**). The luminescence signal's distribution across the sampled muscles was similar for both plasmids.

As a trend in favor of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m was observed, plasmid dose influence was questioned. Thus, a dose 10 times higher was then assayed, Swiss mice receiving 5 µg of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m per hind limb. Compared to the previous dose, BLI signals were about 1 log higher (**Figures 5A and 6A**). These results were also confirmed on muscle homogenates (**Figures 5B and 6B**). Muscle by muscle analysis also revealed, a trend in favor of the 3NF equipped pDNA in each muscle. Despite non-significant results, the mean of the luminescence ratio p(3NF₁-Luc-3NF₂)m / p(Scr₁-Luc-Scr₂)m was 3.57 (**Figure 6B**).

Does the size matter?

Transfection yield following HLV delivery has been shown sensitive to the size of the pDNA delivered.²⁷ Our so-called monomer pDNA constructions were relatively small (5,556 bp) and could potentially move easily through the cytoplasm to reach the nucleus, thanks to the hydrodynamic effect. We hypothesized that in such condition, DTS effect could be dampen or even useless providing no substantial benefit in term of transfection efficiency. Considering this, we hypothesized that 3NF DTS could provide greater enhancement to gene transfer by HLV when using plasmid of a much greater size.^{28,29} p(3NF₁-Luc-3NF₂)c and p(Scr₁-Luc-Scr₂)c (11,112 bp), bearing respectively four 3NFs *versus* no DTS sequences, respectively, were administrated following HLV delivery in Swiss mice. It is noteworthy here that such concatemers exhibit a size closer to that of therapeutic plasmids that could be used for muscular diseases like Duchenne Muscular Dystrophy (DMD). As there were no noticeable influence of the plasmid dose in term of luminescence between monomers in our previous *in vivo* experiments, an injection dose of 0.5 µg of pDNA per limb was used. BLI of mice injected with p(3NF₁-Luc-3NF₂)c or p(Scr₁-Luc-Scr₂)c revealed a trend in favor of the first. Here again, differences were not statistically significant but tend to be greater than those with monomers (**Figure 7A**). Luminescence signals obtained *ex vivo*, confirmed these results. Mean of

luminescence ratio of p(3NF₁-Luc-3NF₂)c / p(Scr₁-Luc-Scr₂)c was 3.56 (**Figure 7B**). For posterior muscles, hamstring and quadriceps, p(3NF₁-Luc-3NF₂)c yielded statistically significant higher luminescence signals (**Figure 7B**). In comparison with monomers, concatemers showed 40% lower luminescence signals.

Discussion

DNA translocation from the cytoplasm to the nucleus is a well-known limiting step of non-viral gene transfer, especially in terminal non-dividing cells such as *in vivo* skeletal muscle fibers. Considering this hurdle, we herein investigated the potential of NFκB optimized DTS termed 3NF, for pDNA transfection in various cellular contexts, notably the skeletal muscle. For this purpose, a set of fully comparable plasmids varying by the presence or the absence of 3NF DTS was designed, using a straightforward “cut and paste” like method, then thoroughly characterized (**Figures 1 and S2**).

To evaluate the influence of 3NF DTS on transfection efficacy, *in vitro* experiments were first carried out. Two PEIs were employed, i.e. the widely-used 25 kDa bPEI and a less toxic derivative 25 kDa His-bPEI. These showed comparable ability to interact with a given pDNA, some differences being probably due to histidinylation of the latter and a lower amine content (histidine counting for nearly 60% of His-bPEI polymer mass). A polymer/pDNA MR of 5 was chosen since it was the first dose from which a full pDNA condensation could be obtained for both cationic polymers, irrespective of the pDNA used (**Figure S3**).

His-bPEI was selected to assay the NFκB DTS assisted transfection in condition of NFκB activation following TNF-α addition (**Figure 2**). No differences in terms of luminescence emission between p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m in absence of cytokine could be found, likely due to no or insufficient NFκB activation. On the contrary, following addition of

TNF- α , luciferase signal clearly increased when using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m but not p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. This effect was dependent on the cytokine dose applied, demonstrating the role of 3NF for active nuclear import in all the cell lines assayed (**Figure 2A and B**).

Hypothesis that transfection process could confer benefit to p(3NF₁-Luc-3NF₂)m through NF κ B activation was tested in a polyplex dose escalation study (**Figure 3**). Since bPEI is known to trigger NF κ B nuclear translocation, it was used to transfect p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. For comparative purposes, the less cytotoxic and more effective for endosomal escape His-bPEI was evaluated in parallel. When assaying His-bPEI with SK-Mel-28, transfection showed for the lower dose tested an advantage for p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (**Figure 3A**). This could be explained by a lack of NF κ B activation, that at resting state is sequestered in the cytoplasm by its inhibitor I κ B α through the hiding of its Nuclear Localization Signal (NLS).³⁰ In this situation, NF κ B-DTS may bind to inhibited NF κ B, thus sequestering some copies of that pDNA in the cytoplasm. Above a sufficient polyplex dose, phosphorylated I κ B α does no longer interact with NF κ B, which can thus shuttle to the nucleus and actively import pDNA in that compartment (**Figure S11**). Differences in favor of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m increased with plasmid dose and cell mortality. This could be explained by PEI toxicity that has been shown to trigger akt kinase, a protein implicated in NF κ B activation, though this is still matter of some debate.^{31,32} By this way, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m was beneficial at high polyplex doses. Other phenomena may imply toxicity independent dose effect of PEI. For C2C12/His-bPEI transfection, a similar but less marked luciferase activity profile was obtained (**Figure 3C**). Those results were confirmed in A549 cells (**Figure S6**). A lower NF κ B activation could explain such results since those cell lines were more confluent than SK-Mel-28 in our experiments. It is noteworthy here that, regardless the cationic polymer used, pDNA bearing only one 3NF DTS i.e. p(Scr₁-Luc-3NF₂)m and p(3NF₁-Luc-Scr₂)m, showed consistent transfection efficiency

relative to that of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. This further underscores the impact of pDNA nuclear import by NFκB rather than any other effect such as differences in transcriptional efficiency.

Using bPEI polyplexes on SK-Mel-28 or C2C12, benefits in term of luminescence signals were immediately obtained for p(3NF₁-Luc-3NF₂)m. The cell viability was lower than with His-bPEI and could be related to the greater amine-content of this polymer (**Figure 3F and H**). For SK-Mel-28, results were to be carefully interpreted since cell toxicity was quickly high (**Figure 3F**).³³ For C2C12, the cell mortality gradually increased and seemed correlated with enhanced luciferase signals for p(3NF₁-Luc-3NF₂)m compared to other monomers. This observation suggests NFκB activation through vector properties (lower endosomal buffering capacity than His-bPEI), dose and toxicity (**Figure 3H**).

Corticoids can be part of the therapeutic regimen in some human muscular diseases like DMD.³⁴ To explore if a corticotherapy could be deleterious for p(3NF₁-Luc-3NF₂)m transfection, an *in vitro* dexamethasone dose escalation study was done. Results showed a non-specific increase of the luciferase signal independent of the plasmid used (**Figure 4A**), in accordance with data reported in another study.³⁵ This result was probably due to some transcriptional process and not to an active pDNA nuclear import due to dexamethasone. In fact, glucocorticoid response element (GRE DTS) are not present in the sequence of the plasmids assayed in our study (sequence screened from³⁶). Thus, non-specific enhancement of the luciferase signal by dexamethasone may have counterbalanced NFκB inhibition.

Finally, *in vivo* HLV administrations of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m *versus* p(Scr₁-Luc-Scr₂)m and p(3NF₁-Luc-3NF₂)c *versus* p(Scr₁-Luc-Scr₂)c to mice hind limbs were done. For monomers, doses of 0.5 and 5 μg of pDNA per treated leg were assayed. Trends in favor of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m were obtained but were not statistically significant (**Figures 5 and 6**). Five μg dose

gave about a 10-fold higher luciferase expression for each pDNA, compared to 0.5 μ g, confirming a linear range pDNA dose/response following HLV injection.²⁷ Results for p(3NF₁-Luc-3NF₂)c and p(Scr₁-Luc-Scr₂)c, compared to monomers, showed a lower luciferase signal. Such a phenomenon was in accordance with previous observations made by Woodell and *al.* who noticed a lower transgene expression while increasing the size of the pDNA delivered by HLV procedure. This could be explained by a less important quantity of internalized pDNA.²⁷ However, once again, a trend in favor of the 3NF DTS carrying plasmid was obtained. By contrast with monomers, statically significant benefits were reached for three large muscles i.e. posterior muscles, hamstring and quadriceps (**Figure 7B**). This greater effect of DTS using larger pDNA could be explained by a less important contribution of the passive intracytoplasmic pDNA diffusion generated by the HLV delivery. This phenomenon possibly dampen to a certain extent potential 3NF benefits when using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m. Such data emphasize that DTS strategy could be useful to enhance nuclear import of large pDNA delivered by HLV injection. Other non-physical gene delivery methods that do not enhance cytosolic diffusion may allow to unveil greater benefits when using smaller DTS carrying pDNA. It could be the case for example when using aerosol to target lung epithelial cells.

Although, if most of the time no statistically significant results were observed in our *in vivo* assays, a reproducible slightly higher transfection efficiency was obtained with pDNA bearing NFkB motifs. It is noteworthy here that optimization at each step of gene transfer, even leading to only modest improvements (as small as a factor 2), could virtually lead to a cumulative dramatic enhancement – as high as 2¹²-fold – of transgene expression.³⁷

As for the promoter used in this study, the CMV strong promoter was chosen as it could allow high transgene expression in the whole cell lines used, but also a long-term expression in skeletal muscles after HLV delivery.²⁷ It is already known that such a promoter could

potentially hide potential DTS benefits.²¹ Despite this, we were able to highlight differences clearly due to 3NF equipment of pDNA. It is possible that the use of a tissue specific and weaker promoter than CMV may allow to obtain even better DTS-related transfection benefits.

Conclusion

In this work, we further demonstrate that optimized NFkB-DTS termed 3NFs, can enhance the efficacy of DNA gene transfer through an improved nuclear import, in various *in vitro* and *in vivo* settings. *In vitro* experiments confirmed that NFkB assisted gene transfer by DTS carrying pDNA was effective, especially under NFkB activation through either the gene carrier-mediated transfection process itself or following TNF- α addition. *In vivo* testings revealed that NFkB-DTS equipped pDNA could also provide a consistent – though most of the time non-significant – benefit for gene transfer following HLV injection in mice. It is noteworthy that our *in vivo* evaluations were done in healthy mice, devoid of any known inflammation. The enhancement obtained was likely attributable to NFkB activation triggered by the HLV injection itself. Thus, it can be hypothesized that 3NF might also provide benefits in the context of chronic inflammatory diseases like DMD or Cystic Fibrosis. Besides, multiple administrations required for treating long-term genetic disorders could also result in cumulative DTS benefits. Further optimizations could be also obtained by combining DTS pDNA with synthetic non-ionic gene carriers. For instance, amphiphilic triblock copolymers could be such candidates since they proved to be efficient to improve *in vivo* skeletal muscle gene transfer^{6,7,38} and some can activate NFkB pathway.³⁹

Material and methods

Plasmid DNA

The luciferase-encoding plasmid p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (5556 bp) (**Figure 1A and S1**) contains two optimized NFκB DTS named 3NF respectively upstream (3NF₁) and downstream (3NF₂) of a luciferase expression cassette under transcriptional control of the strong CMV promoter. 3NF sequence is presented as follows: 5'-CTGGGGACTTTCCAGCTGGGGACTTTCCAGCTGGGGACTTTCCAGG-3'. Each of them can interact with 3 NFκB proteins (NFκB binding sites are underlined). These motifs contain an optimized spacer between each consensus sequence.

p(3NF₁-Luc-3NF₂)m monomers derivatives

Five plasmids stemming from p(3NF₁-Luc-3NF₂)m were constructed by replacing either 3NF₁, 3NF₂ or both, by scrambled sequences of the same length with close base pairs composition. The scramble sequence 1 (Scr₁) insert, for 3NF₁ replacement was obtained by hybridization of oligos "Forward Scr₁" and "Reverse Scr₁" (**Table S1**). For this purpose, 2 μg of each simple strand oligos were mixed in 50 μL of 1x NEB4 buffer and incubated for 2 mn at 94°C prior to be progressively cooled down at 25°C. The same protocol was applied for "Forward Scr₂" and Reverse Scr₂" oligos forming Scr2 insert (**Table S1**).

p(Scr₁-Luc-3NF₂) was obtained by digestion of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m by KpnI and EcoRI (**Figure S1**) for 2 h at 37°C followed by agarose gel electrophoresis of the digestion products (50 V for 1h30 on a 0.8 % agarose gel stained with ethidium bromide (EtB)). Lane corresponding to the plasmid depleted from 3NF₁ motif was isolated and purified thanks to the NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up kit following the manufacturer instructions. Plasmid were then ligated with Scr₁ insert.

p(3NF₁-Luc-Scr₂)m was obtained following a similar procedure using BamHI and Sall in NEB3 buffer and using Scr₂ insert. Finally, p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, was made by digestion of 100 ng of p(3NF₁-Luc-Scr₂) using KpnI and EcoRI (**Figure S1**) for 4 h at 37°C. Digestion mix was then heated at 70°C for 15 mn to inactivate the restriction enzymes. 10 ng of the digested plasmid were then incubated for 30 mn at 22.5°C with 1 ng of Scr₁ insert in a mix containing 1 µL of T4 ligase buffer and 0.5 µL of T4 ligase enzyme. At the end of this incubation step, the mix was heated at 65°C for 10 mn.

Plasmid concatemerisation

To obtain p(3NF₁-Luc-3NF₂)c, 120 ng of the monomer p(3NF₁-Luc-3NF₂)m were digested using kpnI (**Figure S1**), in a 40 µL mixture of BSA 1x and NEB2 buffer 1x. Digestion took place at 37°C for 4 h followed by heat inactivation of the enzyme by increasing the temperature at 70°C, 15 mn. Then, 100 ng of digested plasmid were mixed in a final volume of 50 µL containing 1 µL of T4 ligase enzyme. This mix was incubated 2 h at 16°C prior to be cooled down and kept at 4°C for 48 h. pDNA from the ligation mixture was run during 2 h on a 0.8% agarose gel stained with Sybr gold. Gel was quickly illuminated on a UV bench and band corresponding, in size, to the concatemerized plasmid, was isolated and purified thanks to the kit Nucleospin gel and PCR clean-up following the manufacturer instructions. The same procedure was applied to p(Scr₁-Luc-Scr₂)m to obtain p(Scr₁-Luc-Scr₂)c.

Bacterial transformation and colony PCR

For bacterial transformation, 5 ng of plasmid of interest were mixed with 50 µL of *E. coli* MG1665 chimiocompetent bacterias. The mixture was incubated at 4°C on ice for 30 mn prior to be dived in a water bath for 30 sec, 42°C followed by a new incubation on ice for 2 mn. Then, 250 µL of SOC (Super Optimal Broth with Catabolite repression) medium were added

and bacteria were grown at 37°C for 1h, 230 rpm. After outgrowth, 100 µL of the culture were spread overnight at 37°C on LB agar medium containing 100 µg/mL of ampicillin.

Obtained colonies were screened by colony PCR to discriminate the different p(3NF₁-Luc-3NF₂)m derivatives. Each analyzed colony was picked in 50 µL of sterile water to be incubated 10 mn, 95°C prior to be quickly centrifuged (short spin). For PCR reaction, PCR supermix (invitrogen) was mixed with primers specific of each 3NF or Scr motifs.

To identify the 3NF₁ sequence, primers named F1/R1 were used. For the identification of 3NF₂, primers used were F2/R2 (**Table S1**). Scr₁ and Scr₂ were identified using F1- Scr₁/R1 primers and F2/R2-Scr₂ (**Table S1**). A typical PCR mix of 25 µL was composed by 22.5 µL of PCR super mix mixed with 0.5 µL (10 µM) forward and reverse primers completed by 0.5 µL of centrifuged colony lysate. Water used for colony lysis was used as negative control. The PCR was made in a geneamp pcr system 9700 thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA). The program used for amplification was composed of an initial denaturation 5 mn at 94°C followed by 35 cycles as stated: 94°C for 30 sec / 60°C for 30 sec / 72°C for 30 sec. A final elongation step at 72°C for 7 mn was done. Amplification products were run for 22 mn at 100 V on a 2% agarose gel stained with 0.005% EtB prior to be imaged with a trans-illuminator (Fischer Scientific Bioblock). To assay pDNA size, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives were also run at 140 V for 40 mn on a 0.8% agarose gel stained with 0.005% EtB to control their sizes.

Plasmid sequencing

The plasmid p(Scr₁-Luc-Scr₂)m derived from p(3NF₁-Luc-3NF₂)m, was sequenced thanks to the GATC service “Lighrun tube” (Eurofins genomics).

Plasmids amplification and purification

For amplification, transformed E. coli MG1665 were outgrowth at 37°C 220 rpm for 7 h in 5 mL of liquid LB medium containing ampicillin at 100 µg/mL prior cultured for 16 hours in

1.8 L of the same medium at 37°C 180 rpm. Plasmids were purified thanks to the Macherey Nagel giga prep purification kit following the manufacturer instructions. Plasmids batch purity were assayed by measurement of the A260/A280 ratio. Only batches showing values between 1.8 and 2.0 were used in subsequent experiments.

Cell culture

HeLa (Human epithelial ovarian carcinoma cells), C2C12 (Mouse myoblast) and SK-MEL-28 (Human melanoma cells) cell lines were cultivated at 37°C 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% of heat inactivated serum (Lonza), 1% antibiotics (10,000 U mL⁻¹ Penicillin, 10,000 µg mL⁻¹ Streptomycin) and a supplementation of 1% L-Glutamine. Regular passages were effectuated to maintain the cells.

Transfection reagents

25 kDa bPEI and 25 kDa His-bPEI, (Histidine grafted at 16%) were respectively obtained from Sigma-Aldrich and CBM Orléans. They were used to prepare 20 mg/mL stock solutions in 20 mM Hepes.

Preparation of polyplexes

Polyplexes for transfection were formed in 20 mM Hepes solution at mass ratio 5 (MR) (Polymer: pDNA) by equivolumetric mixing of diluted polymers on diluted plasmids. When needed, polyplexes were further diluted in 20 mM Hepes to reach indicated quantity of pDNA per wells in the experiment.

In vitro transfection evaluation of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m following TNF-α activation

To study the influence of NFκB activation on the transfection efficiency of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, cells were plated 24 h prior transfection in 96 wells plates in 200 µL of DMEM. Culture medium was changed prior transfection and replaced by complete fresh

medium containing 0, 5, 25 or 50 ng/mL of TNF- α . Cells were then incubated for 30 mn at 37°C prior to be transfected with 0.25 μ g of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed by His-bPEI 25kDa. Cells were incubated 24 h with the polyplexes in presence of TNF- α at 37°C 5% CO₂.

In vitro ascending dose of His-bPEI and bPEI monomers

To assay the influence of the vector used for the transfection process, different cell lines were plated 24 h prior the experiments to reach 60-80% of confluency the day of transfection. Polyplexes of His-bPEI or bPEI were prepared as mentioned in the dedicated materials and methods section and were deposited on the cells to reach 0.16 μ g, 0.20 μ g, 0.26 μ g, 0.32 μ g, 0.40 μ g or 0.50 μ g of plasmids per well. Cells were incubated at 37°C 5% CO₂ for 24 h in presence of the polyplexes prior to be lysate.

In vitro effect of dexamethasone as NF κ B inhibitor

To assay the influence of an NF κ B inhibitor, different cell lines were plated 24 h prior the experiment to reach 80% confluency the day of transfection. Dexamethasone (NF κ B inhibitor from corticoids class) has been diluted in complete DMEM at desired concentration to reach 0.33 ng/ μ L, 0.67 ng/ μ L, 1 ng/ μ L, 1.33 ng/ μ L, 1.67 ng/ μ L, 2 ng/ μ L, 2.33 ng/ μ L, 2.67 ng/ μ L or 3 ng/ μ L. Dexamethasone was putted in contact with cells 30 mn prior to transfection made with MR 5 bPEI/pDNA polyplexes using 0.25 μ g of plasmids per well. The cells were then incubated for 24 h at 37°C 5% CO₂ prior to be lysate.

In vitro transfection efficiency and cell toxicity assays

To evaluate the transfection efficiency and toxicity, medium was removed from the cells and replaced by 0.5x passive lysis buffer (Promega). Luciferase dosage was made thanks to the Luciferase assay system (Promega). To normalize the relative light unit (RLU) obtained from

the last step, a protein dosage was effectuated with the BCA protein assay kit (Interchim). Results were finally expressed as RLU/mg protein.

To determine the cell survival, the ATP content of the cells was assayed by the Vialight kit (Lonza). Results of survival were given in percentage of untreated control cells.

Animals

Swiss mice from Janvier Lab were used for HLV administrations and housed by the animal facility of Brest University. All protocols were approved by the laboratory Animal Care Guidelines and by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee of the Faculty of Brest.

Hydrodynamic Limb vein (HLV) injection

Prior to received HLV injection, mice were anesthetized by intraperitoneal injection (IP) of a Ketamine/Xylazine mix (respectively 100 and 10 mg/kg of body weight). When complete narcosis was reached, both mice hind limbs were shaved prior to place a tourniquet to the proximal part of the treated leg. A small incision was then made to bare the distal segment of the great saphenous vein. Then, a catheterized 30G needle was introduced into the vein and held in place during the time of the HLV delivery procedure. Administrations were done using a syringe pump (Harvard PHD 2000, Harvard Apparatus), with 1 mL of pDNA solution delivered per hind limb at a rate of 6.290 mL/mn. Tourniquet was removed about 2 mn after injection and incision area closed with absorbable suture.

In vivo bioluminescence imaging

For *in vivo* BLI, mice were injected IP with 200 μ L of luciferin (above 0.16g/kg body weight). After 2 mn, anesthesia induction with isoflurane (4% air isoflurane blend) took place. During BLI acquisition time, narcosis was maintained with a 2% air/isoflurane blend. Luminescence images were taken with an exposure of 2x30 sec, 4x4 binning.

Ex vivo luciferase measurement

Mice were sacrificed by cervical dislocation 7 to 9 days after HLV delivery. The following muscles were sampled: Soleus; Plantaris; Gastrocnemius; Tibialis anterior; Extensor digitorum longus (EDL); Quadriceps; Posterior muscles and Hamstring (**Figure S9B**). Muscles were flash frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C before analysis. For *ex vivo* luciferase measurement, muscles were weighed on a digital precision weighing prior to be crushed in 1 mL of PLB 0.5x using a gentleMAC dissociator. Homogenates were centrifuged at 2000 rpm, 4°C for 10 min. Supernatant was analyzed using the Promega luciferase assay system. Results were given in RLU/mg of muscle.

Statistics

For *in vitro* experiments, statistical significance of the results was assayed, following the case, thanks to the unpaired two tails students t-test; t-test using Holm-Sidak method and 2 ways ANOVA. For *in vivo* experiments, the Mann-Whitney test was used. Results were considered as significant for *p* value lower than 0.05.

Acknowledgements

The authors thank Professor Patrick Midoux (CBM Orléans) who provided p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and His-bPEI. They also thank "Association Française contre les Myopathies" (AFM, Evry, France), "Association de transfusion sanguine et de biogénétique Gaétan Saleün" (Brest, France) and "Région Bretagne" (Brest, France) that supported this work. Yann Le Guen was a recipient of a PhD fellowship from the "French Ministry of Higher Education, Research and Innovation"

Figures

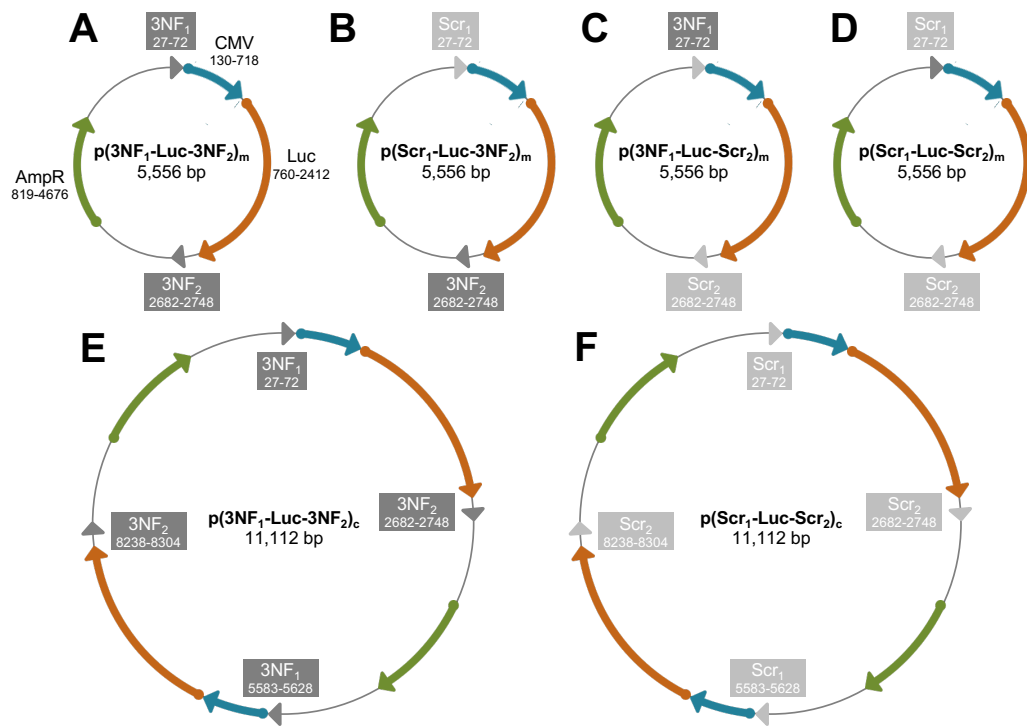


Figure 1. $p(3NF_1\text{-Luc-}3NF_2)_m$ and its monomer and concatemer derivatives.

Figure 1. p(3NF₁-Luc-3NF₂)m monomer and concatemer derivatives.

Simplified maps of the luciferase encoding plasmids (A) p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives (B) p(Scr₁-Luc-3NF₂)m, (C) p(3NF₁-Luc-Scr₂)m, (D) p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, (E) p(3NF₁-Luc-3NF₂)c and (F) p(Scr₁-Luc-Scr₂)c. Optimized NFκB DNA nuclear Targeting Sequences (DTS) named 3NF₁ and 3NF₂ sequences, respectively upstream and downstream of the luciferase gene are shown in dark grey; they are roughly equidistant on every plasmid. 3NFs replacement inserts named “Scr₁” and “Scr₂” are shown in light grey. The ampicillin resistance gene “AmpR” is colored in green. The reporter gene is under control of the strong ubiquitous CMV promoter colored in blue.

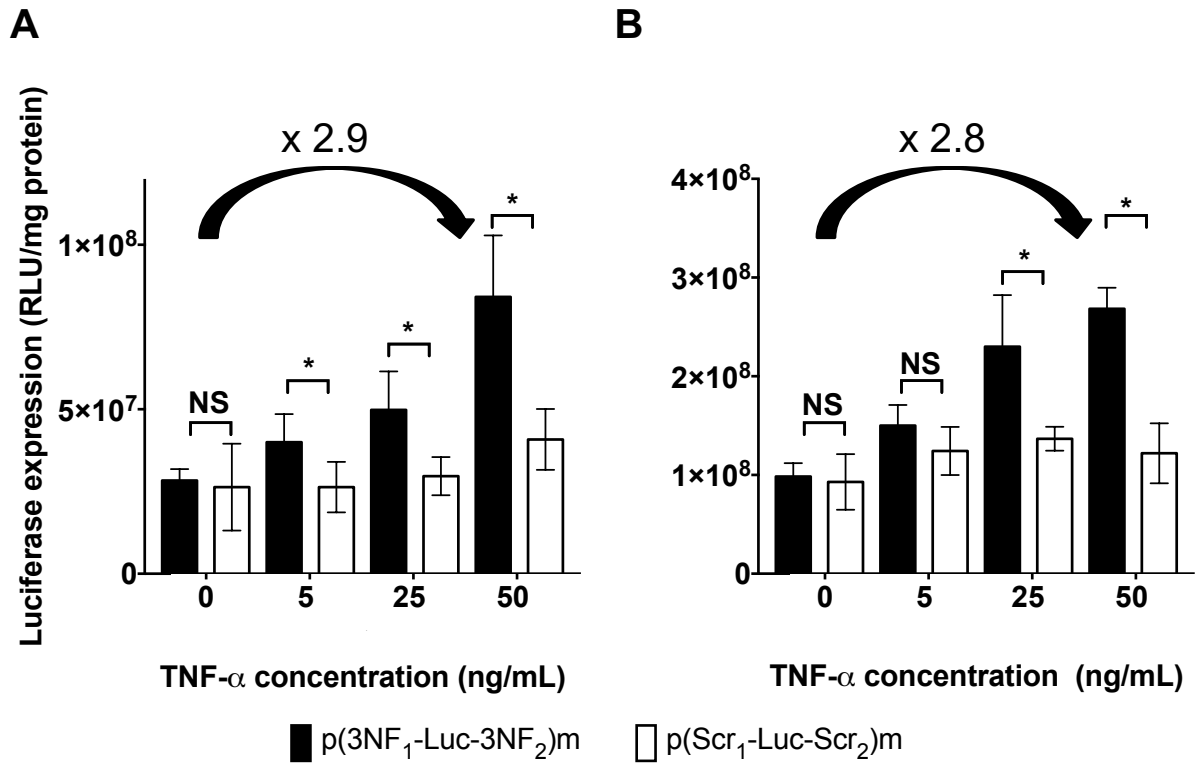


Figure 2. Influence of 3NF DTS on transfection efficacy in presence of varying TNF- α concentrations.

Figure 2. Influence of 3NF DTS on transfection efficacy in presence of varying TNF- α concentrations.

p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (solid bar) and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (open bar) were transfected in (A) HeLa and (B) SK-Mel-28 using His-bPEI at MR 5. Cells were incubated in absence or in presence of increasing concentrations of TNF- α , a well-known NF κ B activator. Luminescence was measured 24 h post-transfection. Results are expressed in the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) as mean values of 6 wells +/- SD. NS, non-significant; *p < 0.05, two-tailed unpaired t-test.

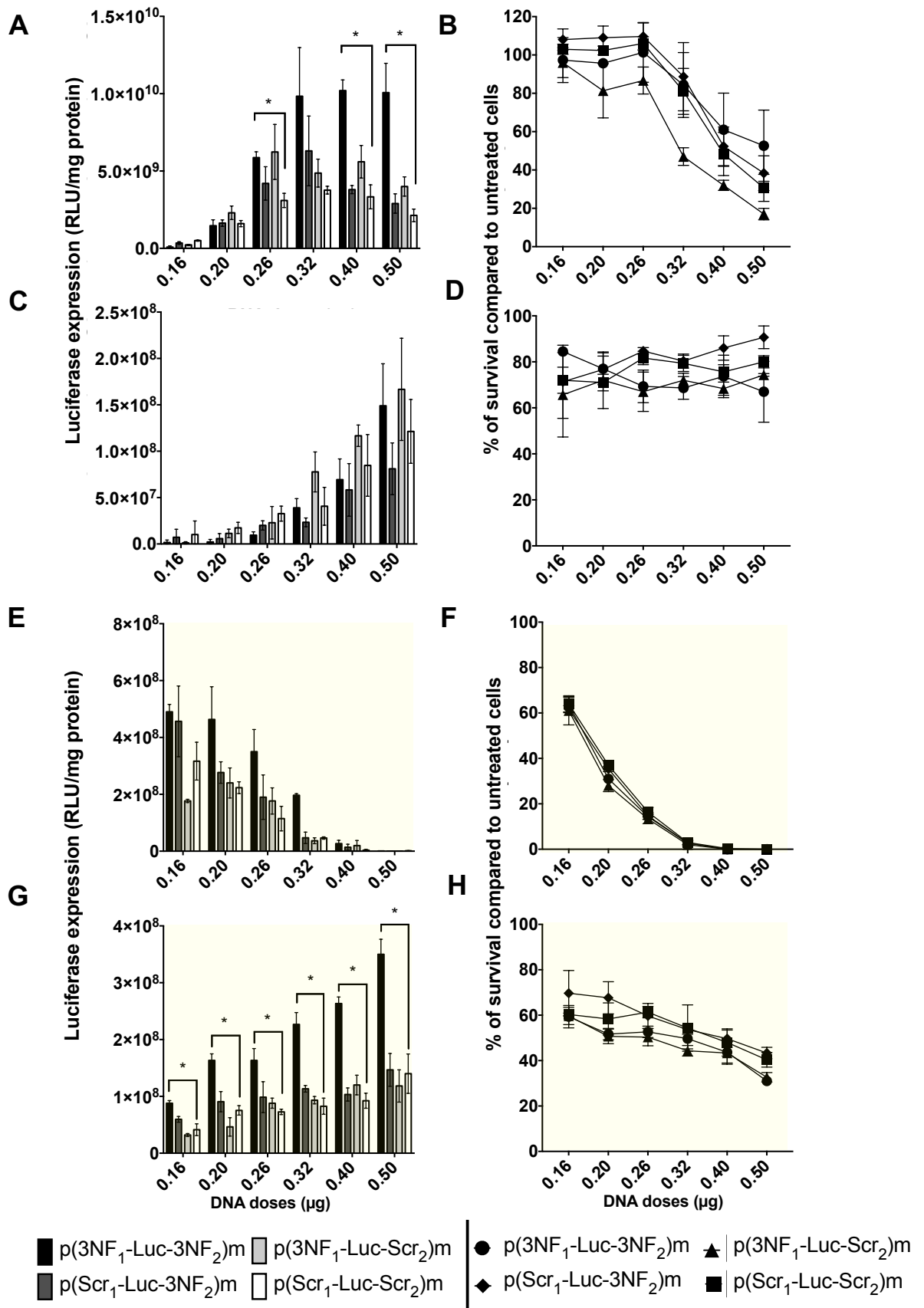


Figure 3. 3NF DTS assisted transfection activation by ascending His-bPEI and bPEI polyplex doses.

Figure 3. 3NF DTS assisted transfection activation by ascending His-bPEI and bPEI polyplex doses.

Results obtained with His-bPEI are indicated in panels A to D. (A) and (B) are respectively transfection efficacy and cell survival for each treatment 24 h post-transfection in SK-Mel-28. (C) and (D) indicate the results obtained for C2C12. Transfection results using bPEI are presented with a yellow background in panels E to H. (E) and (F) are respectively transfection efficacy and cell-survival obtained for each treatment 24 h post-transfection in SK-Mel-28. (G) and (H) present the results for C2C12 cells. Transfection efficacy is mentioned as luciferase activity in the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) with p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (black bars), p(Scr₁-Luc-3NF₂)m (dark grey bars), p(3NF₁-Luc-Scr₂)m (light grey bars) and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (white bars). Results are mean values of 3 wells +/- SD. Statistically significant differences between p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m denoted with the sign * are indicated for p < 0.05, multiple t-test Holm-Sidak method. Cell-survival is shown as percentage of survival compared to untreated cells.

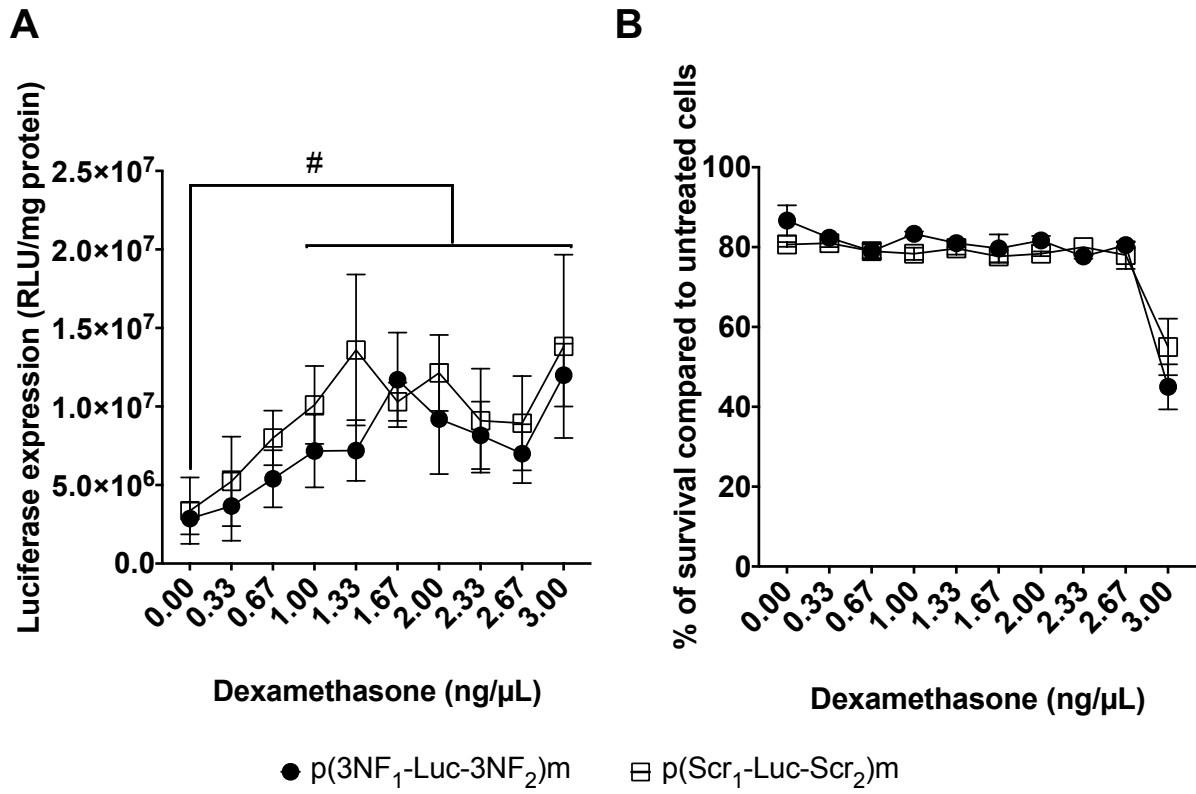


Figure 4. *In vitro* effect of dexamethasone towards transfection using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed with bPEI at MR 5 in C2C12 cells.

Figure 4. *In vitro* effect of dexamethasone towards transfection using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed with bPEI in C2C12 cells.

(A) Luciferase activity of C2C12 transfected with bPEI/p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (full circle dotted line) or bPEI/p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (open square dotted line) polyplexes at MR 5 with ascending doses of dexamethasone. For p(3NF₁-Luc-3NF₂)m *versus* p(Scr₁-Luc-Scr₂)m comparisons, results are expressed in the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) and are mean values of 3 wells +/- SD. *p < 0.05, multiple t-test Holm-Sidak method. For plasmids' non-specific enhancement of luciferase signals by corticoid, results are mean values of 6 wells +/- SD. #p < 0.05, two ways ANOVA. (B) Cell-survival is shown as percentage of survival compared to untreated cells.

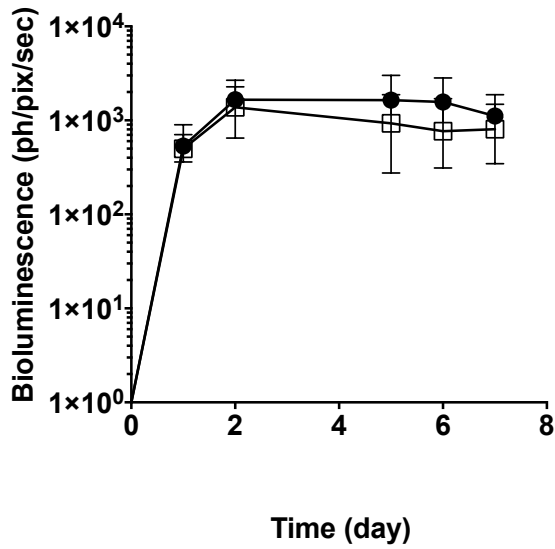
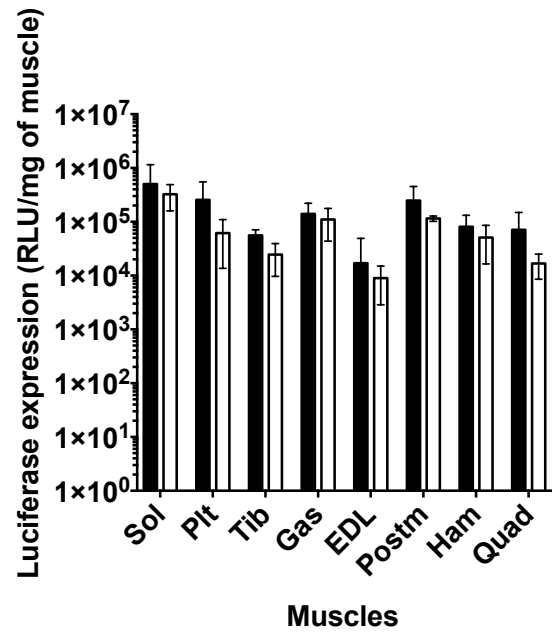
A● p(3NF₁-Luc-3NF₂)m□ p(Scr₁-Luc-Scr₂)m**B**■ p(3NF₁-Luc-3NF₂)m□ p(Scr₁-Luc-Scr₂)m

Figure 5. HLV injection in Swiss mice using 0.5 μ g of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or naked p(Scr₁-Luc-Scr₂)m.

Figure 5. HLV injection in Swiss mice using 0.5 μg of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or naked p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. (A) Mean *in vivo* bioluminescence signal per day after HLV injection of 0.5 μg of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. Full circle dotted line represents the average bioluminescence signals for p(3NF₁-Luc-3NF₂)m treated limbs. Open square dotted line represents the average bioluminescence signals for p(Scr₁-Luc-Scr₂)m treated limbs. Results are given in the unit of photons per pixel per second (ph/pix/sec) and are mean values \pm SD of n=4 limbs per group. *p < 0.05 Mann-Whitney test. (B) Mean luciferase signal per sampled muscles after HLV injection of 0.5 μg of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (solid bars) or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (open bars). Muscle names are indicated as follows: Soleus, sol; Plantaris, plt; Tibialis, tib; Gastrocnemius, gas; Extensor Digitorum Longus, EDL; Posterior muscles, postm; Hamstring, ham and Quadriceps, quad. Values are given in the unit of Relative Light Unit per milligram of muscle (RLU/mg of muscle) and are means of n=4 muscles \pm SD. *p < 0.05 Mann-Whitney test.

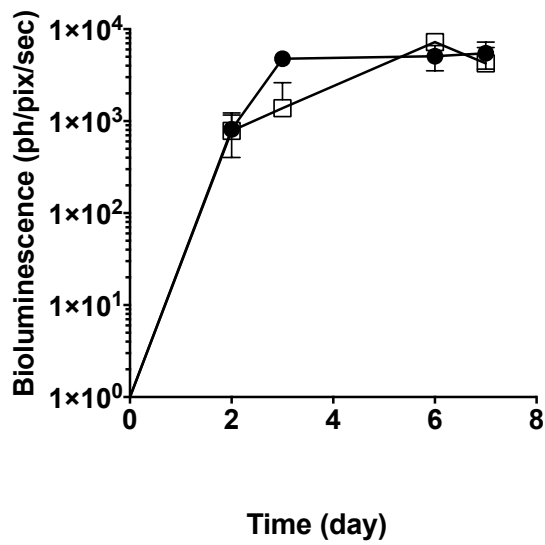
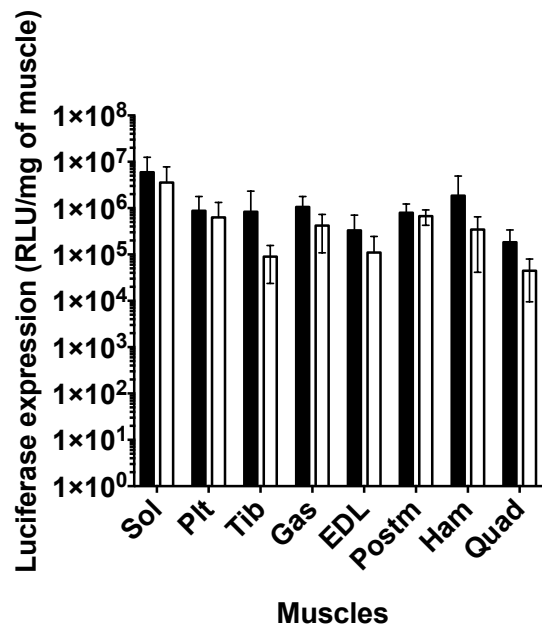
A● p(3NF₁-Luc-3NF₂)m□ p(Scr₁-Luc-Scr₂)m**B**■ p(3NF₁-Luc-3NF₂)m□ p(Scr₁-Luc-Scr₂)m

Figure 6. HLV injection in Swiss mice using 5 μ g of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or naked p(Scr₁-Luc-Scr₂)m.

Figure 6. HLV injection in Swiss mice using 5 μg of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or naked p(Scr₁-Luc-Scr₂)m.

(A) Mean *in vivo* bioluminescence signal per day after HLV injection of 5 μg of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. Full circle dotted line represents the average bioluminescence signals for p(3NF₁-Luc-3NF₂)m treated limbs. Open square dotted line represents the average bioluminescence signals for p(Scr₁-Luc-Scr₂)m treated limbs. Results are given in the unit of photons per pixel per second (ph/pix/sec) and are mean values \pm SD of n=5 limbs per group. *p < 0.05 Mann-Whitney test. (B) Mean luciferase signal per sampled muscles after HLV injection of 5 μg of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (solid bars) or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (open bars). Muscle names are indicated as follows: Soleus, sol; Plantaris, plt; Tibialis, tib; Gastrocnemius, gas; Extensor Digitorum Longus, EDL; Posterior muscles, postm; Hamstring, ham and Quadriceps, quad. Values are given in the unit of Relative Light Unit per milligram of muscle (RLU/mg of muscle) and are means of n=5 muscles \pm SD. *p < 0.05 Mann-Whitney test.

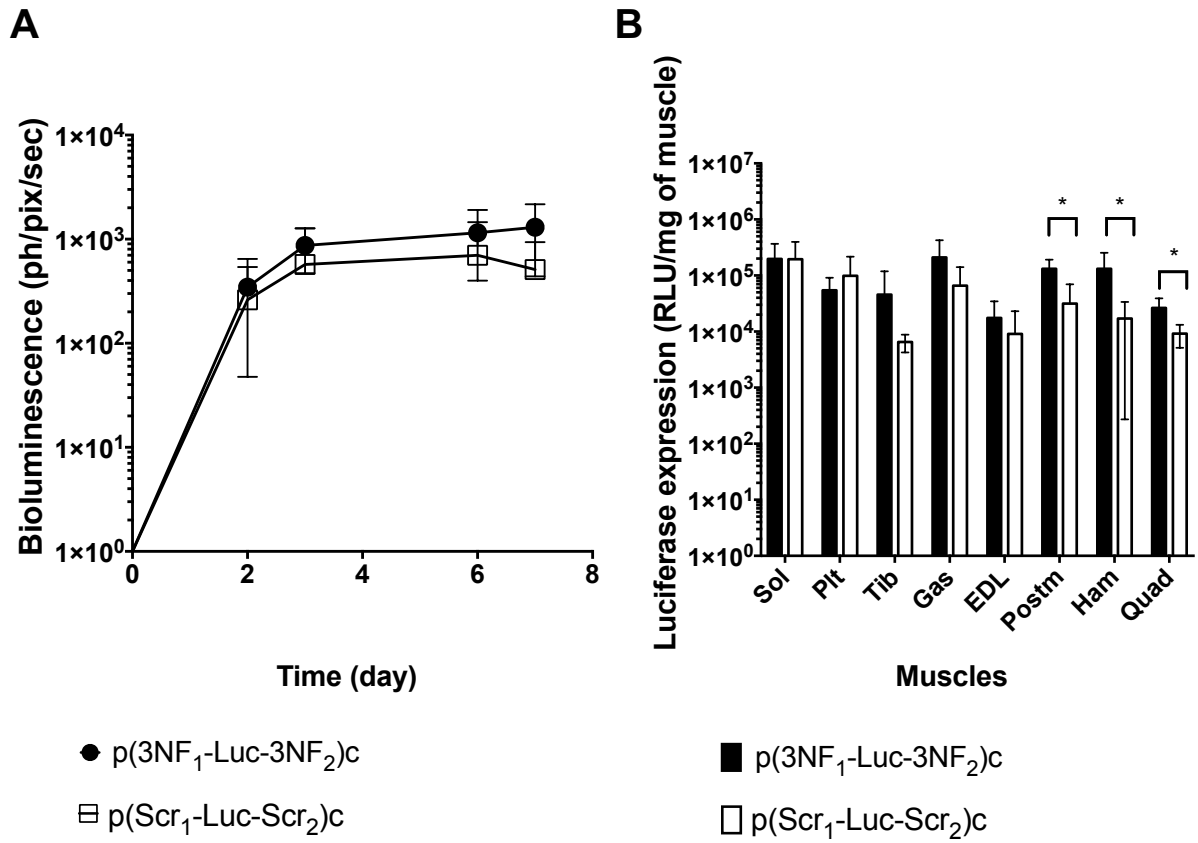


Figure 7. HLV injection in Swiss mice using 0.5 μ g of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)c or naked p(Scr₁-Luc-Scr₂)c.

Figure 7. HLV injection in Swiss mice using 0.5 µg of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)c or naked p(Scr₁-Luc-Scr₂)c.

(A) Mean *in vivo* bioluminescence signal per day after HLV injection of 0.5 µg of naked p(3NF₁-Luc-3NF₂)c or p(Scr₁-Luc-Scr₂)c. Full circle dotted line represents the average bioluminescence signals for p(3NF₁-Luc-3NF₂)c treated limbs. Open square dotted line represents the average bioluminescence signals for p(Scr₁-Luc-Scr₂)c treated limbs. Results are given in the unit of photons per pixel per second (ph/pix/sec) and are means +/- SD of n=5 limbs per group. *p < 0.05 Mann-Whitney test. (B) Mean luciferase signal per sampled muscles after HLV injection of 0.5 µg of p(3NF₁-Luc-3NF₂)c (solid bars) or p(Scr₁-Luc-Scr₂)c (open bars). Muscle names are indicated as follows: Soleus, sol; Plantaris, plt; Tibialis, tib; Gastrocnemius, gas; Extensor Digitorum Longus, EDL; Posterior muscles, postm; Hamstring, ham and Quadriceps, quad. Values are given in the unit of Relative Light Unit per milligram of muscle (RLU/mg) of muscle and are means of n=5 muscles +/- SD. *p < 0.05 Mann-Whitney test.

Supplementary materials

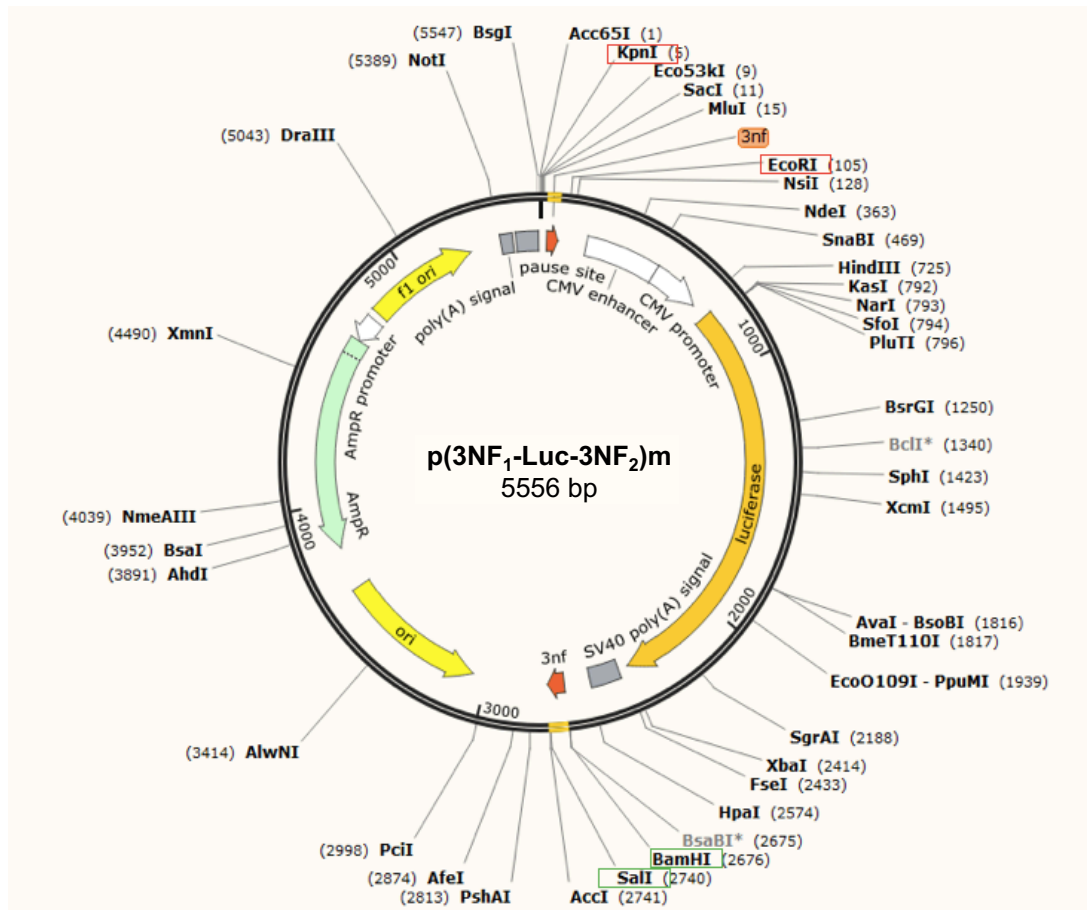


Figure S1. Detailed map of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m.

Figure S1. Detailed map of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m.

It includes a firefly luciferase gene under control of the strong CMV promoter. The optimized NFκB DNA nuclear Targeting Sequences (DTS) 3NF₁ and 3NF₂ are respectively upstream and downstream of the reporter gene. The restriction enzyme couples used to remove and replace 3NFs are framed in red and green.

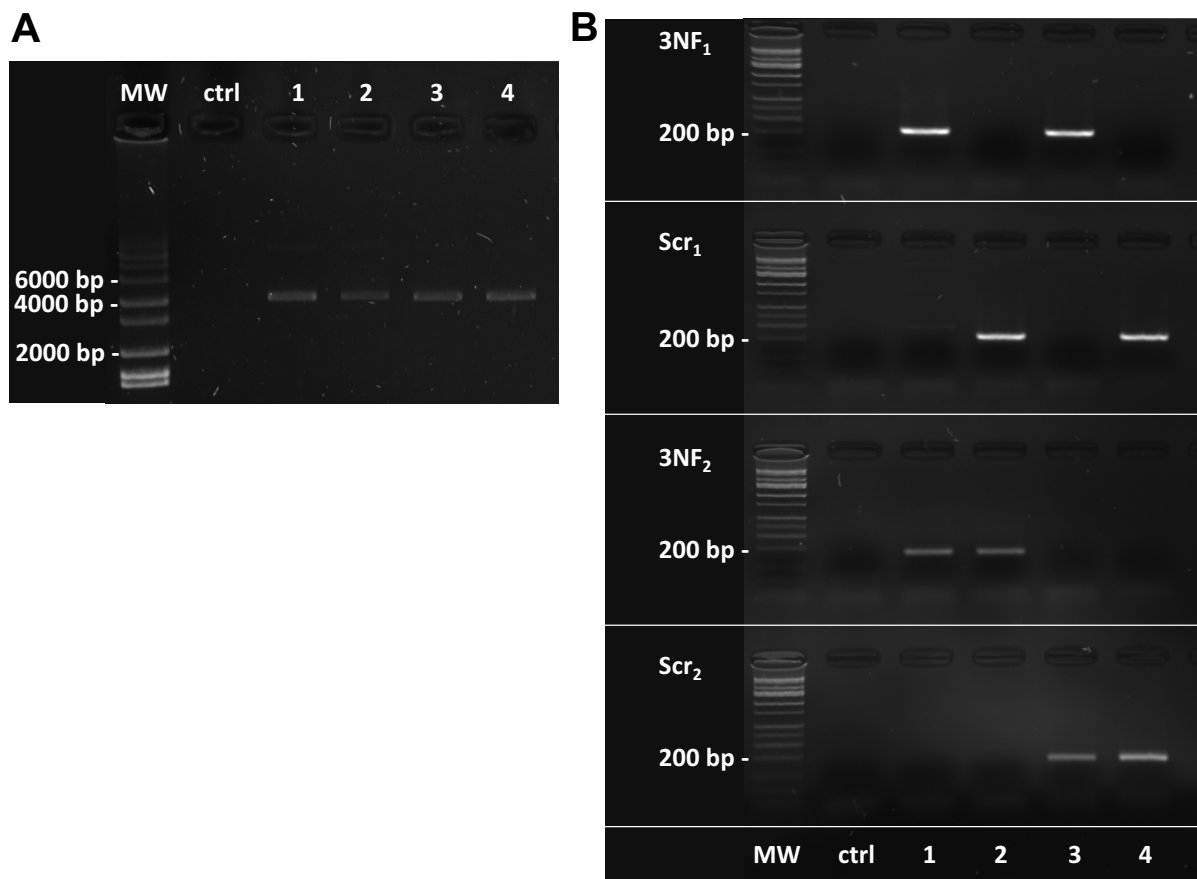


Figure S2. Characterization of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives.

Figure S2. Characterization of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives.

(A) Electrophoretic profile of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives following agarose gel electrophoresis. “MW” corresponds to the molecular weight marker; the weight of some bands is indicated on the left in base pairs (bp). “Ctrl” corresponds to control effectuated with sterile water used to dissolve the different nucleic acids constructions. Numbers upon each lane indicates the plasmid ran with 1, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m; 2, p(Scr₁-Luc-3NF₂)m; 3, p(3NF₁-Luc-Scr₂)m and 4, p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. Thus, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m its derivatives had a similar size, close to 5kB. (B) PCR signatures of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives. Each plasmid can be identified thanks to specific couples of primers able to recognize each particular motif of interest known as 3NF₁, 3NF₂, Scr₁ and Scr₂. MW corresponds to the molecular weight marker; the weight of a band is indicated on the left in bp. The lane “Ctrl” corresponds to the control made of water used to dilute PCR matrix. Lane numbers above the PCR gel are 1, p(3NF₁-Luc-3NF₂)m; 2, p(Scr₁-Luc-3NF₂)m; 3, p(3NF₁-Luc-Scr₂)m and 4, p(Scr₁-Luc-Scr₂)m.

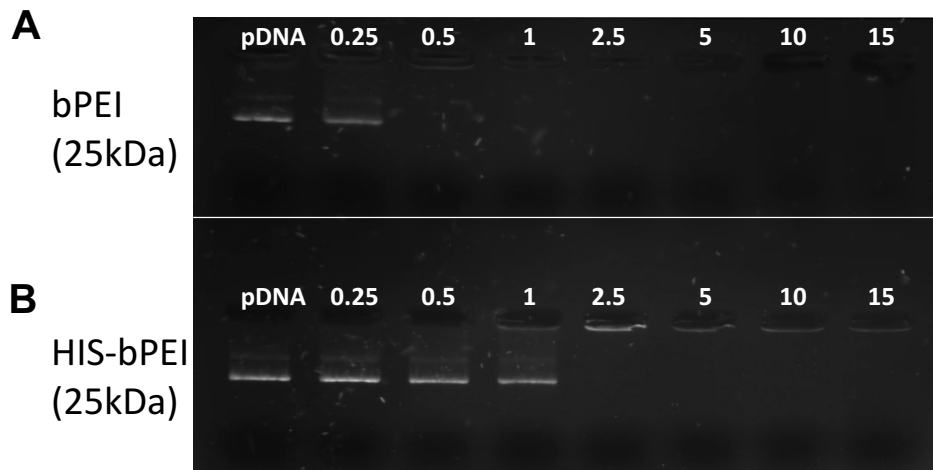


Figure S3. Gel retardation assay using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m complexed with bPEI or His-bPEI at different cationic polymers/pDNA MR.

Figure S3. Gel retardation assay using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m complexed with bPEI or His-bPEI at different cationic polymers/pDNA MR.

For each lane, the mass ratio is indicated upon the well. The assay was performed in 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide. pDNA alone is used as control and is indicated on the first lane. (A) Migration profile obtained with the widely used 25 kDa bPEI. (B) Migration profile obtained for DNA complexation assay with His-bPEI.

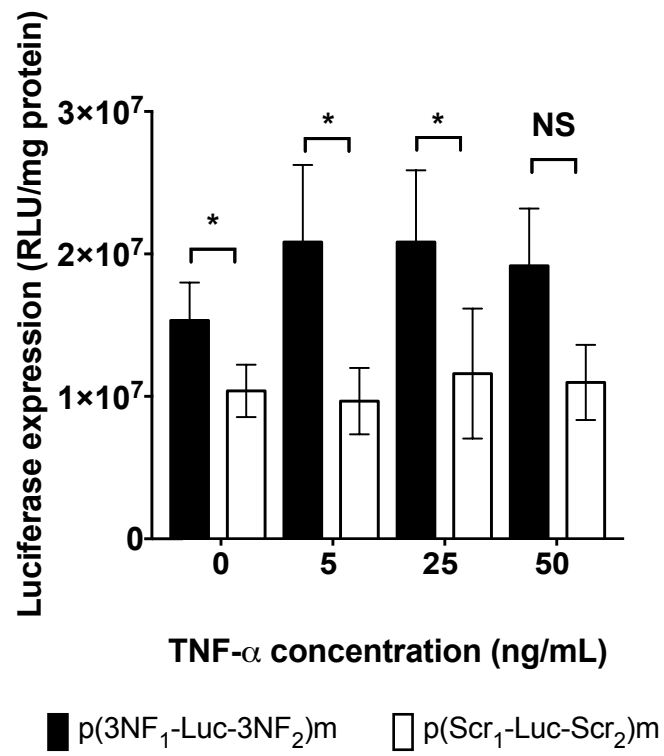


Figure S4. Influence of 3NF DTS on transfection efficacy in presence of varying TNF- α concentrations in 16HBE cells.

Figure S4. Influence of 3NF DTS on transfection efficacy in presence of varying TNF- α concentrations in 16HBE cells.

Plasmids p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (solid bars) and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (open bars) were transfected in 16HBE cells using His-bPEI at MR 5. Cells were incubated in absence or in presence of increasing concentrations of TNF- α , a well-known NF κ B activator. Luminescence was measured 24 h post-transfection. Results are expressed in the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) as mean values of 6 wells +/- SD. NS, non-significant; *p < 0.05, two-tailed unpaired t-test.

GGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATA**GGGACTTTCC**ATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTACGGTA
 CCGACTGGCGGTTGCTGGGGCGGGTAAGTGCAGTTATTACTGCATACAAGGATATCATTGCGGTTATCCCTGAAAGGTAAGTGCAGTTACCCACCTCATAAATGCCAT
 CMV enhancer (190...493)

NdeI
 AACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT
 TTGACGGGTGAACCGTCACTAGTTACATAGTATACGGTTCATGCGGGGATAACTGCAGTTACTGCCATTTACCAGGCGGACCGTAATACGGGTCATGACTGGAATA
 CMV enhancer (190...493)

SnaBI
GGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGA
 CCTGAAAGGATGAACCGTCACTAGATGCATAATCAGTAGCGATAATGGTACCACACGCCAAAACCGTCATGTAGTTACCCGACCTATCGCCAACTGAGTCCCT
 CMV enhancer (190...493) | CMV promoter (494...697) >

TTTCCAAGTCTCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAAC**GGGACTTTCC**AAAATGTCGTAACAACCCGCCCATTTGACGCAATGGCGG
 AAAGGTTGAGGTTGGGTAAGTGCAGTTACCCCTCAAACAAAACCGTGGTTTTAGTTGCCCTGAAAGGTTTTACAGCATTGTTGAGGCGGGTAAGTGCAGTTACCCGCC
 CMV promoter (494...697) >

HindIII
 TAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAGCCACCATGGAAGACGC
 ATCCGCACATGCCACCCTCCAGATATATTCGCTCGACCAAAATCACTTGGCAGTCTAGGCGATCTCGAACCGTAAGGCCATGACAACCATTTGGTGGTACCTTCTGG
 CMV promoter (494...697) >

Figure S5. NFκB binding sites in the CMV enhancer and promoter carried by p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives.

Figure S5. NFkB binding sites in the CMV enhancer and promoter carried by p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives.

NFkB binding sites were highlighted in yellow in the CMV enhancer and promoter sequences carried by p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives. The sequence screened corresponded for NFkB binding site was 5'-GGGACTTCC-3', similar to the ones found in optimized NFkB DNA nuclear Targeting Sequences termed "3NFs".

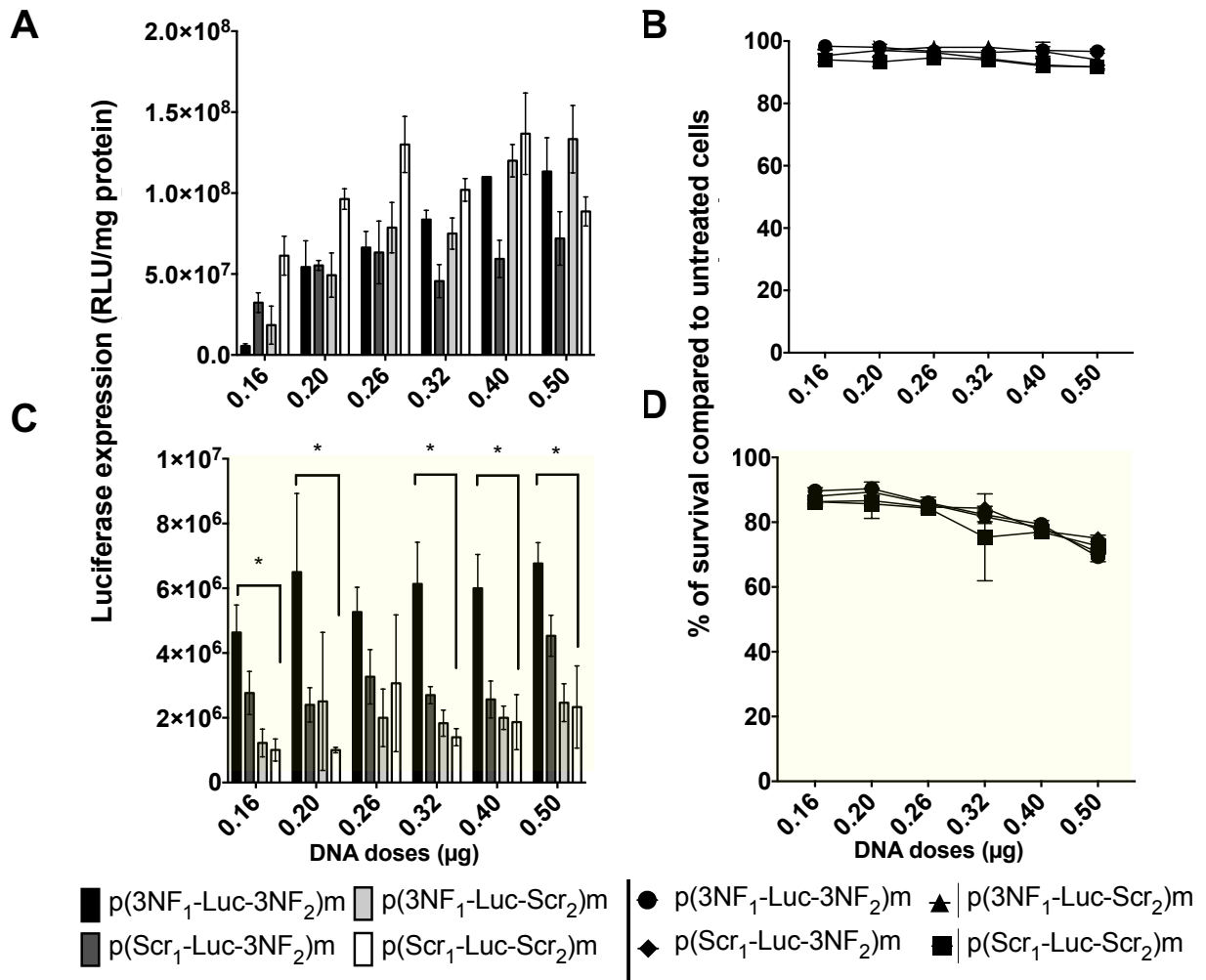
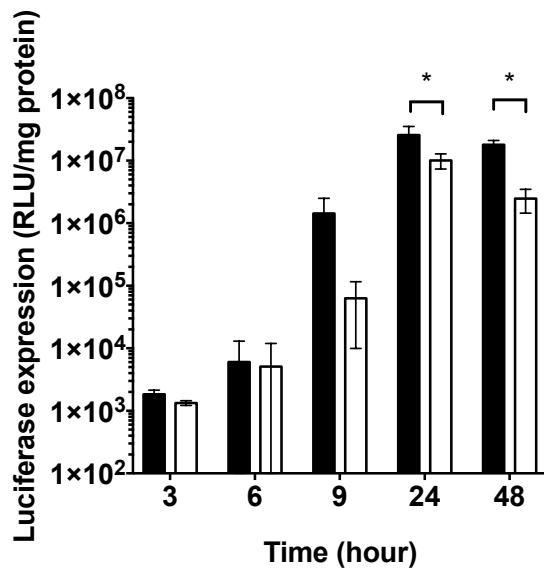
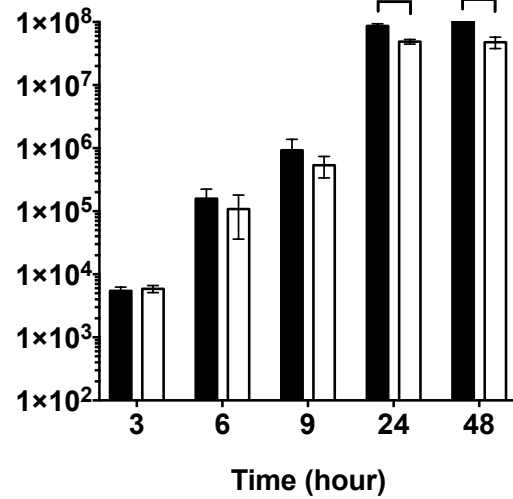


Figure S6. 3NF DTS assisted transfection activation by ascending His-bPEI and bPEI polyplex doses in A549.

Figure S6. 3NF DTS assisted transfection activation by ascending His-bPEI and bPEI polyplex doses in A549.

Results obtained with His-bPEI are indicated in panels A and B. (A) and (B) are respectively transfection efficacy and cell survival for each treatment 24 h post-transfection. Transfection results using bPEI are presented with a yellow background and are addressed in panels (C) and (D) which are respectively transfection efficacy and cell-survival obtained for each treatment 24 h post-transfection. Transfection efficacy is mentioned as luciferase activity in the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) with p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (black bars), p(Scr₁-Luc-3NF₂)m (dark grey bars), p(3NF₁-Luc-Scr₂)m (light grey bars) and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (white bars). Results are mean values of 3 wells +/- SD. Statistically significant differences between p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m denoted with the sign * are indicated for p < 0.05, multiple t-test Holm-Sidak method. Cell-survival is shown as percentage of survival compared to untreated cells.

A**B**

■ p(3NF₁-Luc-3NF₂)m □ p(Scr₁-Luc-Scr₂)m

Figure S7. 3NF DTS assisted transfection activation using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed by bPEI, a time course study.

Figure S7. 3NF DTS assisted transfection activation using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed by bPEI, a time course study.

C2C12 and A549 cells were transfected with 0.25 µg of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed by bPEI at mass ratio 5 to perform a time course study of the luciferase expression. Cells were lysate and luciferase signals were evaluated at indicated time after transfection for (A) C2C12 and (B) for A549. Results are given in the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) and are mean values of 3 wells +/- SD. *p < 0.05, multiple t-test Holm-Sidak method.

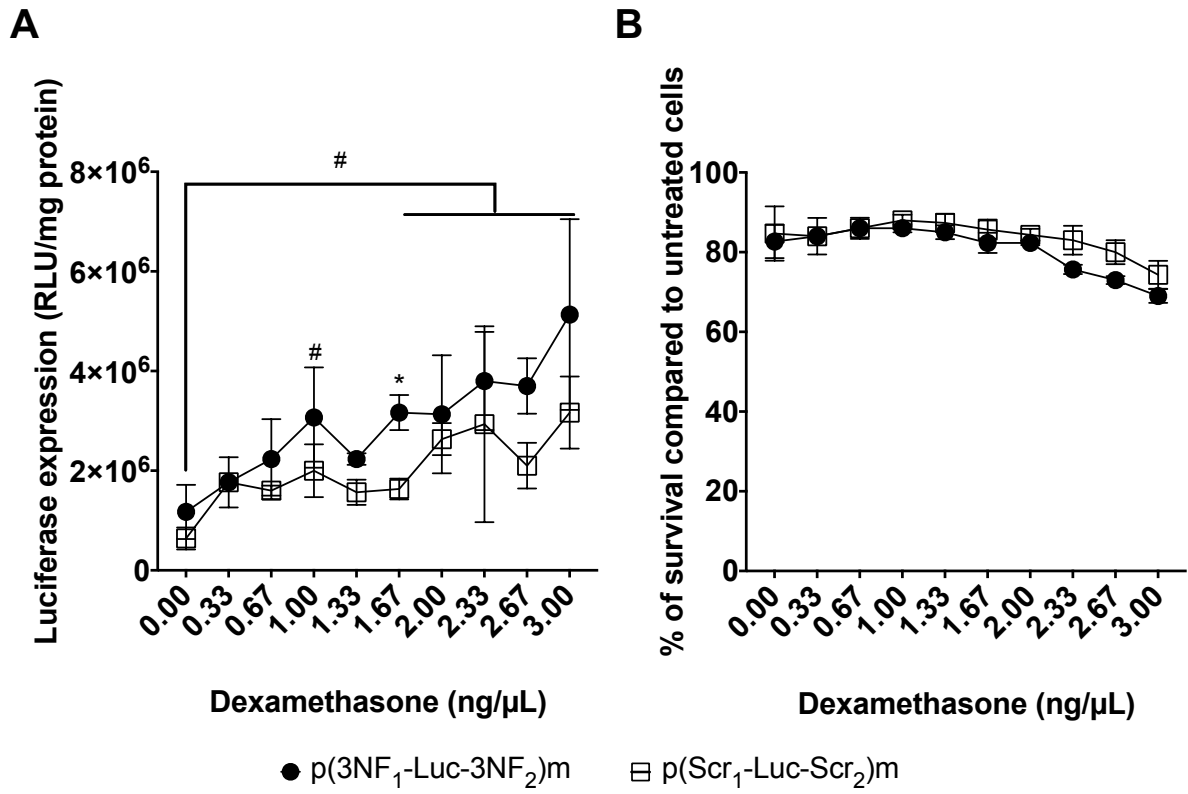
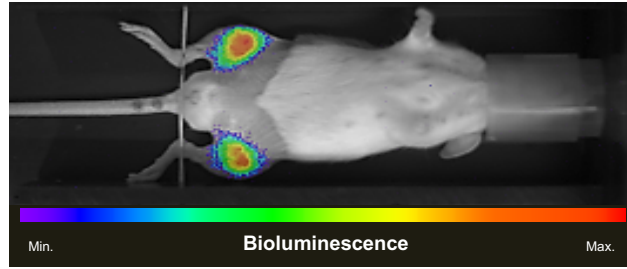


Figure S8. *In vitro* effect of dexamethasone towards transfection using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed with bPEI in A549 cells.

Figure S8. *In vitro* effect of dexamethasone towards transfection using p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed with bPEI in A549 cells.

(A) Luciferase activity of A549 transfected with bPEI/p(3NF₁-Luc-3NF₂)m (full circle dotted line) or bPEI/p(Scr₁-Luc-Scr₂)m (open square dotted line) polyplexes at MR 5 with ascending doses of dexamethasone. For p(3NF₁-Luc-3NF₂)m *versus* p(Scr₁-Luc-Scr₂)m comparisons, results are expressed in the the unit of Relative Light Unit per milligram of protein (RLU/mg protein) as mean values of 3 wells +/- SD. *p < 0.05, multiple t-test Holm-Sidak method. For plasmids' non-specific enhancement of luciferase signals by corticoid, results are mean values of 6 wells +/- SD. #p < 0.05, two ways ANOVA. (B) A549 cell-survival is shown as percentage of survival compared to untreated cells.

A



B

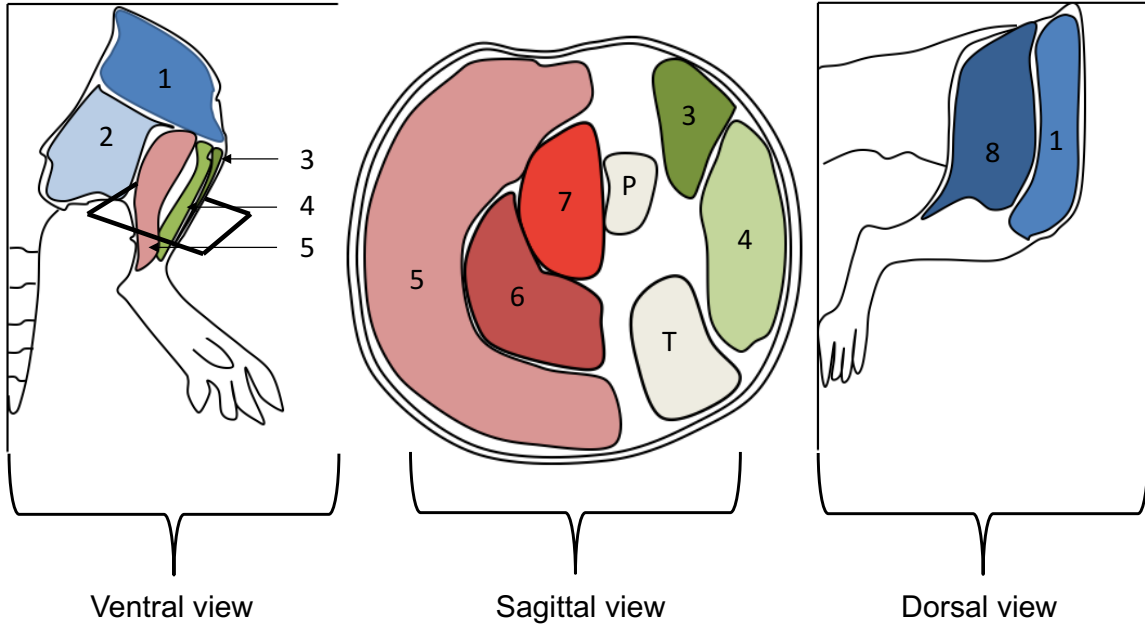


Figure S9. Bioluminescence imaging illustration and mouse hind limb simplified anatomy.

Figure S9. Bioluminescence imaging illustration and mouse hind limb simplified anatomy.

(A) illustration of bioluminescence signals obtained following *in vivo* bioluminescence imaging after HLV injection of a luciferase encoding plasmid. (B) Simplified anatomy of a mouse hind limb according to different views. Square on ventral view represents the cutting point for sagittal plan. Numbers correspond to muscles sampled with 1, quadriceps (Quad); 2, posterior muscles (Postm); 3, Extensor Digitalis Longus (EDL); 4, tibialis; 5, gastrocnemius (Gastro); 6, plantaris; 7, soleus and 8, hamstring (Ham). Main leg bones with P, peroneus and T, tibialis are indicated on the sagittal view.

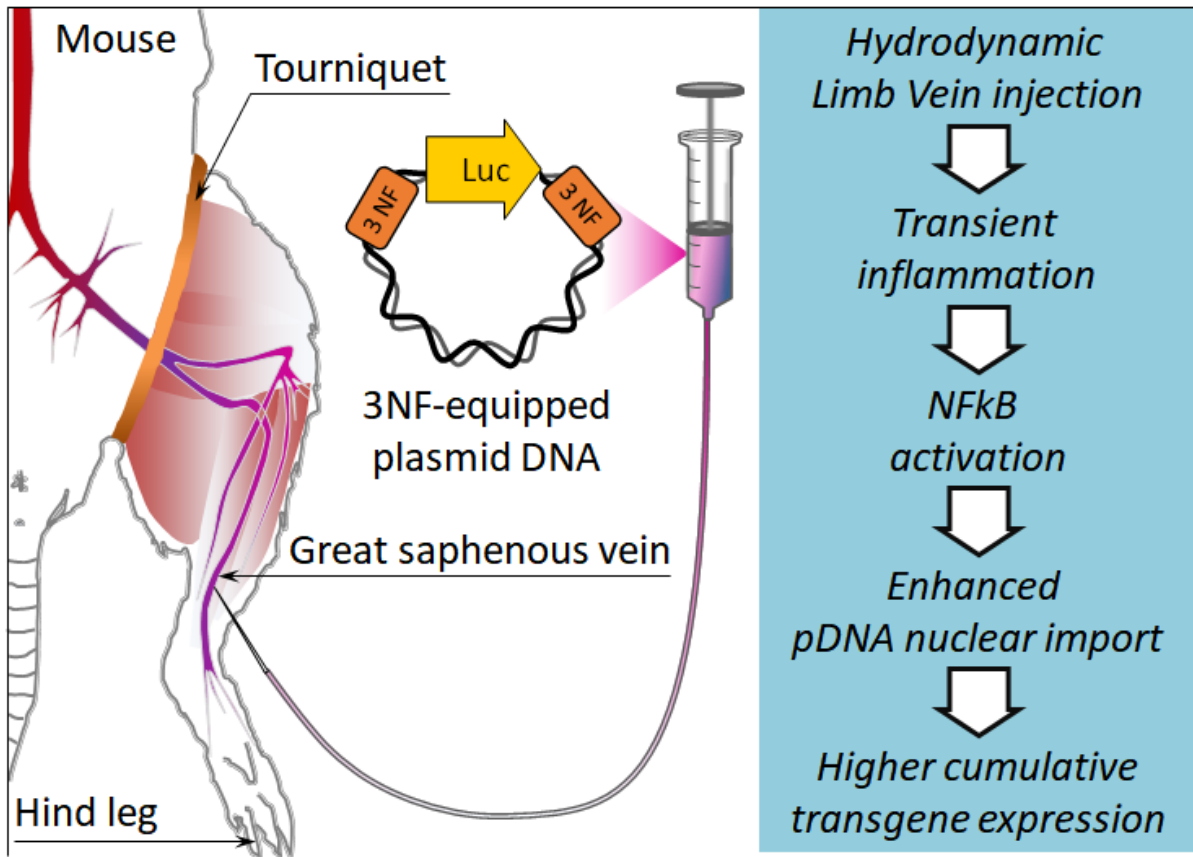


Figure S10. HLV transfection enhancement by p(3NF₁-Luc-3NF₂)m, a working hypothesis.

Figure S10. HLV transfection enhancement by p(3NF₁-Luc-3NF₂)m, a working hypothesis.

The nuclear membrane represents a major barrier for *in vivo* transfection. In the present study, we propose that the transfection of a pDNA into skeletal muscles using a hydrodynamic injection *via* the limb saphenous vein (HLV injection) could be improved if this pDNA carried optimized NFκB DTS termed 3NFs. According to this hypothesis, the transient NFκB activation that could be attributed to the HLV injection procedure results in enhanced nuclear import of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and thus a higher transgene expression compared to pDNA devoided of 3NFs. To test this assumption, we here used healthy mice that did not exhibit any inflammation (no NFκB activation) prior to treatment. Four different pDNA, that differed regarding the 3NFs they incorporated or not, were compared.

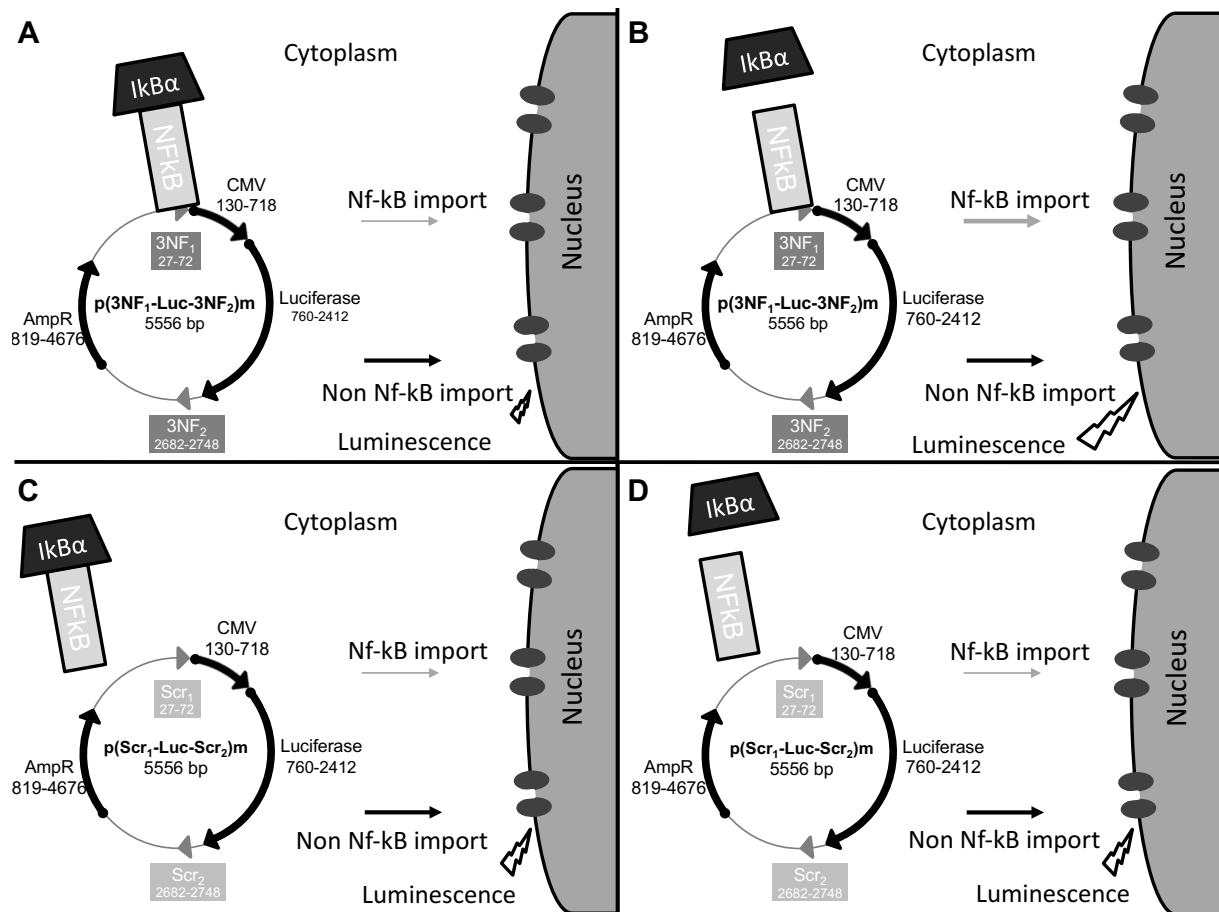


Figure S11. Hypothetic mechanistic model explaining differences of luminescence signals between plasmids $p(3NF_1\text{-Luc-}3NF_2)m$ and $p(Scr_1\text{-Luc-}Scr_2)m$.

Figure S11. Hypothetic mechanistic model explaining differences of luminescence signals between p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m.

(A) In absence of signal triggering NFκB activation, NFκB is sequestered in the cytoplasm by its inhibitor IκBα. In this configuration, no or few NFκB-mediated nuclear import can happen. Thus, copies of the luciferase encoding p(3NF₁-Luc-3NF₂)m bind by inhibited transcription factor can't be translocated into the nucleus. This decreases the overall transfection efficiency compared to a pDNA devoid of 3NF DTS such as p(Scr₁-Luc-Scr₂)m. (B) On the contrary, when a stimulus triggers NFκB activation, the transcription factor is actively translocated into the nucleus. Copies of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m bind by NFκB, can be actively translocated in the nucleus. This phenomenon comes additionally to the non-NFκB plasmid nuclear import. Thus, plasmid copy number increases in the nucleoplasm, resulting in higher luminescence signals. (C and D) For p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, since plasmid nuclear import cannot rely on NFκB translocation, the luminescence signals in presence nor in absence of NFκB activated pathway are similar. Grey and black arrows represent respectively the contribution of NFκB and non NFκB nuclear import in each context. In each panel, the arrow denoting the luminescence signal is shown with a size reflecting the expression intensity of the luciferase transgene.

Table S1. Oligonucleotides and primers used for p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives.

Oligonucleotides	Sequences
Forward Scr ₁	5'- CATTCTAGAGAGCATGCTAATGGGAGCCGGTTAACCGGTATCATTTGAGCATCAATC CTCCTGTACGTATGGTCTCGCTACCCCTGAGTGTGCTATGG-3'
Reverse Scr ₁	5'- AATTCGATAGCACACTCAGGGGTAGCGAGACCATACGTGACAGGAGGATTGATGCTC AAATGATACGCGGTTAACCGGCTCCCATTAGCATGCTCTCTAGAATGGTAC-3'
Primer F1	5'-CGACTGCATCTGCGTGTTTC-3'
Primer F1-Scr ₁	5'-CTACCCCTGAGTGTGCTATC-3'
Primer R1	5'-GAAAGTCCCTATTGGCGTTAC-3'
Forward Scr ₂	5'- GATCCTACTCAACATCGTAGCGTCTCTTGTGTGCAGGAGTATAATAGACCCGGTCGGC GTACCG-3'
Reverse Scr ₂	5'- TCGACGGTACGCCGACCGGTCTATTATACTCCTGCACACAAGAGACGCTACGATGTT GAGTAG-3'
Primer F2	5'-TTGTGATGCTATTGCTTTATTTG-3'
Primer R2	5'-GGAAAGTCCCAGGCTAG-3'
Primer R2-Scr ₂	5'-AGAGACGCTACGATGTTGAG-3'

3) Supplementary Material and methods

Complexation assay of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m by bPEI and His-bPEI

To determine a polymer:pDNA mass ratio (MR) at which p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and its derivatives were fully complexed either by bPEI and His-bPEI, polyplexes of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m with the different polymers were formed as stated in materials and methods section. MR assayed were 0.25; 0.5; 1; 2.5; 10 and 15. Ten microliters of each polyplexes were mixed with 2 µL of loading buffer to be run following agarose gel electrophoresis (0.8% agarose gel stained with ethidium bromide) for 15 mn 100 V in TBE 1x. Gel was imaged thanks to a UV trans-illuminator device (Fischer Scientific Bioblock).

Cell culture

A549 (adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cells) and 16HBE (human bronchial epithelial cells) were respectively cultivated at 37°C 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) and in Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) containing 10% of heat inactivated serum (Lonza), 1% antibiotics (10,000 U mL⁻¹ Penicillin, 10,000 µg mL⁻¹ Streptomycin) and a supplementation of 1% L-Glutamine. Regular passages were effectuated to maintain the cells.

In vitro transfection evaluation of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m in 16HBE following TNF-alpha activation

To study the influence of NFκB activation on the transfection efficiency of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, cells were plated 24 h prior transfection in 96 wells plates in 200 µL of EMEM. Culture medium was changed prior transfection and replaced by complete fresh medium containing 0, 5, 25 or 50 ng/mL of TNF-α. Cells were then incubated for 30 mn at 37°C prior to be transfected with 0.25 µg of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed by

His-bPEI 25kDa at MR 5. Cells were incubated 24 h with the polyplexes in presence of TNF- α at 37°C 5% CO₂.

Time course study of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m in C2C12 and A549 cells

For time course study of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m and p(Scr₁-Luc-Scr₂)m, C2C12 and A549 cells were plated 24 h prior transfection in 96 wells plates in 200 μ L of DEMEM to reach 80% confluency the day of transfection. Then, cells were transfected with 0.25 μ g of p(3NF₁-Luc-3NF₂)m or p(Scr₁-Luc-Scr₂)m complexed by bPEI at MR 5. The cells were then lysate at indicated times to evaluate the different transfections efficiencies.

References

1. Montier, T. *et al.* Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: progress and challenges. *Trends Biotechnol.* **22**, 586–592 (2004).
2. Nayerossadat, N., Maedeh, T. & Ali, P. A. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv. Biomed. Res.* **1**, (2012).
3. Jayant, R. D. *et al.* Current status of non-viral gene therapy for CNS disorders. *Expert Opin. Drug Deliv.* **13**, 1433–1445 (2016).
4. Ginn, S. L., Amaya, A. K., Alexander, I. E., Edelstein, M. & Abedi, M. R. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J. Gene Med.* **20**, e3015 (2018).
5. Vaughan, E. E., DeGiulio, J. V. & Dean, D. A. Intracellular Trafficking of Plasmids for Gene Therapy: Mechanisms of Cytoplasmic Movement and Nuclear Import. *Curr. Gene Ther.* **6**, 671–681 (2006).
6. Bello-Roufaï, 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.* **35**, 728–739 (2007).
7. Richard, P. *et al.* Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1318–1324 (2005).
8. Bouraoui, A. *et al.* Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery. *Chemphyschem Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* **20**, 2187–2194 (2019).
9. Bouraoui, A. *et al.* Substitution of unsaturated lipid chains by thioether-containing lipid chains in cationic amphiphiles: physicochemical consequences and application for gene delivery. *Org. Biomol. Chem.* **17**, 3609–3616 (2019).
10. Bertrand, E. *et al.* Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chem. Commun. Camb. Engl.* **47**, 12547–12549 (2011).
11. Dean, D. A., Strong, D. D. & Zimmer, W. E. Nuclear entry of nonviral vectors. *Gene Ther.* **12**, 881–890 (2005).
12. 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.* **36**, e71 (2008).
13. Mahindhoratep, S. *et al.* NF-kB related transgene expression in mouse tibial cranial muscle after pDNA injection followed or not by electrotransfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 3257–3263 (2014).
14. Gonçalves, C. *et al.* An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J. Gene Med.* **11**, 401–411 (2009).
15. Evans, N. P., Misyak, S. A., Robertson, J. L., Bassaganya-Riera, J. & Grange, R. W. Dysregulated intracellular signaling and inflammatory gene expression during initial disease onset in Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Phys. Med. Rehabil.* **88**, 502–522 (2009).
16. Hagstrom, J. E. *et al.* A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **10**, 386–398 (2004).
17. Fan, Z. *et al.* Safety and Feasibility of High-pressure Transvenous Limb Perfusion With 0.9% Saline in Human Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* **20**, 456–461 (2012).
18. Fan, Z. *et al.* High-Pressure Transvenous Perfusion of the Upper Extremity in Human Muscular Dystrophy: A Safety Study with 0.9% Saline. *Hum. Gene Ther.* **26**, 614–621 (2015).
19. Hegge, J. O. *et al.* Evaluation of hydrodynamic limb vein injections in nonhuman primates. *Hum. Gene Ther.* **21**, 829–842 (2010).
20. Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M. & Reich, Z. A regulated, NFkappaB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* **3**,

- 653–657 (2001).
21. van Gaal, E. V. B. *et al.* DNA Nuclear Targeting Sequences for Non-Viral Gene Delivery. *Pharm. Res.* **28**, 1707–1722 (2011).
 22. Ma, Y.-F. & Yang, Y.-W. Delivery of DNA-based cancer vaccine with polyethylenimine. *Eur. J. Pharm. Sci.* **40**, 75–83 (2010).
 23. Saito, Y., Higuchi, Y., Kawakami, S., Yamashita, F. & Hashida, M. Immunostimulatory Characteristics Induced by Linear Polyethyleneimine–Plasmid DNA Complexes in Cultured Macrophages. *Hum. Gene Ther.* **20**, 137–145 (2009).
 24. Deroo, B. J. & Archer, T. K. Glucocorticoid Receptor Activation of the I κ B α Promoter within Chromatin. *Mol. Biol. Cell* **12**, 3365–3374 (2001).
 25. Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmborg, A. & Karin, M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science* **270**, 286–290 (1995).
 26. Nishikawa, M., Nakayama, A., Takahashi, Y., Fukuhara, Y. & Takakura, Y. Reactivation of silenced transgene expression in mouse liver by rapid, large-volume injection of isotonic solution. *Hum. Gene Ther.* **19**, 1009–1020 (2008).
 27. Wooddell, C. I. *et al.* Dose Response in Rodents and Nonhuman Primates After Hydrodynamic Limb Vein Delivery of Naked Plasmid DNA. *Hum. Gene Ther.* **22**, 889–903 (2011).
 28. Lukacs, G. L. *et al.* Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J. Biol. Chem.* **275**, 1625–1629 (2000).
 29. Zhang, G. *et al.* Functional Efficacy of Dystrophin Expression from Plasmids Delivered to mdx Mice by Hydrodynamic Limb Vein Injection. *Hum. Gene Ther.* **21**, 221–237 (2009).
 30. Jacobs, M. D. & Harrison, S. C. Structure of an I κ B α /NF- κ B Complex. *Cell* **95**, 749–758 (1998).
 31. Kafil, V. & Omid, Y. Cytotoxic Impacts of Linear and Branched Polyethylenimine Nanostructures in A431 Cells. *BioImpacts BI* **1**, 23–30 (2011).
 32. Dan, H. C. *et al.* Akt-dependent regulation of NF- κ B is controlled by mTOR and Raptor in association with IKK. *Genes Dev.* **22**, 1490–1500 (2008).
 33. Griesser, J. *et al.* Highly mucus permeating and zeta potential changing self-emulsifying drug delivery systems: A potent gene delivery model for causal treatment of cystic fibrosis. *Int. J. Pharm.* **557**, 124–134 (2019).
 34. DE LOS ANGELES BEYTÍA, M., VRY, J. & KIRSCHNER, J. Drug treatment of Duchenne muscular dystrophy: available evidence and perspectives. *Acta Myol.* **31**, 4–8 (2012).
 35. Braun, S. *et al.* In vitro and in vivo effects of glucocorticoids on gene transfer to skeletal muscle. *FEBS Lett.* **454**, 277–282 (1999).
 36. Dames, P., Laner, A., Maucksch, C., Aneja, M. K. & Rudolph, C. Targeting of the glucocorticoid hormone receptor with plasmid DNA comprising glucocorticoid response elements improves nonviral gene transfer efficiency in the lungs of mice. *J. Gene Med.* **9**, 820–829 (2007).
 37. Ramamoorth, M. & Narvekar, A. Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview. *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **9**, GE01–GE06 (2015).
 38. Alimi-Guez, D. *et al.* Evaluation of the muscle gene transfer activity of a series of amphiphilic triblock copolymers. *J. Gene Med.* **11**, 1114–1124 (2009).
 39. Gaymalov, Z. Z., Yang, Z., Pisarev, V. M., Alakhov, V. Y. & Kabanov, A. V. The effect of the nonionic block copolymer pluronic P85 on gene expression in mouse muscle and antigen-presenting cells. *Biomaterials* **30**, 1232–1245 (2009).

V) Discussion et perspectives

Ce travail de thèse s'est intéressé à l'optimisation du transfert de gènes non-viral destiné aux muscles squelettiques par utilisation de l'injection HLV comme méthode d'administration. Une première partie de ce projet a consisté à l'identification des différentes étapes pouvant limiter l'efficacité du transfert de gènes par méthode HLV. Des pistes d'améliorations pour chacune d'entre elles ont été proposées. Ce travail a donné lieu à la revue de la littérature : « **Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations** ». Plusieurs de ces propositions d'optimisation ont ainsi été testées, constituant la partie « résultats » de ce manuscrit.

La première étape du transfert de gènes par injection HLV sur laquelle s'est penchée ce travail de thèse est l'aide au franchissement du sarcolemme. Divers composés ont pu être testés à cette fin. Les polymères cationiques se sont révélés inefficaces par administration HLV, en diminuant l'efficacité de transfection comparativement à de l'ADNp seul. Une possible et probable explication quant à l'inefficacité de ces composés pour la transfection du muscle squelettique se base sur la présence de charges positives à la surface des polyplexes. Les nano-objets interagissent alors avec les charges négatives des protéines constituant la MEC. Celle-ci peut de plus jouer un rôle de « tamis moléculaire », empêchant les plus grosses nanoparticules d'atteindre les cellules cibles. D'autres classes de composés ont donc été testées, se basant sur des résultats de la littérature principalement rapportés par IM chez la souris. Dans ce contexte, des molécules appartenant à la classe des CTAN ont été précédemment rapportées comme particulièrement efficaces, notamment les poloxamères (augmentant d'environ 1 log l'expression d'un transgène luciférase comparativement à un ADNp utilisé seul)(Alimi-Guez et al. 2009; Guiraud et al. 2015; Lemieux et al. 2000; Pitard et al. 2002; Bello-Roufaï, Lambert, and Pitard 2007). Deux d'entre eux ont donc été sélectionnés, à savoir les poloxamères 188 et 407. Utilisés par administration HLV, ces composés confèrent des bénéfices plus modestes (de l'ordre de x2,5) à l'échelle du membre entier chez la souris Swiss, comparés à ceux obtenus par voie IM. Ces résultats peuvent s'expliquer par la différence d'échelle entre les voies IM et HLV. L'injection IM étant une méthode d'administration locale, la concentration en poloxamère reste relativement élevée au site d'injection. Par administration HLV, la nature locorégionale et physique de la méthode, entraîne une dilution et une répartition/pression inégale au sein des différentes loges musculaires du membre traité. La concentration locale en poloxamère est donc

différente d'un muscle à l'autre. Une observation intéressante est d'ailleurs que les bénéfices les plus importants dans notre étude sont conférés au plantaris et au gastrocnemius. Précédemment, il a été observé par IRM que cette loge musculaire est celle pour laquelle le gonflement, après injection hydrodynamique, est le plus important. C'est donc dans celle-ci que les poloxamères sont les plus présents. Augmenter la concentration en poloxamère dans la solution d'injection pourrait ainsi être judicieux, notamment pour le P407 qui n'a été utilisé qu'à 0,05% w/v. Une limite technique est cependant conférée par la viscosité des solutions administrées. Celle-ci peut impacter sur les paramètres d'injections tel que le volume de solution délivré lors de l'emploi d'un perfuseur. Les investigations avec les poloxamères sont toujours en cours, afin d'affiner et de compléter les résultats obtenus rapportés dans l'étude préliminaire intitulée « **Non-viral gene transfer to skeletal muscles combining Hydrodynamic Limb Vein injection and poloxamers** ».

En dehors des poloxamères, un CTAN original, synthétisé par l'équipe du Professeur Philippe Guégan, s'est révélé particulièrement efficace pour augmenter l'efficacité du transfert de gènes par voie IM. Ce dernier, nommé BR059 a donc été testé par injection HLV. Les résultats obtenus par cette voie étant encourageants, les évaluations ont été poursuivies dans un contexte d'évaluation préclinique pertinent pour la DMD, à savoir chez la souris *mdx*. Chez ce modèle murin, l'adjonction de BR059 au plasmide pTG14860 (codant une mini-dystrophine murine), a une nouvelle fois permis d'obtenir des bénéfices en transfection comparativement au pTG14860 seul. De la même manière qu'avec l'utilisation de poloxamère, c'est pour le gastrocnemius que les gains les plus importants ont été obtenus. Les multiples administrations ont permis d'obtenir un effet cumulatif des différences constatées en faveur du BR059. En moyenne, avec le CTAN, près de 13% de fibres musculaires étaient positives au transgène mini-dystrophine contre 5% avec l'ADN seul. Une nouvelle fois, le gastrocnemius comptait parmi les muscles pour lesquels les bénéfices observés étaient les plus élevés. Pour le tibialis antérieur, les résultats obtenus, démontrant des efficacités des transfection parmi les plus élevées de cette expérience, étaient plus surprenants. En revanche, cela souligne d'autant plus l'intérêt de ré-administrations HLV utilisant ce type de composés. De cette manière, des muscles habituellement moins efficacement transfectés peuvent être mieux ciblés. À terme, l'utilisation de CTAN pourrait ainsi permettre de transférer les membres traités de manière plus homogène qu'à l'heure actuelle (une transfection relativement homogène des muscles et de leurs fibres étant un prérequis nécessaire pour espérer un bénéfice clinique pour des dystrophies comme la DMD).

La seconde étape du transfert de gènes par injection HLV ayant focalisée l'attention de ces investigations a été celle de la translocation du plasmide dans le noyau. L'utilisation de DTS optimisées et spécifiques de NFκB, facteur de transcription lié aux voies inflammatoires et activé dans plusieurs pathologies musculaires, a été explorée (Monici et al. 2003; Messina et al. 2011). Les expériences menées et les résultats obtenus avec les DTS ont démontré qu'elles pouvaient augmenter de manière significative l'efficacité de transfection *in vitro* d'un plasmide en étant pourvu. Par injection HLV, les bénéfices sont plus modestes mais une tendance positive, systématiquement en faveur du plasmide comportant les DTS, a pu être objectivée. Cette étude est la première du genre à notre connaissance concernant l'injection HLV (les différents résultats ont donc été formulés dans un article intitulé « **DNA nuclear targeting sequences for enhanced non-viral gene transfer – An *in vitro* and *in vivo* study** » prochainement soumis). Plusieurs éléments ont pu jouer quant à la limitation des bénéfices constatés. Le premier est le fait que les différentes constructions comparées dans cette étude comportent un promoteur CMV (van Gaal et al. 2011). Ce dernier permet une forte expression du transgène sous son contrôle et peut s'exprimer sur de longues durées dans le muscle squelettique après administration HLV. Cependant, ce promoteur fort peut limiter/masquer l'effet des DTS (van Gaal et al. 2011). Des bénéfices plus importants pourraient donc être potentiellement mis en évidence en utilisant un promoteur de type musculaire, plus faible mais tout à fait pertinent. Un autre facteur pouvant jouer est le contexte dans lequel ont été réalisées les injections HLV. Les animaux utilisés pour les expériences étaient des souris Swiss, exemptes de toute inflammation découlant de processus pathologique (au contraire de souris *mdx*). La procédure HLV est donc le seul facteur sur lequel reposait l'activation de la voie NFκB. Ainsi, des bénéfices plus importants pourraient peut-être être observés chez des animaux chez lesquels un processus inflammatoire est présent.

Pour obtenir de plus grands bénéfices en termes de transfert de gènes par administration HLV, les différentes approches testées lors de ce travail de thèse pourraient par ailleurs être combinées. Certains CTAN se sont révélés capables d'activer certains facteurs de transcription comme NFκB. Dans l'étude menée avec les poloxamères, les molécules choisies (poloxamère 188 et poloxamère 407) ne permettent pas d'activer cette voie. Ainsi, les effets observés ne pouvaient pas relever d'une activation de la transcription liée à des sites cryptiques NFκB présents dans le promoteur CMV du plasmide pTG11033 utilisé. En revanche, il pourrait être intéressant de tester certains CTAN pouvant activer NFκB par injection HLV en présence de

plasmides tels que pLo2 (p(3NF₁-Luc-3NF₂)m). L'hypothèse serait alors que les CTAN pourraient ainsi aider au franchissement du sarcolemme puis augmenter l'import nucléaire du plasmide comportant les DTS. Un effet synergique serait alors créé entre l'approche par DTS et l'approche par CTAN.

Précédent le passage du sarcolemme et les étapes qui s'en suivent (notamment la translocation et l'expression du transgène dans le noyau), une étape pouvant limiter l'efficacité du transfert de gènes par injection HLV, lors sa combinaison avec des vecteurs synthétiques, est le franchissement de la MEC. S'affranchir de l'expérimentation *in vivo* pour cribler des composés efficaces pour le franchissement de cette étape serait judicieux. Le nombre d'animaux utilisés pour explorer certaines pistes de recherche serait ainsi réduit (respect de la règle des 3R). Développer un outil de pré-criblage mimant le passage de la MEC durant l'injection HLV serait alors utile. À cette fin, le plan d'un prototype utile à cette tâche a été mis au point (**figure 50**).

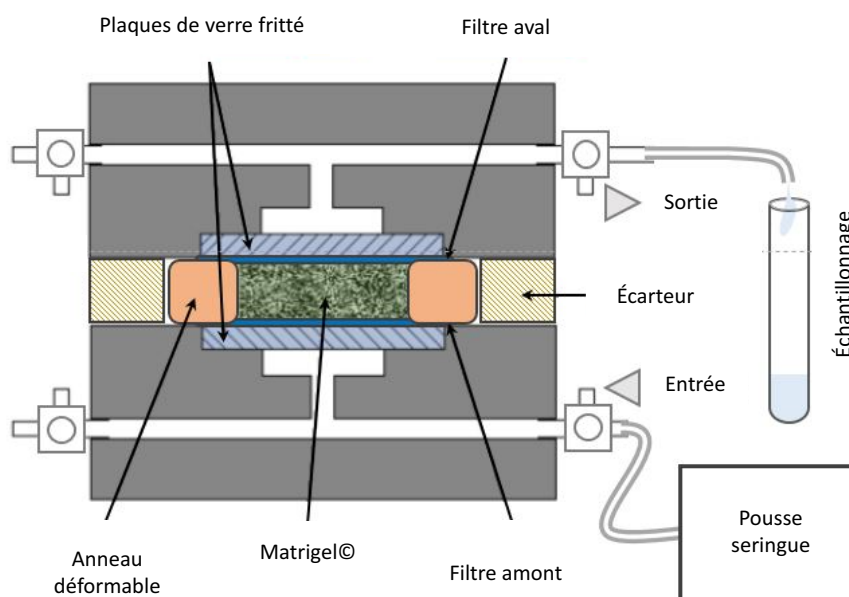


Figure 50 : Modèle de pré-criblage HLV pour le passage de la matrice extracellulaire. Ce modèle est constitué d'une chambre dans laquelle rentre la solution d'ADN plasmidique (ADNp) accompagnée du vecteur à tester. Cette solution est propulsée à l'aide d'un pousse seringue selon des paramètres similaires à ceux utilisés lors d'une HLV. Le mélange passe ensuite au travers d'un modèle de matrice extracellulaire (MEC) artificielle. La solution est récupérée en sortie du dispositif et une quantification de l'ADNp ayant pu traverser la MEC est effectuée. Ceci permet d'estimer un rendement de passage.

Un tel modèle serait constitué d'une chambre fabriquée d'une matière plastique inerte non poreuse afin d'éviter de potentielles interactions avec les vecteurs synthétiques testés. Au cœur de cette chambre se trouverait un modèle de MEC, qui pourrait par exemple être du matrigel®. L'entrée du dispositif serait reliée à un pousse seringue qui injecterait une solution contenant un plasmide en présence d'un vecteur synthétique. Les paramètres d'injection seraient similaires à ceux classiquement utilisés *in vivo*. Afin d'évaluer un rendement de passage du modèle de MEC, la solution ayant traversée le dispositif serait récupérée et une qPCR pourrait être menée pour estimer un nombre de copie détectable en comparaison à la solution avant injection. Un autre contrôle pourrait être de comparer les résultats obtenus à ceux acquis après passage d'une solution témoin constituée uniquement d'ADNp. Une manière plus grossière et plus rapide d'estimer un rendement de passage de la MEC à l'aide de ce prototype pourrait aussi être fait par électrophorèse d'un échantillon de solution testée avant et après injection. Ces échantillons subiraient une étape de décomplexation de l'ADNp (par dextran sulfate) puis la migration s'effectuerait sur gel d'agarose coloré au Sybr gold (meilleure sensibilité que le BET). La fluorescence par piste serait alors évaluée et comparée.

Les optimisations des différentes étapes du transfert de gènes par injection HLV pourraient aussi être réalisées en couplant cette méthode d'injection locorégionale à d'autres méthodes physiques de transfert de gènes comme la sonoporation. Cette technique pourrait, en revanche, être incompatible avec l'utilisation de certains vecteurs synthétiques qui pourraient alors être dégradés et se révéler toxiques pour les fibres musculaires (cela pourrait être le cas de certains poloxamères).

Une manière d'évaluer le potentiel bénéfique de formulations de thérapie génique délivrées *via* administration HLV, notamment utilisées dans un contexte préclinique de DMD, pourrait être l'IRM. Cette méthode d'imagerie non-invasive permet une évaluation de l'évolution de la fibrose et serait de ce fait mise en œuvre chez des rongeurs modèles de DMD. Il serait alors possible d'évaluer si le traitement administré permet d'empêcher/réduire la fibrose des muscles squelettiques des membres traités. Au cours de ces travaux de thèse, une mise au point de la méthode IRM chez la souris saine de type Swiss, (souche utilisée dans la plupart des expériences de ce manuscrit) a été entamée.

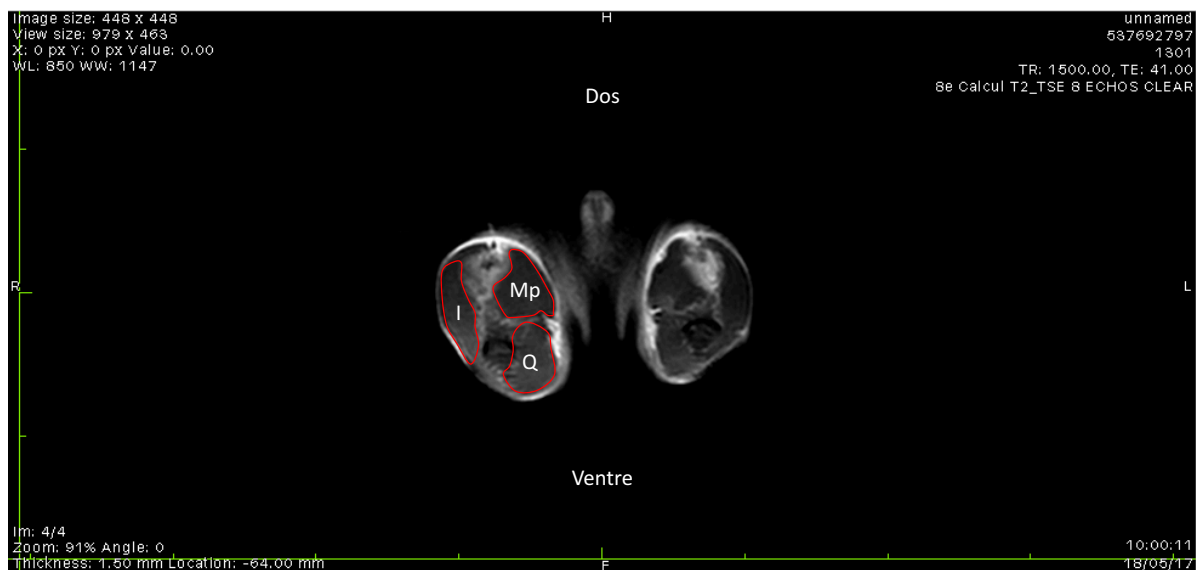


Figure 51 : Vue des membres inférieurs de souris Swiss par IRM. La zone de la cuisse a été imagée selon un plan transversal en pondération T2. Les loges musculaires d'un des membres ont été entourées en rouge, avec I, ischio jambier ; Mp, muscles postérieurs et Q, quadriceps.

La prise de vue présentée en **figure 51** correspond à un plan transversal au niveau des membres inférieurs d'une souris Swiss. Cette image montre que le matériel auquel nous avons accès est capable d'effectuer des mesures suffisamment précises pour discerner différentes loges musculaires d'intérêts chez le petit rongeur. L'IRM pourrait donc à terme être bel et bien utilisée pour réaliser un suivi longitudinal de rongeurs modèles de la DMD ayant reçu des formulations de thérapie génique optimisées pour et par injection HLV. De tels animaux pourraient être des myorats, un modèle particulièrement pertinent, d'un point de vue histopathologique, pour ce type d'étude (Larcher et al. 2014).

VI) Conclusion

Les dystrophies sont des maladies génétiques présentant différents phénotypes. La DMD est parmi les plus courantes et les plus sévères. Elle résulte de l'absence de dystrophine fonctionnelle au niveau sub-sarcolemmique des fibres musculaires. En raison des nombreux partenaires protéiques que comportent cette protéine, les conséquences de son absence sont importantes. Divers processus physiopathologiques, d'une dimension extrêmement complexe au niveau cellulaire perturbent l'homéostasie du myocyte. D'effets néfastes sur le maintien de l'architecture cellulaire, en passant par des influx calciques importants, à la production de ROS et de réponse inflammatoire, les mutations DMD ont un effet majeur sur le muscle squelettique à l'échelle du corps entier. La compréhension de ces phénomènes, et de la maladie en générale, ont permis d'améliorer la prise en charge des patients. La qualité et l'espérance de vie de ces derniers ont augmenté significativement au cours de ces 30 dernières années. Il n'existe cependant à l'heure actuelle aucun traitement curatif pouvant bénéficier à tous les patients indépendamment de leur profil de mutation. La thérapie génique pourrait répondre à ce besoin car elle délivre le gène codant la protéine manquante ou dysfonctionnelle quelque soit la mutation présentée par le malade. Plusieurs essais cliniques se sont avérés fructueux pour d'autres maladies que la DMD et plusieurs investigations cliniques sont également en cours pour celle-ci (Duan 2018). Ces dernières années, plusieurs de ces thérapies ont d'ailleurs reçues une autorisation de mise sur le marché. Ces dernières utilisent pour le moment des vecteurs viraux, posant potentiellement des problèmes d'ordre immunitaire, empêchant toute ré-administration. Si les approches non-virales ne sont pas sujettes à ce type de problème, elles demeurent beaucoup moins efficaces et ne permettent pas à ce jour d'envisager un changement réel de tableau clinique. Le mode d'administration demeure de plus un paramètre crucial. Dans les années 90, le Professeur Jon Wolff et son équipe, remarquaient qu'il était possible de transférer de l'ADN nu par voie IM. Cependant, le caractère très local du transfert de gènes par cette technique ne permet pas de cibler des muscles et groupes de muscles de manière homogène. Ceci étant un pré-requis pour espérer un bénéfice clinique dans le cadre de maladie telle que la DMD, l'injection hydrodynamique par la veine saphène a été développée. Cette méthode physique permet, sur un membre isolé par un garrot, de transférer l'ensemble de sa musculature (Hagstrom et al. 2004). Approche très intéressante par son applicabilité en clinique, l'injection HLV permettrait de traiter les membres dans le cadre de la DMD mais aussi dans celui d'autres dystrophies ou myopathies (Dystrophie musculaire des ceintures, formes

sévères de myopathies distales...). À l'heure actuelle, pour le traitement par thérapie génique non-virale de la DMD, le seuil thérapeutique des 40% de fibres musculaires transfectées à l'échelle du membre entier n'est pas atteint avec ce type d'approche. Différentes pistes d'optimisation ont donc été proposées et testées. L'étape du franchissement du sarcolemme a pu être facilitée, grâce à l'utilisation de CTAN. L'approche DTS a aussi été explorée pour augmenter l'efficacité du transfert de gènes par approche HLV à l'étape de translocation du plasmide dans le noyau. Des bénéfices, certes modestes, ont ainsi pu être obtenus.

Les différentes approches développées dans ce manuscrit pour optimiser le transfert de gènes par administration HLV pourraient à terme être combinées, mais aussi testées chez un modèle murin particulièrement pertinent pour la DMD à savoir le myorat (Larcher et al. 2014). Plusieurs investigations présentées dans ce document sont toujours en cours d'exploration. À terme, il pourrait être intéressant d'associer plusieurs approches thérapeutiques pour la DMD. Ainsi, une thérapie génique utilisant des vecteurs viraux pourrait être utilisée pour une transduction des muscles du corps entier. L'injection HLV, comme méthode non-virale, pourrait venir compléter celle-ci au niveau des membres, pour y maintenir l'expression du transgène à un seuil thérapeutique sur le très long terme, en pratiquant des ré-administrations. De même, l'administration HLV pourrait être pratiquée en premier recours pour permettre un maintien de la mobilité des patients et en améliorer la qualité de vie. Dans ce contexte, les muscles des membres seraient préservés plus longtemps des phénomènes physiopathologiques de la DMD. Ceci pourrait retarder l'administration, notamment systémique, d'une thérapie génique virale qui viendrait alors palier le déficit musculaire du reste du corps. Enfin, de tels schémas thérapeutiques, pourraient être complétés par une approche médicamenteuse permettant la surexpression d'utrophine (Euzutromid) (Guiraud et al. 2019). Dans ce contexte, un bénéfice clinique pourrait être obtenu avec des taux de dystrophine inférieurs à ceux actuellement requis.

Bibliographie

Aartsma-Rus, Annemieke. 2017. "FDA Approval of Nusinersen for Spinal Muscular Atrophy Makes 2016 the Year of Splice Modulating Oligonucleotides." *Nucleic Acid Therapeutics* 27 (2): 67–69. <https://doi.org/10.1089/nat.2017.0665>.

Afonso, Damien, Tony Le Gall, Hélène Couthon-Gourvès, Axelle Gr elard, Shipra Prakash, Mathieu Berchel, Nelly Kervarec, Erick J. Dufourc, Tristan Montier, and Paul-Alain Jaffrès. 2016. "Triggering Bilayer to Inverted-Hexagonal Nanostructure Formation by Thiol-Ene Click Chemistry on Cationic Lipids: Consequences on Gene Transfection." *Soft Matter* 12 (20): 4516–20. <https://doi.org/10.1039/c6sm00609d>.

Agarkova, Irina, and Jean-Claude Perriard. 2005. "The M-Band: An Elastic Web That Crosslinks Thick Filaments in the Center of the Sarcomere." *Trends in Cell Biology* 15 (9): 477–85. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.07.001>.

Aied, Ahmed, Udo Greiser, Abhay Pandit, and Wenxin Wang. 2013. "Polymer Gene Delivery: Overcoming the Obstacles." *Drug Discovery Today* 18 (21): 1090–98. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.06.014>.

Alderton, Janet M., and Richard A. Steinhardt. 2000. "How Calcium Influx through Calcium Leak Channels Is Responsible for the Elevated Levels of Calcium-Dependent Proteolysis in Dystrophic Myotubes." *Trends in Cardiovascular Medicine* 10 (6): 268–72.

Alderton, Janet M., and Richard A. Steinhardt. 2000. "Calcium Influx through Calcium Leak Channels Is Responsible for the Elevated Levels of Calcium-Dependent Proteolysis in Dystrophic Myotubes." *Journal of Biological Chemistry* 275 (13): 9452–60. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9452>.

Alimi-Guez, Debborah, Christian Leborgne, Gaelle Pembouong, Laetitia Van Wittenberghe, Nathalie Mignet, Daniel Scherman, and Antoine Kichler. 2009. "Evaluation of the Muscle Gene Transfer Activity of a Series of Amphiphilic Triblock Copolymers." *The Journal of Gene Medicine* 11 (12): 1114–24. <https://doi.org/10.1002/jgm.1396>.

Allen, David G., Nicholas P. Whitehead, and Stanley C. Froehner. 2016. "Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca²⁺, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy." *Physiological Reviews* 96 (1): 253–305. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2015>.

Al-Qusairi, Lama, and Jocelyn Laporte. 2011. "T-Tubule Biogenesis and Triad Formation in Skeletal Muscle and Implication in Human Diseases." *Skeletal Muscle* 1 (July): 26. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-26>.

Alton, Eric W. F. W., David K. Armstrong, Deborah Ashby, Katie J. Bayfield, Diana Bilton, Emily V. Bloomfield, A. Christopher Boyd, et al. 2015. "Repeated Nebulisation of Non-Viral CFTR Gene Therapy in Patients with Cystic Fibrosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 2b Trial." *The Lancet Respiratory Medicine* 3 (9): 684–91. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(15\)00245-3](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(15)00245-3).

Amma, Hideki, Keiji Naruse, Naoki Ishiguro, and Masahiro Sokabe. 2005. "Involvement of Reactive Oxygen Species in Cyclic Stretch-Induced NF- κ B Activation in Human Fibroblast Cells." *British Journal of Pharmacology* 145 (3): 364–73. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706182>.

André, F M, Christel Cournil-Henrionnet, D Vernerey, P Opolon, and L M Mir. 2006. "Variability of Naked DNA Expression after Direct Local Injection: The Influence of the Injection Speed." *Gene Therapy* 13 (23): 1619–27. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302827>.

Anonyme. 2011. "Muscular Dystrophy and New Gene Therapy-Based Treatments on the Horizon." October 10, 2011. <https://woodwardswhiskey.wordpress.com/2011/10/10/muscular-dystrophy-and-new-gene-therapy-based-treatments-on-the-horizon/>.

———. 2019. "X-Linked Recessive Inheritance." In *Wikipedia*. https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Xlinked_recessive_inheritance&oldid=916432493

Arechavala-Gomez, Virginia, Maria Kinali, Lucy Feng, Michela Guglieri, Geraldine Edge, Marion Main, David Hunt, et al. 2010. "Revertant Fibres and Dystrophin Traces in Duchenne Muscular Dystrophy: Implication for Clinical Trials." *Neuromuscular Disorders* 20 (5): 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2010.03.007>.

Baechle, Thomas R., and Roger W. Earle. 2008. *Essentials of Strength Training and Conditioning*. Human Kinetics.

Bai, Haiqing, Gillian M. Schiralli Lester, Laura C. Petishnok, and David A. Dean. 2017. "Cytoplasmic Transport and Nuclear Import of Plasmid DNA." *Bioscience Reports* 37 (6). <https://doi.org/10.1042/BSR20160616>.

Baltimore, David. 1970. "RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of RNA Tumour Viruses." *Nature* 226 (5252): 1209–11. <https://doi.org/10.1038/2261209a0>.

Barthélémy, Inès, Fernanda Pinto-Mariz, Erica Yada, Loïc Desquilbet, Wilson Savino, Suse Dayse Silva-Barbosa, Anne-Marie Faussat, et al. 2014. "Predictive Markers of Clinical Outcome in the GRMD Dog Model of Duchenne Muscular Dystrophy." *Disease Models & Mechanisms* 7 (11): 1253–61. <https://doi.org/10.1242/dmm.016014>.

Bassett, David I., Robert J. Bryson-Richardson, David F. Daggett, Philippe Gautier, David G. Keenan, and Peter D. Currie. 2003. "Dystrophin Is Required for the Formation of Stable Muscle Attachments in the Zebrafish Embryo." *Development (Cambridge, England)* 130 (23): 5851–60. <https://doi.org/10.1242/dev.00799>.

Batrakova, Elena V., and Alexander V. Kabanov. 2008. "Pluronic Block Copolymers: Evolution of Drug Delivery Concept from Inert Nanocarriers to Biological Response Modifiers." *Journal of Controlled Release, Fifth International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium*, 130 (2): 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.04.013>.

Bauer, Marius, Christian Lautenschlaeger, Kristian Kempe, Lutz Tauhardt, Ulrich S. Schubert, and Dagmar Fischer. 2012. "Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(Ethylene Glycol): Comparison of in Vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility." *Macromolecular Bioscience* 12 (7): 986–98. <https://doi.org/10.1002/mabi.201200017>.

Beastrom, Nicholas, Haiyan Lu, Allison Macke, Benjamin D. Canan, Eric K. Johnson, Christopher M. Penton, Brian K. Kaspar, et al. 2011. "Mdx5cv Mice Manifest More Severe Muscle Dysfunction and Diaphragm Force Deficits than Do Mdx Mice." *The American Journal of Pathology* 179 (5): 2464–74. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.009>.

Becker, Peter E., and F. Kiener. 1955. "Eine neue x-chromosomale Muskeldystrophie." *Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten* 193 (4): 427–48. <https://doi.org/10.1007/BF00343141>.

Belanto, Joseph J., Tara L. Mader, Michael D. Eckhoff, Dana M. Strandjord, Glen B. Banks, Melissa K. Gardner, Dawn A. Lowe, and James M. Ervasti. 2014. "Microtubule Binding Distinguishes Dystrophin from Utrophin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (15): 5723–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1323842111>.

Bell, C. David, and Patrick E. Conen. 1968. "Histopathological Changes in Duchenne Muscular Dystrophy." *Journal of the Neurological Sciences* 7 (3): 529–44. [https://doi.org/10.1016/0022-510X\(68\)90058-0](https://doi.org/10.1016/0022-510X(68)90058-0).

Bello-Roufaï, Mahajoub, Olivier Lambert, and Bruno Pitard. 2007. "Relationships between the Physicochemical Properties of an Amphiphilic Triblock Copolymers/DNA Complexes and Their Intramuscular Transfection Efficiency." *Nucleic Acids Research* 35 (3): 728–39. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl860>.

Ben Yaou, Rabah, Aurélie Nicolas, France Leturcq, and Élisabeth Le Rumeur. 2016. "eDystrophin : un nouvel outil dédié à une meilleure compréhension des dystrophinopathies." *Les Cahiers de Myologie*, no. 13 (June): 15–24. <https://doi.org/10.1051/myolog/201613005>.

Berchel, Mathieu, Tony Le Gall, Olivier Lozach, Jean-Pierre Haelters, Tristan Montier, and Paul-Alain Jaffrès. 2016. "Lipophosphoramidate-Based Bipolar Amphiphiles: Their Syntheses and Transfection Properties." *Organic & Biomolecular Chemistry* 14 (10): 2846–53. <https://doi.org/10.1039/c5ob02512e>.

Bertrand, Emilie, Cristine Gonçalves, Ludivine Billiet, Jean Pierre Gomez, Chantal Pichon, Hervé Cheradame, Patrick Midoux, and Philippe Guégan. 2011. "Histidinylated Linear PEI: A New Efficient Non-Toxic Polymer for Gene Transfer." *Chemical Communications (Cambridge, England)* 47 (46): 12547–49. <https://doi.org/10.1039/c1cc15716g>.

Betts, Gordon J., Kelly A. Young, James A. Wise, Eddie Johnson, Brandon Poe, Dean H. Kruse, Oksana Korol, Jody E. Johnson, Mark Womble, and Peter De Saix. 2013. *Anatomy and Physiology*. OpenStax. Houston, Texas. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/10-3-muscle-fiber-contraction-and-relaxation/>.

Bhat, Hina F., Saima S. Mir, Khalid B. Dar, Zuhaib F. Bhat, Riaz A. Shah, and Nazir A. Ganai. 2018. "ABC of Multifaceted Dystrophin Glycoprotein Complex (DGC)." *Journal of Cellular Physiology* 233 (7): 5142–59. <https://doi.org/10.1002/jcp.25982>.

Billiet, Ludivine, Jean-Pierre Gomez, Mathieu Berchel, Paul-Alain Jaffrès, Tony Le Gall, Tristan Montier, Emilie Bertrand, et al. 2012. "Gene Transfer by Chemical Vectors, and Endocytosis Routes of Polyplexes, Lipoplexes and Lipopolyplexes in a Myoblast Cell Line." *Biomaterials* 33 (10): 2980–90. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.12.027>.

Birnkrant, David J, Katharine Bushby, Carla M Bann, Susan D Apkon, Angela Blackwell, David Brumbaugh, Laura E Case, et al. 2018. "Diagnosis and Management of Duchenne Muscular Dystrophy, Part 1: Diagnosis, and Neuromuscular, Rehabilitation, Endocrine, and Gastrointestinal and Nutritional Management." *The Lancet. Neurology* 17 (3): 251–67. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30024-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30024-3).

Bladen, Catherine L, David Salgado, Soledad Monges, Maria E Foncuberta, Kyriaki Kekou, Konstantina Kosma, Hugh Dawkins, et al. 2015. "The TREAT-NMD DMD Global Database: Analysis of More than 7,000 Duchenne Muscular Dystrophy Mutations." *Human Mutation* 36 (4): 395–402. <https://doi.org/10.1002/humu.22758>.

Blaese, R. Michael, Kenneth W. Culver, A. Dusty Miller, Charles S. Carter, Thomas Fleisher, Mario Clerici, Gene Shearer, et al. 1995. "T Lymphocyte-Directed Gene Therapy for ADA-SCID: Initial Trial Results after 4 Years." *Science (New York, N.Y.)* 270 (5235): 475–80. <https://doi.org/10.1126/science.270.5235.475>.

Blake, Derek J., Andrew Weir, Sarah E. Newey, and Kay E. Davies. 2002. "Function and Genetics of Dystrophin and Dystrophin-Related Proteins in Muscle." *Physiological Reviews* 82 (2): 291–329. <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2001>.

Blankinship, Michael J., Paul Gregorevic, James M. Allen, Scott Q. Harper, Hollie Harper, Christine L. Halbert, Dusty A. Miller, and Jeffrey S. Chamberlain. 2004. "Efficient Transduction of Skeletal Muscle Using Vectors Based on Adeno-Associated Virus Serotype 6." *Molecular Therapy* 10 (4): 671–78. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.016>.

Blankinship, Michael J., Paul Gregorevic, and Jeffrey S. Chamberlain. 2006. "Gene Therapy Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy Utilizing Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors." *Molecular Therapy* 13 (2): 241–49. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.11.001>.

Bloch, Robert J., and Hugo Gonzalez-Serratos. 2003. "Lateral Force Transmission Across Costameres in Skeletal Muscle." *Exercise and Sport Sciences Reviews* 31 (2): 73.

Bodensteiner, J. B., and A. G. Engel. 1978. "Intracellular Calcium Accumulation in Duchenne Dystrophy and Other Myopathies: A Study of 567,000 Muscle Fibers in 114 Biopsies." *Neurology* 28 (5): 439–46. <https://doi.org/10.1212/wnl.28.5.439>.

Bouraoui, Amal, Mathieu Berchel, Rosy Ghanem, Véronique Vié, Gilles Paboeuf, Laure Deschamps, Olivier Lozach, Tony Le Gall, Tristan Montier, and Paul-Alain Jaffrès. 2019. "Substitution of Unsaturated Lipid Chains by Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Consequences and Application for Gene Delivery." *Organic & Biomolecular Chemistry* 17 (14): 3609–16. <https://doi.org/10.1039/c9ob00473d>.

Bouraoui, Amal, Rosy Ghanem, Mathieu Berchel, Véronique Vié, Yann Le Guen, Gilles Paboeuf, Laure Deschamps, Tony Le Gall, Tristan Montier, and Paul-Alain Jaffrès. 2019. "Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery." *Chemphyschem: A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 20 (17): 2187–94. <https://doi.org/10.1002/cphc.201900626>.

Boussif, Otmane, Frank Lezoualc'h, Maria A. Zanta, Mojgan D. Mergny, Daniel Scherman, Barbara Demeneix, and Jean-Paul Behr. 1995. "A Versatile Vector for Gene and Oligonucleotide Transfer into Cells in Culture and in Vivo: Polyethylenimine." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16): 7297–7301. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7297>.

Bozkir, Asuman, and Ongun Mehmet Saka. 2004. "Chitosan Nanoparticles for Plasmid DNA Delivery: Effect of Chitosan Molecular Structure on Formulation and Release Characteristics." *Drug Delivery* 11 (2): 107–12. <https://doi.org/10.1080/10717540490280705>.

Brack, Andrew S., and Thomas A. Rando. 2012. "Tissue-Specific Stem Cells: Lessons from the Skeletal Muscle Satellite Cell." *Cell Stem Cell* 10 (5): 504–14. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.04.001>.

Breuzard, Gilles, Magdalena Tertil, Cristine Gonçalves, Hervé Cheradame, Philippe Géguan, Chantal Pichon, and Patrick Midoux. 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 Research* 36 (12): e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn287>.

Brissault, Blandine, Antoine Kichler, Christian Leborgne, Nathalie Jarroux, Hervé Cheradame, and Christine Guis. 2007. "Amphiphilic Poly[(Propylene Glycol)-Block-(2-Methyl-2-Oxazoline)] Copolymers for Gene Transfer in Skeletal Muscle." *ChemMedChem* 2 (8): 1202–7. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700068>.

Bulfield, Grahame, W G Siller, P A Wight, and Karen J. Moore. 1984. "X Chromosome-Linked Muscular Dystrophy (Mdx) in the Mouse." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (4): 1189–92.

Burakiewicz, Jędrzej, Christopher D. J. Sinclair, Dirk Fischer, Glenn A. Walter, Hermien E. Kan, and Kieren G. Hollingsworth. 2017. "Quantifying Fat Replacement of Muscle by Quantitative MRI in Muscular Dystrophy." *Journal of Neurology* 264 (10): 2053–67. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8547-3>.

Burghes, Arthur H. M., Cairine Logan, Xiuyuan Hu, Bonnie Belfall, Ronald G. Worton, and Peter N. Ray. 1987. "A CDNA Clone from the Duchenne/Becker Muscular Dystrophy Gene." *Nature* 328 (6129): 434–37. <https://doi.org/10.1038/328434a0>.

Bushby, Katharine, Richard Finkel, David J. Birnkrant, Laura E. Case, Paula R. Clemens, Linda Cripe, Ajay Kaul, et al. 2010. "Diagnosis and Management of Duchenne Muscular Dystrophy, Part 1: Diagnosis, and Pharmacological and Psychosocial Management." *The Lancet. Neurology* 9 (1): 77–93. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(09\)70271-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(09)70271-6).

Cardamone, Michael, Basil T. Darras, and Monique M. Ryan. 2008. "Inherited Myopathies and Muscular Dystrophies." *Seminars in Neurology* 28 (02): 250–59. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1062269>.

Cassandrini, Denise, Rosanna Trovato, Anna Rubegni, Sara Lenzi, Chiara Fiorillo, Jacopo Baldacci, Carlo Minetti, Guja Astrea, Claudio Bruno, and Filippo M. Santorelli. 2017. "Congenital Myopathies: Clinical Phenotypes and New Diagnostic Tools." *Italian Journal of Pediatrics* 43 (November). <https://doi.org/10.1186/s13052-017-0419-z>.

Cerecedo, Doris. 2017. "Dystrophin–Glycoprotein Complex in Blood Cells." *Cytoskeleton - Structure, Dynamics, Function and Disease*, May. <https://doi.org/10.5772/66857>.

Chang, Richard F., and Scott J. Mubarak. 2012. "Pathomechanics of Gowers' Sign: A Video Analysis of a Spectrum of Gowers' Maneuvers." *Clinical Orthopaedics and Related Research* 470 (7): 1987–91. <https://doi.org/10.1007/s11999-011-2210-6>.

Chapman, Mark A., Rachel Meza, and Richard L. Lieber. 2016. "Skeletal Muscle Fibroblasts in Health and Disease." *Differentiation; Research in Biological Diversity* 92 (3): 108–15. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.05.007>.

Chèvre, Raphaël, Olivier Le Bihan, Fanny Beilvert, Benoit Chatin, Benoit Barteau, Mathieu Mével, Olivier Lambert, and Bruno Pitard. 2011. "Amphiphilic Block Copolymers Enhance the Cellular Uptake of DNA Molecules through a Facilitated Plasma Membrane Transport." *Nucleic Acids Research* 39 (4): 1610–22. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq922>.

Collins, Charlotte A., and Jennifer E. Morgan. 2003. "Duchenne's Muscular Dystrophy: Animal Models Used to Investigate Pathogenesis and Develop Therapeutic Strategies." *International Journal of Experimental Pathology* 84 (4): 165–72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2613.2003.00354.x>.

Collins, Francis S., and Scott Gottlieb. 2018. "The Next Phase of Human Gene-Therapy Oversight." *The New England Journal of Medicine* 379 (15): 1393–95. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1810628>.

Constantin, Bruno. 2014. "Dystrophin Complex Functions as a Scaffold for Signalling Proteins." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Reciprocal influences between cell cytoskeleton and membrane channels, receptors and transporters, 1838 (2): 635–42. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.023>.

Conte, G, and L Gioja. 1836. "Scrofolo Del Sistema Muscolare." *Annali Clinici Dell'Ospedale Degli Incurabili Di Napoli* 2: 66–79.

Cooper, Geoffrey M. 2000. "Actin, Myosin, and Cell Movement." *The Cell: A Molecular Approach. 2nd Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9961/>.

Danialou, Gawiyou, Alain S. Comtois, Stefan Matecki, Josephine Nalbantoglu, George Karpati, Renald Gilbert, Pascale Geoffroy, Sandra Gilligan, Jean-Francois Tanguay, and Basil J. Petrof. 2005. "Optimization of Regional Intraarterial Naked DNA-Mediated Transgene Delivery to Skeletal Muscles in a Large Animal Model." *Molecular Therapy* 11 (2): 257–66. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.09.016>.

Deconinck, Nicolas, and Bernard Dan. 2007. "Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses." *Pediatric Neurology* 36 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.pediatrneurol.2006.09.016>.

Desguerre, Isabelle, and Vincent Laugel. 2016. “Diagnostic et histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne.” */data/revues/0929693X/v22i12sS1/S0929693X16300057/*, January. <https://www.em-consulte.com/en/article/1026535>.

Douglas, Andrew G. L., and Matthew J. A. Wood. 2013. “Splicing Therapy for Neuromuscular Disease.” *Molecular and Cellular Neurosciences* 56 (September): 169–85. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2013.04.005>.

Duan, Dongsheng. 2009. *Muscle Gene Therapy*. Springer Science & Business Media.

———. 2016. “Dystrophin Gene Replacement and Gene Repair Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy in 2016: An Interview.” *Human Gene Therapy. Clinical Development* 27 (1): 9–18. <https://doi.org/10.1089/humc.2016.001>.

———. 2018. “Systemic AAV Micro-Dystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy.” *Molecular Therapy* 26 (10): 2337–56. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.07.011>.

Duchenne, Guillaume B.A. 1858. “De l’ataxie Locomotrice Progressive.” *Archives Générales de Médecine* 12 (5): 641–52.

———. 1862. *Album de Photographies Pathologiques Complémentaire Du Livre Intitulé de l’électrisation Localisée*. Paris: Baillière.

———. 1868. “Recherches Sur La Paralysie Musculaire Pseudo-Hypertrophique Ou Paralysie Myo-Sclérosique.” *Archives Générales de Médecine* 11: 179–209.

Dufès, Christine, Ijeoma F. Uchegbu, and Andreas G. Schätzlein. 2005. “Dendrimers in Gene Delivery.” *Advanced Drug Delivery Reviews, Dendrimers: a Versatile Targeting Platform*, 57 (15): 2177–2202. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.09.017>.

Dumont, Nicolas A., C. Florian Bentzinger, Marie-Claude Sincennes, and Michael A. Rudnicki. 2015. “Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration.” *Comprehensive Physiology* 5 (3): 1027–59. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140068>.

Dwianingsih, Ery Kus, Rusdy Ghazali Malueka, Atsushi Nishida, Kyoko Itoh, Tomoko Lee, Mariko Yagi, Kazumoto Iijima, Yasuhiro Takeshima, and Masafumi Matsuo. 2014. “A Novel Splicing Silencer Generated by *DMD* Exon 45 Deletion Junction Could Explain Upstream Exon 44 Skipping That Modifies Dystrophinopathy.” *Journal of Human Genetics* 59 (8): 423–29. <https://doi.org/10.1038/jhg.2014.36>.

Ehmsen, Jeffrey, Ellen Poon, and Kay Davies. 2002. “The Dystrophin-Associated Protein Complex.” *Journal of Cell Science* 115 (14): 2801–3.

Eliyahu, H., Y. Barenholz, and A. J. Domb. 2005. “Polymers for DNA Delivery.” *Molecules (Basel, Switzerland)* 10 (1): 34–64. <https://doi.org/10.3390/10010034>.

Elouahabi, Abdelatif, and Jean-Marie Ruyschaert. 2005. “Formation and Intracellular Trafficking of Lipoplexes and Polyplexes.” *Molecular Therapy* 11 (3): 336–47. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.12.006>.

- Emery, Alan. 2001. "Duchenne Muscular Dystrophy or Meryon's Disease." *The Lancet* 357 (9267): 1529. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04681-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04681-X).
- Emery, Alan E. H. 1977. "Muscle Histology and Creatine Kinase Levels in the Foetus in Duchenne Muscular Dystrophy." *Nature* 266 (5601): 472–73. <https://doi.org/10.1038/266472a0>.
- . 1998. "The Muscular Dystrophies." *BMJ* 317 (7164): 991–95. <https://doi.org/10.1136/bmj.317.7164.991>.
- Emery, Alan EH. 2002. "The Muscular Dystrophies." *The Lancet* 359 (9307): 687–95. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07815-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07815-7).
- England, S. B., L. V. B. Nicholson, M. A. Johnson, S. M. Forrest, D. R. Love, E. E. Zubrzycka-Gaarn, D. E. Bulman, J. B. Harris, and K. E. Davies. 1990. "Very Mild Muscular Dystrophy Associated with the Deletion of 46% of Dystrophin." *Nature* 343 (6254): 180. <https://doi.org/10.1038/343180a0>.
- Ervasti, James M. 2003. "Costameres: The Achilles' Heel of Herculean Muscle." *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 13591–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.R200021200>.
- "Exon Skipping for Duchenne Muscular Dystrophy." 2014. *Neurology Update* (blog). March 22, 2014. <https://mmcneuro.wordpress.com/2014/03/22/exon-skipping-for-duchenne-muscular-dystrophy/>.
- Fairclough, Rebecca J., Matthew J. Wood, and Kay E. Davies. 2013. "Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy: Renewed Optimism from Genetic Approaches." *Nature Reviews Genetics* 14 (6): 373–78. <https://doi.org/10.1038/nrg3460>.
- Fan, Zheng, Keith Kocis, Robert Valley, James F. Howard, Manisha Chopra, Hongyu An, Weili Lin, Joseph Muenzer, and William Powers. 2012. "Safety and Feasibility of High-Pressure Transvenous Limb Perfusion With 0.9% Saline in Human Muscular Dystrophy." *Molecular Therapy* 20 (2): 456–61. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.137>.
- Fan, Zheng, Keith Kocis, Robert Valley, James F. Howard, Manisha Chopra, Yasheng Chen, Hongyu An, Weili Lin, Joseph Muenzer, and William Powers. 2015. "High-Pressure Transvenous Perfusion of the Upper Extremity in Human Muscular Dystrophy: A Safety Study with 0.9% Saline." *Human Gene Therapy* 26 (9): 614–21. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.023>.
- Farhood, H., N. Serbina, and L. Huang. 1995. "The Role of Dioleoyl Phosphatidylethanolamine in Cationic Liposome Mediated Gene Transfer." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1235 (2): 289–95. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(95\)80016-9](https://doi.org/10.1016/0005-2736(95)80016-9).
- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. "Lipofection: A Highly Efficient, Lipid-Mediated DNA-Transfection Procedure." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (21): 7413–17. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7413>.

Fischer, Alain, Salima Hacein-Bey-Abina, and Marina Cavazzana-Calvo. 2010. "20 Years of Gene Therapy for SCID." *Nature Immunology* 11 (June): 457–60. <https://doi.org/10.1038/ni0610-457>.

Flanigan, Kevin M., Diane Dunn, Andrew von Niederhausern, Payam Soltanzadeh, Eduard Gappmaier, Michael T. Howard, Jacinda Sampson, et al. 2009. "Mutational Spectrum of DMD Mutations in Dystrophinopathy Patients: Application of Modern Diagnostic Techniques to a Large Cohort." *Human Mutation* 30 (12): 1657–66. <https://doi.org/10.1002/humu.21114>.

Foulkes, Ernest C. 2012. *Cadmium*. Springer Science & Business Media.

Frontera, Walter R., and Julien Ochala. 2015. "Skeletal Muscle: A Brief Review of Structure and Function." *Calcified Tissue International* 96 (3): 183–95. <https://doi.org/10.1007/s00223-014-9915-y>.

Gaal, Ethlenn V. B. van, Ronald S. Oosting, Roel van Eijk, Marta Bakowska, Dries Feyen, Robbert Jan Kok, Wim E. Hennink, Daan J. A. Crommelin, and Enrico Mastrobattista. 2011. "DNA Nuclear Targeting Sequences for Non-Viral Gene Delivery." *Pharmaceutical Research* 28 (7): 1707–22. <https://doi.org/10.1007/s11095-011-0407-8>.

Gailly, Philippe. 2012. "TRP Channels in Normal and Dystrophic Skeletal Muscle." *Current Opinion in Pharmacology, Respiratory • Musculoskeletal*, 12 (3): 326–34. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.01.018>.

Gao, Quan, and Elizabeth M McNally. 2015. "The Dystrophin Complex: Structure, Function and Implications for Therapy." *Comprehensive Physiology* 5 (3): 1223–39. <https://doi.org/10.1002/cphy.c140048>.

Gaud, Aurélie, Jean-Marc Simon, Thomas Witzel, Maité Carre-Pierrat, Camille G Wermuth, and Laurent Ségalat. 2004. "Prednisone Reduces Muscle Degeneration in Dystrophin-Deficient *Caenorhabditis Elegans*." *Neuromuscular Disorders* 14 (6): 365–70. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2004.02.011>.

Gau-Racine, Jocelyne, Jyotsana Lal, Mehdi Zeghal, and Loïc Auvray. 2007. "PEO-PPO Block Copolymer Vectors Do Not Interact Directly with DNA but with Lipid Membranes." *The Journal of Physical Chemistry. B* 111 (33): 9900–9907. <https://doi.org/10.1021/jp0687302>.

Gaymalov, Zagit Z., Zhihui Yang, Vladimir M. Pisarev, Valery Yu Alakhov, and Alexander V. Kabanov. 2009. "The Effect of the Nonionic Block Copolymer Pluronic P85 on Gene Expression in Mouse Muscle and Antigen-Presenting Cells." *Biomaterials* 30 (6): 1232–45. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.064>.

Gilchrist, Soyoung C., Martin P. Ontell, Stefan Kochanek, and Paula R. Clemens. 2002. "Immune Response to Full-Length Dystrophin Delivered to Dmd Muscle by a High-Capacity Adenoviral Vector." *Molecular Therapy* 6 (3): 359–68. <https://doi.org/10.1006/mthe.2002.0675>.

Ginn, Samantha L., Anais K. Amaya, Ian E. Alexander, Michael Edelstein, and Mohammad R. Abedi. 2018. "Gene Therapy Clinical Trials Worldwide to 2017: An Update." *The Journal of Gene Medicine* 20 (5): e3015. <https://doi.org/10.1002/jgm.3015>.

Gokhin, David S., Matthew T. Tierney, Zhenhua Sui, Alessandra Sacco, and Velia M. Fowler. 2014. "Calpain-Mediated Proteolysis of Tropomodulin Isoforms Leads to Thin Filament Elongation in Dystrophic Skeletal Muscle." *Molecular Biology of the Cell* 25 (6): 852–65. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-10-0608>.

Gonçalves, Cristine, Marie-Yvonne Ardourel, Martine Decoville, Gilles Breuzard, Patrick Midoux, Brigitte Hartmann, and Chantal Pichon. 2009. "An Optimized Extended DNA Kappa B Site That Enhances Plasmid DNA Nuclear Import and Gene Expression." *The Journal of Gene Medicine* 11 (5): 401–11. <https://doi.org/10.1002/jgm.1312>.

Gowers, William R. 1879. *Pseudo-Hypertrophic Muscular Paralysis: A Clinical Lecture*. J. & A. Churchill. London.

Greely, Henry T. 2019. "CRISPR'd Babies: Human Germline Genome Editing in the 'He Jiankui Affair.'" *Journal of Law and the Biosciences* 6 (1): 111–83. <https://doi.org/10.1093/jlb/lasz010>.

Guiraud, Simon, Annemieke Aartsma-Rus, Natassia M. Vieira, Kay E. Davies, Gert-Jan B. van Ommen, and Louis M. Kunkel. 2015. "The Pathogenesis and Therapy of Muscular Dystrophies." *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 16 (1): 281–308. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-090314-025003>.

Guiraud, Simon, Benjamin Edwards, Arran Babbs, Sarah E. Squire, Adam Berg, Lee Moir, Matthew J. Wood, and Kay E. Davies. 2019. "The Potential of Utrophin and Dystrophin Combination Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy." *Human Molecular Genetics* 28 (13): 2189–2200. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz049>.

Hacein-Bey-Abina, Salima, Julia Hauer, Annick Lim, Capucine Picard, Gary P. Wang, Charles C. Berry, Chantal Martinache, et al. 2010. "Efficacy of Gene Therapy for X-Linked Severe Combined Immunodeficiency." *The New England Journal of Medicine* 363 (4): 355–64. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1000164>.

Haensler, Jean, and Francis C. Szoka. 1993. "Polyamidoamine Cascade Polymers Mediate Efficient Transfection of Cells in Culture." *Bioconjugate Chemistry* 4 (5): 372–79.

Hagstrom, James E., Julia Hegge, Guofeng Zhang, Mark Noble, Vladimir Budker, David L. Lewis, Hans Herweijer, and Jon A. Wolff. 2004. "A Facile Nonviral Method for Delivering Genes and siRNAs to Skeletal Muscle of Mammalian Limbs." *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* 10 (2): 386–98. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.05.004>.

Harris, Rania, Aurélien Chatelier, Christophe Magaud, Nadine Déliot, and Bruno Constantin. 2013. "Involvement of TRPV2 and SOCE in Calcium Influx Disorder in DMD Primary Human Myotubes with a Specific Contribution of A1-Syntrophin and PLC/PKC in SOCE Regulation." *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 304 (9): C881–94. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00182.2012>.

Haycock, John W., Sheila MacNeil, Peter Jones, John B. Harris, and David Mantle. 1996. "Oxidative Damage to Muscle Protein in Duchenne Muscular Dystrophy." *Neuroreport* 8 (1): 357–61.

Hegge, Julia O., Christine I. Wooddell, Guofeng Zhang, James E. Hagstrom, Serge Braun, Thierry Huss, Magdolna G. Sebestyén, Marina E. Emborg, and Jon A. Wolff. 2010a. "Evaluation of Hydrodynamic Limb Vein Injections in Nonhuman Primates." *Human Gene Therapy* 21 (7): 829–42. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.172>.

Henderson, Christine A., Christopher G. Gomez, Stefanie M. Novak, Lei Mi-Mi, and Carol C. Gregorio. 2017. "Overview of the Muscle Cytoskeleton." *Comprehensive Physiology* 7 (3): 891–944. <https://doi.org/10.1002/cphy.c160033>.

Hewitt, Jennifer E., Amelia K. Pollard, Leila Lesanpezeshki, Colleen S. Deane, Christopher J. Gaffney, Timothy Etheridge, Nathaniel J. Szewczyk, and Siva A. Vanapalli. 2018. "Muscle Strength Deficiency and Mitochondrial Dysfunction in a Muscular Dystrophy Model of *Caenorhabditis Elegans* and Its Functional Response to Drugs." *Disease Models & Mechanisms* 11 (12). <https://doi.org/10.1242/dmm.036137>.

Hinderer, Christian, Nathan Katz, Elizabeth L. Buza, Cecilia Dyer, Tamara Goode, Peter Bell, Laura K. Richman, and James M. Wilson. 2018. "Severe Toxicity in Nonhuman Primates and Piglets Following High-Dose Intravenous Administration of an Adeno-Associated Virus Vector Expressing Human SMN." *Human Gene Therapy* 29 (3): 285–98. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.015>.

Hnia, Karim, Dora Zouiten, Sonia Cantel, Delphine Chazalette, Gérald Hugon, Jean-Alain Fehrentz, Ahmed Masmoudi, et al. 2007. "ZZ Domain of Dystrophin and Utrophin: Topology and Mapping of a Beta-Dystroglycan Interaction Site." *The Biochemical Journal* 401 (3): 667–77. <https://doi.org/10.1042/BJ20061051>.

Hoffman, Eric P., Robert H. Brown, and Louis M. Kunkel. 1987. "Dystrophin: The Protein Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Locus." *Cell* 51 (6): 919–28.

Hollinger, Katrin, and Jeffrey S. Chamberlain. 2015. "Viral Vector Mediated Gene Therapies." *Current Opinion in Neurology* 28 (5): 522–27. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000241>.

Huin, Cécile, Tony Le Gall, Benoît Barteau, Bruno Pitard, Tristan Montier, Pierre Lehn, Hervé Cheradame, and Philippe Guégan. 2011. "Evidence of DNA Transfer across a Model Membrane by a Neutral Amphiphilic Block Copolymer." *The Journal of Gene Medicine* 13 (10): 538–48. <https://doi.org/10.1002/jgm.1612>.

Hunter, M. Ian S., and Jamaludin B. Mohamed. 1986. "Plasma Antioxidants and Lipid Peroxidation Products in Duchenne Muscular Dystrophy." *Clinica Chimica Acta* 155 (2): 123–31. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(86\)90273-1](https://doi.org/10.1016/0009-8981(86)90273-1).

Ilsley, Jane L., Marius Sudol, and Steven J. Winder. 2002. "The WW Domain: Linking Cell Signalling to the Membrane Cytoskeleton." *Cellular Signalling* 14 (3): 183–89. [https://doi.org/10.1016/S0898-6568\(01\)00236-4](https://doi.org/10.1016/S0898-6568(01)00236-4).

Itaka, Keiji, Kensuke Osada, Katsue Morii, Pilhan Kim, Seok-Hyun Yun, and Kazunori Kataoka. 2010. "Polyplex Nanomicelle Promotes Hydrodynamic Gene Introduction to Skeletal Muscle." *Journal of Controlled Release* 143 (1): 112–19. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.014>.

Iyombe-Engembe, Jean-Paul, Dominique L. Ouellet, Xavier Barbeau, Joël Rousseau, Pierre Chapdelaine, Patrick Lagüe, and Jacques P. Tremblay. 2016. "Efficient Restoration of the Dystrophin Gene Reading Frame and Protein Structure in DMD Myoblasts Using the CinDel Method." *Molecular Therapy. Nucleic Acids* 5 (January): e283. <https://doi.org/10.1038/mtna.2015.58>.

Jimshelishvili, Sopiko, Komal Marwaha, and Andrew I Sherman. 2019. "Physiology, Neuromuscular Transmission." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541133/>.

Juan-Mateu, Jonas, Lidia Gonzalez-Quereda, Maria Jose Rodriguez, Manel Baena, Edgard Verdura, Andres Nascimento, Carlos Ortez, Montserrat Baiget, and Pia Gallano. 2015. "DMD Mutations in 576 Dystrophinopathy Families: A Step Forward in Genotype-Phenotype Correlations." *PLOS ONE* 10 (8): e0135189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135189>.

Judson, Robert N., Regan-Heng Zhang, and Fabio M. A. Rossi. 2013. "Tissue-Resident Mesenchymal Stem/Progenitor Cells in Skeletal Muscle: Collaborators or Saboteurs?" *The FEBS Journal* 280 (17): 4100–4108. <https://doi.org/10.1111/febs.12370>.

Kabanov, Alexander, Jian Zhu, and Valery Alakhov. 2005. "Pluronic Block Copolymers for Gene Delivery." In *Advances in Genetics*, 53:231–61. Non-Viral Vectors for Gene Therapy, Second Edition: Part 1. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)53009-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)53009-8).

Kaemmerer, William F. 2018. "How Will the Field of Gene Therapy Survive Its Success?" *Bioengineering & Translational Medicine* 3 (2): 166–77. <https://doi.org/10.1002/btm2.10090>.

Kakulas, Byron A. 2008. "A Brief History of Muscular Dystrophy Research: A Personal Perspective." *Neurology India* 56 (3): 231–35.

Kastenschmidt, Jenna M., Ileen Avetyan, and S. A. Villalta. 2018. "Characterization of the Inflammatory Response in Dystrophic Muscle Using Flow Cytometry." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1687: 43–56. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7374-3_4.

Kawahara, Genri, Jeremy A. Karpf, Jennifer A. Myers, Matthew S. Alexander, Jeffrey R. Guyon, and Louis M. Kunkel. 2011. "Drug Screening in a Zebrafish Model of Duchenne Muscular Dystrophy." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (13): 5331–36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102116108>.

Kawahara, Genri, and Louis M. Kunkel. 2013. "Zebrafish Based Small Molecule Screens for Novel DMD Drugs." *Drug Discovery Today. Technologies* 10 (1): e91–96. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2012.03.001>.

Kelly-Worden, Marie, and Emily R. Thomas. 2014. "Mitochondrial Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy." In . <https://doi.org/10.4236/ojemd.2014.48020>.

Kieny, Pierre., Sylvaine Chollet, Perrine Delalande, Marc Le Fort, Armelle Magot, Yann Pereon, and Brigitte Perrouin Verbe. 2013. "Evolution of Life Expectancy of Patients with Duchenne Muscular Dystrophy at AFM Yolaine de Kepper Centre between 1981 and 2011." *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine* 56 (6): 443–54. <https://doi.org/10.1016/j.rehab.2013.06.002>.

- Knöll, Ralph, Byambajav Buyandelger, and Max Lab. 2011. "The Sarcomeric Z-Disc and Z-Discopathies." Research article. *BioMed Research International*. 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/569628>.
- Knop, Katrin, Richard Hoogenboom, Dagmar Fischer, and Ulrich S. Schubert. 2010. "Poly(Ethylene Glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives." *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 49 (36): 6288–6308. <https://doi.org/10.1002/anie.200902672>.
- Kolb, Stephen J., and John T. Kissel. 2015. "Spinal Muscular Atrophy." *Neurologic Clinics* 33 (4): 831–46. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2015.07.004>.
- Koltover, Ilya, Tim Salditt, Joachim O. Rädler, and Cyrus R. Safinya. 1998. "An Inverted Hexagonal Phase of Cationic Liposome-DNA Complexes Related to DNA Release and Delivery." *Science (New York, N.Y.)* 281 (5373): 78–81. <https://doi.org/10.1126/science.281.5373.78>.
- Köping-Höggård, Magnus, Ioannis Tubulekas, Huaji Guan, Kaylene Edwards, M. Nilsson, Km Vårum, and Per Artursson. 2001. "Chitosan as a Nonviral Gene Delivery System. Structure–Property Relationships and Characteristics Compared with Polyethylenimine in Vitro and after Lung Administration in Vivo." *Gene Therapy* 8 (14): 1108. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301492>.
- Kornegay, Joe N., Janet R. Bogan, Daniel J. Bogan, Martin K. Childers, Juan Li, Peter Nghiem, David A. Detwiler, et al. 2012. "Canine Models of Duchenne Muscular Dystrophy and Their Use in Therapeutic Strategies." *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 23 (0): 85–108. <https://doi.org/10.1007/s00335-011-9382-y>.
- Korthuis, Ronald J. 2011. *Anatomy of Skeletal Muscle and Its Vascular Supply*. Morgan & Claypool Life Sciences. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK57140/>.
- Kyrychenko, Viktoriia, Sergii Kyrychenko, Malte Tiburecy, John M. Shelton, Chengzu Long, Jay W. Schneider, Wolfram-Hubertus Zimmermann, Rhonda Bassel-Duby, and Eric N. Olson. 2017. "Functional Correction of Dystrophin Actin Binding Domain Mutations by Genome Editing." *JCI Insight* 2 (18). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95918>.
- Lange, Stephan, Nikos Pinotsis, Irina Agarkova, and Elisabeth Ehler. 2019. "The M-Band: The Underestimated Part of the Sarcomere." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, February. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.02.003>.
- Lapidos Karen A., Kakkar Rahul, and McNally Elizabeth M. 2004. "The Dystrophin Glycoprotein Complex." *Circulation Research* 94 (8): 1023–31. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000126574.61061.25>.
- Larcher, Thibaut, Aude Lafoux, Laurent Tesson, Séverine Remy, Virginie Thepenier, Virginie François, Caroline Le Guiner, et al. 2014. "Characterization of Dystrophin Deficient Rats: A New Model for Duchenne Muscular Dystrophy." *PloS One* 9 (10): e110371. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110371>.

Le Guiner, Caroline, Laurent Servais, Marie Montus, Thibaut Larcher, Bodvaël Fraysse, Sophie Moullec, Marine Allais, et al. 2017. "Long-Term Microdystrophin Gene Therapy Is Effective in a Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy." *Nature Communications* 8 (July): ncomms16105. <https://doi.org/10.1038/ncomms16105>.

Le Rumeur, Elisabeth. 2015. "Dystrophin and the Two Related Genetic Diseases, Duchenne and Becker Muscular Dystrophies." *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 15 (3). <https://doi.org/10.17305/bjbms.2015.636>.

Lee, Cody S., Elliot S. Bishop, Ruyi Zhang, Xinyi Yu, Evan M. Farina, Shujuan Yan, Chen Zhao, et al. 2017. "Adenovirus-Mediated Gene Delivery: Potential Applications for Gene and Cell-Based Therapies in the New Era of Personalized Medicine." *Genes & Diseases* 4 (2): 43–63. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2017.04.001>.

Lemieux, Pierre, Nadia Guérin, Glenn Paradis, Roxanne Proulx, Lioudmila Chistyakova, Alexander Kabanov, and Valery Alakhov. 2000. "A Combination of Poloxamers Increases Gene Expression of Plasmid DNA in Skeletal Muscle." *Gene Therapy* 7 (11): 986–91. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301189>.

Liang, Wanling, and Jenny K. W. Lam. 2012. "Endosomal Escape Pathways for Non-Viral Nucleic Acid Delivery Systems." *Molecular Regulation of Endocytosis*, July. <https://doi.org/10.5772/46006>.

Liang, Wen-Chen, Chen-Hua Wang, Po-Ching Chou, Wan-Zi Chen, and Yuh-Jyh Jong. 2018. "The Natural History of the Patients with Duchenne Muscular Dystrophy in Taiwan: A Medical Center Experience." *Pediatrics & Neonatology* 59 (2): 176–83. <https://doi.org/10.1016/j.pedneo.2017.02.004>.

Lilleker, James B., Yann Shern Keh, Federico Roncaroli, Reena Sharma, and Mark Roberts. 2018. "Metabolic Myopathies: A Practical Approach." *Practical Neurology* 18 (1): 14–26. <https://doi.org/10.1136/practneurol-2017-001708>.

Lin, Chao, and B. Abbas Lou. 2012. "4 Bioreducible Cationic Polymers for Gene Transfection." In .

Lundberg, Ingrid E., Frederick W. Miller, Anna Tjärnlund, and Matteo Bottai. 2016. "Diagnosis and Classification of Idiopathic Inflammatory Myopathies." *Journal of Internal Medicine* 280 (1): 39–51. <https://doi.org/10.1111/joim.12524>.

Lundstrom, Kenneth. 2018. "Viral Vectors in Gene Therapy." *Diseases (Basel, Switzerland)* 6 (2). <https://doi.org/10.3390/diseases6020042>.

Lungwitz, Uta, Miriam Breunig, Torsten Blunk, and Achim Göpferich. 2005. "Polyethylenimine-Based Non-Viral Gene Delivery Systems." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V* 60 (2): 247–66. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.11.011>.

Ma, Baichao, Shubiao Zhang, Huiming Jiang, Budiao Zhao, and Hongtao Lv. 2007. "Lipoplex Morphologies and Their Influences on Transfection Efficiency in Gene Delivery." *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 123 (3): 184–94. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.08.022>.

Mahindhoratep, S., H. Ait Bouda, Nelly El Shafey, Daniel Scherman, Antoine Kichler, Chantal Pichon, Patrick Midoux, Nathalie Mignet, and Michel F. Bureau. 2014. "NF-KB Related Transgene Expression in Mouse Tibial Cranial Muscle after PDNA Injection Followed or Not by Electrotransfer." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1840 (11): 3257–63. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.06.013>.

Martin, Benjamin, Matthieu Sainlos, Abderrahim Aissaoui, Noufissa Oudrhiri, Michelle Hauchecorne, Jean-Pierre Vigneron, Jean-Marie Lehn, and Pierre Lehn. 2005. "The Design of Cationic Lipids for Gene Delivery." *Current Pharmaceutical Design* 11 (3): 375–94. <https://doi.org/10.2174/1381612053382133>.

Mathiesen, Iacob. 1999. "Electropermeabilization of Skeletal Muscle Enhances Gene Transfer in Vivo." *Gene Therapy* 6 (4): 508–14. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3300847>.

Mauro, Alexander. 1961. "Satellite cell of skeletal muscle fibers." *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology* 9 (2): 493–95.

McGreevy, Joe W., Chady H. Hakim, Mark A. McIntosh, and Dongsheng Duan. 2015. "Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy: From Basic Mechanisms to Gene Therapy." *Disease Models & Mechanisms* 8 (3): 195–213. <https://doi.org/10.1242/dmm.018424>.

Mendell, Jerry R., Samiah Al-Zaidy, Richard Shell, W. Dave Arnold, Louise R. Rodino-Klapac, Thomas W. Prior, Linda Lowes, et al. 2017. "Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy." *New England Journal of Medicine* 377 (18): 1713–22. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1706198>.

Mercuri, Eugenio, and Francesco Muntoni. 2013. "Muscular Dystrophies." *The Lancet* 381 (9869): 845–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61897-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61897-2).

Meryon, Edward. 1852. "On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles." *Medico-Chirurgical Transactions* 35: 73-84.1.

Messina, Sonia, Vita L., M. Aguenouz, M. Sframeli, S. Romeo, C. Rodolico, and Giuseppe Vita. 2011. "Activation of NF-KB Pathway in Duchenne Muscular Dystrophy: Relation to Age." *Acta Myologica* 30 (1): 16–23.

Millay, Douglas P., Sanjeewa A. Goonasekera, Michelle A. Sargent, Marjorie Maillet, Bruce J. Aronow, and Jeffery D. Molkentin. 2009. "Calcium Influx Is Sufficient to Induce Muscular Dystrophy through a TRPC-Dependent Mechanism." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (45): 19023–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906591106>.

- Monaco, Anthony P., Rachael L. Neve, Chris Colletti-Feener, Corlee J. Bertelson, David M. Kurnit, and Louis M. Kunkel. 1986. "Isolation of Candidate cDNAs for Portions of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene." *Nature* 323 (6089): 646–50. <https://doi.org/10.1038/323646a0>.
- Monaco, Anthony P., Corlee J. Bertelson, Sabina Liechti-Gallati, Hans Moser, and Louis M. Kunkel. 1988. "An Explanation for the Phenotypic Differences between Patients Bearing Partial Deletions of the DMD Locus." *Genomics* 2 (1): 90–95. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(88\)90113-9](https://doi.org/10.1016/0888-7543(88)90113-9).
- Monici, Maria C., M'hammed Aguenouz, A. Mazzeo, C. Messina, and Giuseppe Vita. 2003. "Activation of Nuclear Factor-KappaB in Inflammatory Myopathies and Duchenne Muscular Dystrophy." *Neurology* 60 (6): 993–97. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000049913.27181.51>.
- Montier, Tristan, Pascal Delépine, Chantal Pichon, Claude Férec, David J. Porteous, and Patrick Midoux. 2004. "Non-Viral Vectors in Cystic Fibrosis Gene Therapy: Progress and Challenges." *Trends in Biotechnology* 22 (11): 586–92. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.09.009>.
- Montier, Tristan, Thierry Benvegno, Paul-Alain Jaffrès, Jean-Jacques Yaouanc, and Pierre Lehn. 2008. "Progress in Cationic Lipid-Mediated Gene Transfection: A Series of Bio-Inspired Lipids as an Example." *Current Gene Therapy* 8 (5): 296–312. <https://doi.org/10.2174/156652308786070989>.
- Mullard, Asher. 2019. "FDA Approves SMA Gene Therapy." *Nature Reviews Drug Discovery* 18 (June): 488. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00101-z>.
- Mumper, RJ. 1995. "Novel Polymeric Condensing Carriers for Gene Transfer." *Proc Natl Symp Control Rel Bioact Mater* 22: 178–79.
- Muntoni, Francesco, Silvia Torelli, and Alessandra Ferlini. 2003. "Dystrophin and Mutations: One Gene, Several Proteins, Multiple Phenotypes." *The Lancet Neurology* 2 (12): 731–40. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(03\)00585-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(03)00585-4).
- "Myopathies ou maladies neuromusculaires." 2016. AFM-Téléthon. May 19, 2016. <https://www.afm-telethon.fr/glossaire/myopathies-ou-maladies-neuromusculaires-6674>.
- Nakamura, Akinori, and Shin'ichi Takeda. 2011. "Mammalian Models of Duchenne Muscular Dystrophy: Pathological Characteristics and Therapeutic Applications." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/184393>.
- Nakamura, Katsuyuki, Wataru Fujii, Masaya Tsuboi, Jun Tanihata, Naomi Teramoto, Shiho Takeuchi, Kunihiko Naito, Keitaro Yamanouchi, and Masugi Nishihara. 2015. "Generation of Muscular Dystrophy Model Rats with a CRISPR/Cas System." *Scientific Reports* 4 (1). <https://doi.org/10.1038/srep05635>.
- Narain, Ravin. 2016. *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*. Woodhead Publishing.
- Newman, Mark J, Mannersamy Balusubramanian, and Charles W Todd. 1998. "Development of Adjuvant-Active Nonionic Block Copolymers." *Advanced Drug Delivery Reviews, Vaccine Adjuvants*, 32 (3): 199–223. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00011-8](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00011-8).

Nichols, Bailey, Shin'ichi Takeda, and Toshifumi Yokota. 2015. "Nonmechanical Roles of Dystrophin and Associated Proteins in Exercise, Neuromuscular Junctions, and Brains." *Brain Sciences* 5 (3): 275–98. <https://doi.org/10.3390/brainsci5030275>.

Nigro, Gerardo. 2008. "Gaetano Conte Prize." *Acta Myologica* 27 (3): 81.

Nigro, Vincenzo, and Giulio Piluso. 2015. "Spectrum of Muscular Dystrophies Associated with Sarcolemmal-Protein Genetic Defects." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, Neuromuscular Diseases: Pathology and Molecular Pathogenesis*, 1852 (4): 585–93. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.07.023>.

Ohlendieck, Kay. 2013. *The Pathophysiological Role of Impaired Calcium Handling in Muscular Dystrophy*. Landes Bioscience. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6173/>.

Omar, Abdillahi, Komal Marwaha, and Pradeep C. Bollu. 2019. "Physiology, Neuromuscular Junction." In *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470413/>.

Palmerston Mendes, Livia, Jiayi Pan, and Vladimir P. Torchilin. 2017. "Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy." *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 22 (9). <https://doi.org/10.3390/molecules22091401>.

Parent, André. 2005. "Duchenne De Boulogne: A Pioneer in Neurology and Medical Photography." *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 32 (3): 369–77.

Passamano, Luigia, Antonella Taglia, Alberto Palladino, Emanuela Viggiano, Paola d'Ambrosio, Marianna Scutifero, Maria Rosaria Cecio, et al. 2012. "Improvement of Survival in Duchenne Muscular Dystrophy: Retrospective Analysis of 835 Patients." *Acta Myologica* 31 (2): 121–25.

Péréon, Yann, Sandra Mercier, and Armelle Magot. 2016. "Physiopathologie de la dystrophie musculaire de Duchenne." */data/revues/0929693X/v22i12sS1/S0929693X16300045/*, January. <https://www.em-consulte.com/en/article/1026534>.

Peter, Angela K., Jamie L. Marshall, and Rachele H. Crosbie. 2008. "Sarcospan Reduces Dystrophic Pathology: Stabilization of the Utrophin–Glycoprotein Complex." *The Journal of Cell Biology* 183 (3): 419–27. <https://doi.org/10.1083/jcb.200808027>.

Petrillo, Sara, Laura Pelosi, Fiorella Piemonte, Lorena Travaglini, Laura Forcina, Michela Catteruccia, Stefania Petrini, et al. 2017. "Oxidative Stress in Duchenne Muscular Dystrophy: Focus on the NRF2 Redox Pathway." *Human Molecular Genetics* 26 (14): 2781–90. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx173>.

Peverelli, Lorenzo, Silvia Testolin, Luisa Villa, Adele D'Amico, Stefania Petrini, Chiara Favero, Francesca Magri, et al. 2015. "Histologic Muscular History in Steroid-Treated and Untreated Patients with Duchenne Dystrophy." *Neurology* 85 (21): 1886–93. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000002147>.

Pitard, Bruno, Hélène Pollard, Onnik Agbulut, Olivier Lambert, Jean-Thomas Vilquin, Yan Cherel, Jérôme Abadie, et al. 2002. "A Nonionic Amphiphile Agent Promotes Gene Delivery in Vivo to Skeletal and Cardiac Muscles." *Human Gene Therapy* 13 (14): 1767–75. <https://doi.org/10.1089/104303402760293592>.

Pomel, Catherine, Christian Leborgne, Hervé Cheradame, Daniel Scherman, Antoine Kichler, and Philippe Guégan. 2008. "Synthesis and Evaluation of Amphiphilic Poly(Tetrahydrofuran-b-Ethylene Oxide) Copolymers for DNA Delivery into Skeletal Muscle." *Pharmaceutical Research* 25 (12): 2963–71. <https://doi.org/10.1007/s11095-008-9698-9>.

Prabu, Sakthivel Lakshmana, and Kandasamy Ruckmani. 2017. "Biopolymer in Gene Delivery." *Advanced Technology for Delivering Therapeutics*, May. <https://doi.org/10.5772/65694>.

Rai, Raj, Saniya Alwani, and Ildiko Badea. 2019. "Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications." *Polymers* 11 (4). <https://doi.org/10.3390/polym11040745>.

Ramamoorth, Murali, and Aparna Narvekar. 2015. "Non Viral Vectors in Gene Therapy- An Overview." *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR* 9 (1): GE01–6. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>.

Rando, Thomas A., Marie H. Disatnik, Yip Yu, and Alexa Franco. 1998. "Muscle Cells from Mdx Mice Have an Increased Susceptibility to Oxidative Stress." *Neuromuscular Disorders: NMD* 8 (1): 14–21.

Rashid, Mohammad M., Alessandra Runci, Lucia Polletta, Ilaria Carnevale, Emanuela Morgante, Eleonora Foglio, Tania Arcangeli, Luigi Sansone, Matteo A. Russo, and Marco Tafani. 2015. "Muscle LIM Protein/CSRP3: A Mechanosensor with a Role in Autophagy." *Cell Death Discovery* 1 (August): 15014. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2015.14>.

Rasolonjatovo, Bazoly, Jean-Pierre Gomez, William Mème, Cristine Gonçalves, Cécile Huin, Véronique Bennevault-Celton, Tony Le Gall, et al. 2015. "Poly(2-Methyl-2-Oxazoline)-b-Poly(Tetrahydrofuran)-b-Poly(2-Methyl-2-Oxazoline) Amphiphilic Triblock Copolymers: Synthesis, Physicochemical Characterizations, and Hydrosolubilizing Properties." *Biomacromolecules* 16 (3): 748–56. <https://doi.org/10.1021/bm5016656>.

Remant Bahadur, K. C., and Hasan Uludağ. 2016. "2 - PEI and Its Derivatives for Gene Therapy." In *Polymers and Nanomaterials for Gene Therapy*, edited by Ravin Narain, 29–54. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100520-0.00002-3>.

Rey-Rico, Ana, and Magali Cucchiarini. 2016. "Controlled Release Strategies for RAAV-Mediated Gene Delivery." *Acta Biomaterialia* 29 (January): 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.10.015>.

———. 2018. "PEO-PPO-PEO Tri-Block Copolymers for Gene Delivery Applications in Human Regenerative Medicine-An Overview." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030775>.

- Robbins, Paul D., and Steven C. Ghivizzani. 1998. "Viral Vectors for Gene Therapy." *Pharmacology & Therapeutics* 80 (1): 35–47. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(98\)00020-5](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(98)00020-5).
- Roche, Joseph A., Diana L. Ford-Speelman, Lisa W. Ru, Allison L. Densmore, Renuka Roche, Patrick W. Reed, and Robert J. Bloch. 2011. "Physiological and Histological Changes in Skeletal Muscle Following in Vivo Gene Transfer by Electroporation." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 301 (5): C1239–50. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00431.2010>.
- Rogers, Stanfield. 1959. "Induction of Arginase in Rabbit Epithelium by the Shope Rabbit Papilloma Virus." *Nature* 183 (4678): 1815. <https://doi.org/10.1038/1831815b0>.
- Rosenberg, Amy S., Montserrat Puig, Kanneboyina Nagaraju, Eric P. Hoffman, S. Armando Villalta, V. Ashutosh Rao, Lalage M. Wakefield, and Janet Woodcock. 2015. "Immune-Mediated Pathology in Duchenne Muscular Dystrophy." *Science Translational Medicine* 7 (299): 299rv4. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa7322>.
- Rosenberg, S A, W F Anderson, M Blaese, P Hwu, J R Yannelli, J C Yang, S L Topalian, D J Schwartzentruber, J S Weber, and S E Ettinghausen. 1993. "The Development of Gene Therapy for the Treatment of Cancer." *Annals of Surgery* 218 (4): 455–64.
- Rosenberg, Steven A., Paul Aebersold, Kenneth Cornetta, Attan Kasid, Richard A. Morgan, Robert Moen, Evelyn M. Karson, et al. 1990. "Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction." *New England Journal of Medicine* 323 (9): 570–78. <https://doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>.
- Russell, Stephen, Jean Bennett, Jennifer A Wellman, Daniel C Chung, Zi-Fan Yu, Amy Tillman, Janet Wittes, et al. 2017. "Efficacy and Safety of Voretigene Neparvovec (AAV2-HRPE65v2) in Patients with RPE65-Mediated Inherited Retinal Dystrophy: A Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3 Trial." *Lancet (London, England)* 390 (10097): 849–60. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31868-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31868-8).
- Sadoulet-Puccio, Hélène M., Michael Rajala, and Louis M. Kunkel. 1997. "Dystrobrevin and Dystrophin: An Interaction through Coiled-Coil Motifs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (23): 12413–18.
- Saranya, Narayanan, Ambigapathi Moorthi, Sekaran Saravanan, Manisha Pandima Devi, and Nagarajan Selvamurugan. 2011. "Chitosan and Its Derivatives for Gene Delivery." *International Journal of Biological Macromolecules* 48 (2): 234–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.11.013>.
- Scheufele, Dietram A., Michael A. Xenos, Emily L. Howell, Kathleen M. Rose, Dominique Brossard, and Bruce W. Hardy. 2017. "U.S. Attitudes on Human Genome Editing." *Science* 357 (6351): 553–54. <https://doi.org/10.1126/science.aan3708>.
- Sciorati, Clara, Elena Rigamonti, Angelo A. Manfredi, and Patrizia Rovere-Querini. 2016. "Cell Death, Clearance and Immunity in the Skeletal Muscle." *Cell Death and Differentiation* 23 (6): 927–37. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.171>.

Selsby, Joshua T., Jason W. Ross, Dan Nonneman, and Katrin Hollinger. 2015. "Porcine Models of Muscular Dystrophy." *ILAR Journal* 56 (1): 116–26. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv015>.

Shier, David, Jackie Butler, and Ricki Lewis. 2014. *Hole's Essentials of Human Anatomy and Physiology, 12th Edition*. MCGRAW-HILL EDUCATION.

Shin, Jonghyun, Marjan M. Tajrishi, Yuji Ogura, and Ashok Kumar. 2013. "Wasting Mechanisms in Muscular Dystrophy." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 45 (10): 2266–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.05.001>

Shkryl, Vyacheslav M., Adriano S. Martins, Nina D. Ullrich, Martha C. Nowycky, Ernst Niggli, and Natalia Shirokova. 2009. "Reciprocal Amplification of ROS and Ca²⁺ Signals in Stressed Mdx Dystrophic Skeletal Muscle Fibers." *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 458 (5): 915–28. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0670-2>.

Spencer, Melissa J., Encarnacion Montecino-Rodriguez, Kenneth Dorshkind, and James G. Tidball. 2001. "Helper (CD4(+)) and Cytotoxic (CD8(+)) T Cells Promote the Pathology of Dystrophin-Deficient Muscle." *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 98 (2): 235–43. <https://doi.org/10.1006/clim.2000.4966>.

Sriadibhatla, Srikanth, Zhihui Yang, Catherine Gebhart, Valery Yu Alakhov, and Alexander Kabanov. 2006. "Transcriptional Activation of Gene Expression by Pluronic Block Copolymers in Stably and Transiently Transfected Cells." *Molecular Therapy* 13 (4): 804–13. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.07.701>.

Sun, Xiaoli, and Na Zhang. 2010. "Cationic Polymer Optimization for Efficient Gene Delivery." *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 10 (2): 108–25.

Suphamungmee, Worawit, Prapaporn Jattujan, and Krai Meemon. 2017. "Loss of Dystrobrevin Causes Muscle Degeneration and a Short Lifespan in *Caenorhabditis Elegans*." In . <https://doi.org/10.14456/vol15iss1pp%p>.

Sztretye, Mónika, Nikolett Geyer, János Vincze, Dána Al-Gaadi, Tamás Oláh, Péter Szentesi, Gréta Kis, et al. 2017. "SOCE Is Important for Maintaining Sarcoplasmic Calcium Content and Release in Skeletal Muscle Fibers." *Biophysical Journal* 113 (11): 2496–2507. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.09.023>.

Takeda, Shin'Ichi, and Takashi Okada. 2011. "Progress and Challenges in AAV-Mediated Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy." *Viral Gene Therapy*, July. <https://doi.org/10.5772/18624>.

Tatum, Edward L. 1966. "Molecular Biology, Nucleic Acids, and the Future of Medicine." *Perspectives in Biology and Medicine* 10 (1): 19–32. <https://doi.org/10.1353/pbm.1966.0027>.

Temin, Howard M., and S. Mizutani. 1970. "RNA-Dependent DNA Polymerase in Virions of Rous Sarcoma Virus." *Nature* 226 (5252): 1211–13. <https://doi.org/10.1038/2261211a0>.

Temin, Howard M. 1961. "Mixed Infection with Two Types of Rous Sarcoma Virus." *Virology* 13 (2): 158–63. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(61\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0042-6822(61)90049-6).

- Tennyson, Christine N., Henry J. Klamut, and Ronald G. Worton. 1995. "The Human Dystrophin Gene Requires 16 Hours to Be Transcribed and Is Cotranscriptionally Spliced." *Nature Genetics* 9 (2): 184–90. <https://doi.org/10.1038/ng0295-184>.
- Terheggen, H. G., A. Lowenthal, F. Lavinha, J. P. Colombo, and S. Rogers. 1975. "Unsuccessful Trial of Gene Replacement in Arginase Deficiency." *European Journal of Pediatrics* 119 (1): 1–3. <https://doi.org/10.1007/BF00464689>.
- Theadom, Alice, Miriam Rodrigues, Richard Roxburgh, Shiavnthi Balalla, Chris Higgins, Rohit Bhattacharjee, Kelly Jones, Rita Krishnamurthi, and Valery Feigin. 2014. "Prevalence of Muscular Dystrophies: A Systematic Literature Review." *Neuroepidemiology* 43 (3–4): 259–68. <https://doi.org/10.1159/000369343>.
- Tidball, James G, and Melissa J Spencer. 2000. "Calpains and Muscular Dystrophies." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 32 (1): 1–5. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00095-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00095-3).
- Tidball, James G., and Michelle Wehling-Henricks. 2007. "The Role of Free Radicals in the Pathophysiology of Muscular Dystrophy." *Journal of Applied Physiology* 102 (4): 1677–86. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.01145.2006>.
- Tidball, James G., Steven S. Welc, and Michelle Wehling-Henricks. 2018. "Immunobiology of Inherited Muscular Dystrophies." In *Comprehensive Physiology*, 1313–56. American Cancer Society. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170052>.
- Tskhovrebova, Larissa, and John Trinick. 2010. "Roles of Titin in the Structure and Elasticity of the Sarcomere." Research article. BioMed Research International. 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/612482>.
- Turner, Paul R., Radon Schultz, Bishu Ganguly, and Richard A. Steinhardt. 1993. "Proteolysis Results in Altered Leak Channel Kinetics and Elevated Free Calcium in Mdx Muscle." *The Journal of Membrane Biology* 133 (3): 243–51.
- Tyler, Kenneth L. 2003. "Origins and Early Descriptions of 'Duchenne Muscular Dystrophy.'" *Muscle & Nerve* 28 (4): 402–22. <https://doi.org/10.1002/mus.10435>.
- Vandebrouck, Clarisse, Gérard Dupont, Christian Cognard, and Guy Raymond. 2001. "Cationic Channels in Normal and Dystrophic Human Myotubes." *Neuromuscular Disorders* 11 (1): 72–79. [https://doi.org/10.1016/S0960-8966\(00\)00153-X](https://doi.org/10.1016/S0960-8966(00)00153-X).
- Vandebrouck, Clarisse, Dominique Martin, Monique Colson-Van Schoor, Huguette Debaix, and Philippe Gailly. 2002. "Involvement of TRPC in the Abnormal Calcium Influx Observed in Dystrophic (Mdx) Mouse Skeletal Muscle Fibers." *The Journal of Cell Biology* 158 (6): 1089–96. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203091>.
- Vaughan, Erin E., and David A. Dean. 2006. "Intracellular Trafficking of Plasmids during Transfection Is Mediated by Microtubules." *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 13 (2): 422–28. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2005.10.004>.

Vieitez, Irene, P. Gallano, Lidia González-Quereda, Salud Borrego, I. Marcos, J. M. Millán, T. Jairo, et al. 2017. “Mutational Spectrum of Duchenne Muscular Dystrophy in Spain: Study of 284 Cases.” *Neurología (English Edition)* 32 (6): 377–85. <https://doi.org/10.1016/j.nrleng.2015.12.004>.

Vila, Maria C., Sree Rayavarapu, Marshall W. Hogarth, Jack H. Van der Meulen, Adam Horn, Aurelia Defour, Shin’ichi Takeda, et al. 2017. “Mitochondria Mediate Cell Membrane Repair and Contribute to Duchenne Muscular Dystrophy.” *Cell Death and Differentiation* 24 (2): 330–42. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.127>.

Villalta, S. Armando, Hal X. Nguyen, Bo Deng, Tomomi Gotoh, and James G. Tidball. 2009. “Shifts in Macrophage Phenotypes and Macrophage Competition for Arginine Metabolism Affect the Severity of Muscle Pathology in Muscular Dystrophy.” *Human Molecular Genetics* 18 (3): 482–96. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddn376>.

Villalta, S. Armando, Amy S. Rosenberg, and Jeffrey A. Bluestone. 2015. “The Immune System in Duchenne Muscular Dystrophy: Friend or Foe.” *Rare Diseases* 3 (1): e1010966. <https://doi.org/10.1080/21675511.2015.1010966>.

Walmsley, Gemma L., Virginia Arechavala-Gomez, Marta Fernandez-Fuente, Margaret M. Burke, Nicole Nagel, Angela Holder, Rachael Stanley, et al. 2010. “A Duchenne Muscular Dystrophy Gene Hot Spot Mutation in Dystrophin-Deficient Cavalier King Charles Spaniels Is Amenable to Exon 51 Skipping.” *PLoS ONE* 5 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008647>.

Wang, Dan, Phillip W. L. Tai, and Guangping Gao. 2019. “Adeno-Associated Virus Vector as a Platform for Gene Therapy Delivery.” *Nature Reviews Drug Discovery* 18 (5): 358–78. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>.

Wang, Liang, Min Xu, Huan Li, Ruojie He, Jinfu Lin, Cheng Zhang, and Yuling Zhu. 2019. “Genotypes and Phenotypes of DMD Small Mutations in Chinese Patients With Dystrophinopathies.” *Frontiers in Genetics* 10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00114>.

Wasungu, Luc, and Dick Hoekstra. 2006. “Cationic Lipids, Lipoplexes and Intracellular Delivery of Genes.” *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 116 (2): 255–64. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.06.024>.

Watson, James D., and Francis H. Crick. 1953. “Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid.” *Nature* 171 (4356): 737–38. <https://doi.org/10.1038/171737a0>.

Waugh, Trent A., Eric Horstick, Junguk Hur, Samuel W. Jackson, Ann E. Davidson, Xingli Li, and James J. Dowling. 2014. “Fluoxetine Prevents Dystrophic Changes in a Zebrafish Model of Duchenne Muscular Dystrophy.” *Human Molecular Genetics* 23 (17): 4651–62. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu185>.

Wells, Dominic J. 2018. “Tracking Progress: An Update on Animal Models for Duchenne Muscular Dystrophy.” *Disease Models & Mechanisms* 11 (6). <https://doi.org/10.1242/dmm.035774>.

- White, S.j., A. Aartsma-Rus, K.m. Flanigan, R.b. Weiss, A.l.j. Kneppers, T. Lalic, A.a.m. Janson, H.b. Ginjaar, M.h. Breuning, and J.t. den Dunnen. 2006. "Duplications in the DMD Gene." *Human Mutation* 27 (9): 938–45. <https://doi.org/10.1002/humu.20367>.
- Whitehead, Nicholas P., Ella W. Yeung, Stanley C. Froehner, and David G. Allen. 2010. "Skeletal Muscle NADPH Oxidase Is Increased and Triggers Stretch-Induced Damage in the Mdx Mouse." *PLoS ONE* 5 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015354>.
- Widrick, Jeffrey J., Matthew S. Alexander, Benjamin Sanchez, Devin E. Gibbs, Genri Kawahara, Alan H. Beggs, and Louis M. Kunkel. 2016. "Muscle Dysfunction in a Zebrafish Model of Duchenne Muscular Dystrophy." *Physiological Genomics* 48 (11): 850–60. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00088.2016>.
- Wirth, Thomas, Nigel Parker, and Seppo Ylä-Herttuala. 2013. "History of Gene Therapy." *Gene* 525 (2): 162–69. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.03.137>.
- Wolf, Don P., Paul A. Mitalipov, and Shoukhrat M. Mitalipov. 2019. "Principles of and Strategies for Germline Gene Therapy." *Nature Medicine* 25 (6): 890–97. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0473-8>.
- Wolff, Jon A., Robert W. Malone, Phillip Williams, Wang Chong, Gyulia Acsadi, Agnes Jani, and Philip L. Felgner. 1990. "Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo." *Science* 247 (4949): 1465–68. <https://doi.org/10.1126/science.1690918>.
- Wolff, Jon A., and Vladimir Budker. 2005. "The Mechanism of Naked DNA Uptake and Expression." *Advances in Genetics* 54: 3–20. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(05\)54001-X](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(05)54001-X).
- Wong, Joanna K. L., Rashin Mohseni, Amir Ali Hamidieh, Robert E. MacLaren, Nagy Habib, and Alexander M. Seifalian. 2017. "Will Nanotechnology Bring New Hope for Gene Delivery?" *Trends in Biotechnology* 35 (5): 434–51. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.009>.
- Wooddell, Christine I., Julia O. Hegge, Guofeng Zhang, Magdolna G. Sebestyén, Mark Noble, Jacob B. Griffin, Loretta V. Pfannes, et al. 2011. "Dose Response in Rodents and Nonhuman Primates After Hydrodynamic Limb Vein Delivery of Naked Plasmid DNA." *Human Gene Therapy* 22 (7): 889–903. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.160>.
- Wu, Pan, Haojiao Chen, Ronghua Jin, Tingting Weng, Jon Kee Ho, Chuangang You, Liping Zhang, Xingang Wang, and Chunmao Han. 2018. "Non-Viral Gene Delivery Systems for Tissue Repair and Regeneration." *Journal of Translational Medicine* 16 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1402-1>.
- Xu, Yuhong, and Francis C. Szoka. 1996. "Mechanism of DNA Release from Cationic Liposome/DNA Complexes Used in Cell Transfection." *Biochemistry* 35 (18): 5616–23. <https://doi.org/10.1021/bi9602019>.
- Yuasa, K., A. Ishii, Y. Miyagoe, and S. Takeda. 1997. "[Introduction of rod-deleted dystrophin cDNA, delta DysM3, into mdx skeletal muscle using adenovirus vector]." *Nihon rinsho. Japanese journal of clinical medicine* 55 (12): 3148–53.

Zhang, Guofeng, Christine I. Wooddell, Julia O. Hegge, Jacob B. Griffin, Thierry Huss, Serge Braun, and Jon A. Wolff. 2009. "Functional Efficacy of Dystrophin Expression from Plasmids Delivered to Mdx Mice by Hydrodynamic Limb Vein Injection." *Human Gene Therapy* 21 (2): 221–37. <https://doi.org/10.1089/hum.2009.133>.

Zhang, Shubiao, Yingmei Xu, Bing Wang, Weihong Qiao, Dongliang Liu, and Zongshi Li. 2004. "Cationic Compounds Used in Lipoplexes and Polyplexes for Gene Delivery." *Journal of Controlled Release* 100 (2): 165–80. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.08.019>.

Zhao, Junling, Kasun Kodippili, Yongping Yue, Chady H. Hakim, Lakmini Wasala, Xiufang Pan, Keqing Zhang, Nora N. Yang, Dongsheng Duan, and Yi Lai. 2016. "Dystrophin Contains Multiple Independent Membrane-Binding Domains." *Human Molecular Genetics* 25 (17): 3647–53. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw210>.

Zhi, Defu, Yuchao Bai, Jian Yang, Shaohui Cui, Yinan Zhao, Huiying Chen, and Shubiao Zhang. 2018. "A Review on Cationic Lipids with Different Linkers for Gene Delivery." *Advances in Colloid and Interface Science* 253 (March): 117–40. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.12.006>.

Zhi, Defu, Shubiao Zhang, Shaohui Cui, Yinan Zhao, Yinhuan Wang, and Defeng Zhao. 2013. "The Headgroup Evolution of Cationic Lipids for Gene Delivery." *Bioconjugate Chemistry* 24 (4): 487–519. <https://doi.org/10.1021/bc300381s>.

Zinder, Norton D., and Joshua Lederberg. 1952. "genetic exchange in salmonella." *Journal of Bacteriology* 64 (5): 679–99.

Zuhorn, Inge S., Udo Bakowsky, Evgeny Polushkin, Willy H. Visser, Marc C. A. Stuart, Jan B. F. N. Engberts, and Dick Hoekstra. 2005. "Nonbilayer Phase of Lipoplex–Membrane Mixture Determines Endosomal Escape of Genetic Cargo and Transfection Efficiency." *Molecular Therapy* 11 (5): 801–10. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.12.018>.

Annexes

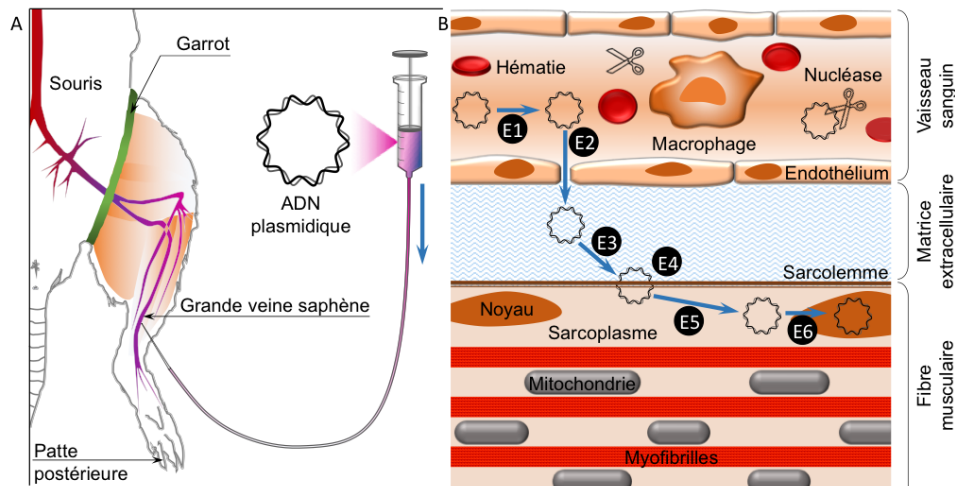
Table 1 : Les dystrophies musculaires, diverses origines, divers modes de transmission, d'après (Mercuri and Muntoni 2013).

Dystrophies	Gènes impliqués (symbole)	Protéines	Transmission	Implication cellulaire de la protéine
Dystrophie musculaire de Duchenne	DMD	Dystrophine	Récessive liée à l'X	Protéines associées au sarcolemme
Dystrophie musculaire de Becker	DMD	Dystrophine	Récessive liée à l'X	Protéines associées au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1A	MTN	Myotiline	Autosomique dominant	Protéine associée aux sarcomères
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1B	LMNA	Laminine A/C	Autosomique dominant	Enveloppe nucléaire
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1C	CAV3	Cavéoline 3	Autosomique dominant	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1D	DNAJB6	Protéines Co-chaperone DNAJB6	Autosomique dominant	Protéine associée aux sarcomères
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1E	DES	Desmine	Autosomique dominant	Protéine des filaments intermédiaires
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1F	TNPO3	Transportine 3	Autosomique dominant	Enveloppe nucléaire
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1G	HNRPDL	HNRPDL	Autosomique dominant	Ribonucleoprotéine
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1H	Non-identifiée	Non-identifiée	Autosomique dominant	Non-identifiée
Dystrophie musculaire des ceintures Type 1I	CAPN	Calpaine 3	Autosomique dominant	Protéine associée aux myofibrilles
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2A	CAPN	Calpaine 3	Autosomique récessif	Protéine associée aux myofibrilles
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2B	DYSF	Dysferline	Autosomique récessif	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2C	SGCG	γ -sarcoglycan	Autosomique récessif	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2D	SGCA	α -sarcoglycan	Autosomique récessif	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2E	SGCB	β -sarcoglycan	Autosomique récessif	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2F	SGCD	δ -sarcoglycan	Autosomique récessif	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2G	TCAP	Téléthonine	Autosomique récessif	Protéine associée aux sarcomères
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2H	TRIM32	Tripartite motif-containing protein 32	Autosomique récessif	Protéine associée aux sarcomères
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2I	FKRP	Fukutine related protein	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase

Dystrophies	Gènes impliqués (symbole)	Protéines	Transmission	Implication cellulaire de la protéine
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2J	TTN	Titine	Autosomique récessif	Protéine sarcomérique
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2K	POMT1	Protein-1-O-mannosyl-transferase 1	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransferase
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2L	ANO5	Anoctamine 5	Autosomique récessif	Transmembrane protein, possible sarcoplasmic reticulum
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2M	FKTN	Fukutine	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2N	POMT2	Proteine-O-mannosyl-transferase 2	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransferase
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2O	POMGNT1	Protein-O-linked mannose β 1,2-N-aminytransferase 1	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransferase
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2P	DAG1	Glycoprotéine 1 associée à la dystrophine	Autosomique récessif	Protéine associée aux sarcomères
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2Q	PLEC1	Plectine	Autosomique récessif	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2R	DES	Desmine	Autosomique récessif	Protéine associée au sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2S	TRAPPC11	TRAPPC11	Autosomique récessif	Protéine impliquée dans le trafic membranaire
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2T	GMPPB	GDP-mannose pyrophosphorylase B	Autosomique récessif	Enzyme Pyrophosphorylase
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2U	ISPD	Isoprénoïde synthétase	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2V	GAA	Alpha-glucosidase acide	Autosomique récessif	Glucosidase
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2W	LIMS2	LIMS2	Autosomique récessif	Sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2X	BVES	BVES (Blood Vessel Epicardial Substance)	Autosomique récessif	Sarcolemme
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2Y	TOR1AIP1	Torsin-1A-interacting protein 1	Autosomique récessif	Nucléaire
Dystrophie musculaire des ceintures Type 2Z	POGLUT1	POGLUT1	Autosomique récessif	Enzyme Glucosyltransferase
Dystrophies facio scapulohumérale type1	/	DUX4	Autosomique dominant	Nucléaire
Dystrophies facio scapulohumérale type2	/	SMCHD1 (ou DNT3B)	Autosomique dominant	Nucléaire
Dystrophie d'Emery-Dreifuss liée à l'X type 1	EMD	Emerine	Récessive liée à l'X	Enveloppe nucléaire
Dystrophie d'Emery-Dreifuss liée à l'X type 2	FHL1	« four and half LIM domain1 »	Récessive liée à l'X	Sarcomère et Sarcolemme
Dystrophie d'Emery-Dreifuss autosomique dominant	LMNA	Lamine A/C	Autosomique dominant	Enveloppe nucléaire

Dystrophies	Gènes impliqués (symbole)	Protéines	Transmission	Implication cellulaire de la protéine
Dystrophie d'Emery-Dreifuss autosomique récessif	LMNA	Lamine A/C	Autosomique récessif	Enveloppe nucléaire
Dystrophie d'Emery-Dreifuss avec déficit en nesprine 1	SYNE1	Nesprine-1	Autosomique dominant	Enveloppe nucléaire
Dystrophie d'Emery-Dreifuss avec déficit en nesprine 2	SYNE2	Nesprine-2	Autosomique dominant	Enveloppe nucléaire
Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine (MDC1A)	LAMA2	Mérosine	Autosomique récessif	Protéine de la matrice extracellulaire
Dystrophie musculaire congénitale	Non-identifiée	Non-identifiée	Autosomique récessif	Non-identifiée
Dystrophie musculaire congénitale avec glycosylation anormale des dystroglycane (MDC1C)	FKRP	Fukutin related protein	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase
Dystrophie musculaire congénitale avec glycosylation anormale des dystroglycane (MDC1D)	LARGE	Protéine Glycosil transferase like	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase
Dystrophie musculaire congénitale de Fukuyama	FCMD	Fukutine	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase
Syndrome de Walker-Warburg avec déficit en protéine-O-mannosyle transferase 1	POMT1	Proteine-O-mannosyl-transferase 1	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransferase
Syndrome de Walker-Warburg avec déficit en protéine-O-mannosyle transferase 2	POMT2	Proteine-O-mannosyl-transferase 2	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransferase
Syndrome de Walker-Warburg avec déficit en protéine-O- liée au mannose β 1,2-N-aminytransferase 1	POMGNT1	Protein-O-linked mannose β 1,2-N-aminytransferase 1	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransferase
Syndrome de Walker-Warburg avec déficit en fukutin related protein	FKRP	Fukutin related protein	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase
Syndrome muscle œil cerveau avec déficit en protéine-O- liée au mannose β 1,2-N-aminytransferase 1 defect	POMGNT1	Protein-O-linked mannose β 1,2-N-aminytransferase 1	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransferase
Syndrome muscle œil cerveau avec déficit en fukutin related protein	FKRP	Fukutin related protein	Autosomique récessif	Enzyme glycosyltransferase

Dystrophies	Gènes impliqués (symbole)	Protéines	Transmission	Implication cellulaire de la protéine
Syndrome muscle œil cerveau avec déficit en protéine-O-mannosyle transférase 2	POMT2	Protéine-O-mannosyl- transférase 2	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransférase
Dystrophie musculaire congénitale avec défaut de glycosylation	DPM2 ou DPM3	Dolichyl-phosphate mannosyltransférase polypeptide 2 ou 3 selon cas	Autosomique récessif	Enzyme Glycosyltransférase
Dystrophie musculaire congénitale avec anomalie de structure mitochondriale	CHKB	Choline kinase	Mitochondrial	Sarcolemme et enveloppe mitochondriale
Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en sélénoprotéine N	SEPN1	Sélénoprotéine N1	Autosomique récessif	Reticulum endoplasmique
Dystrophie musculaire d'Ullrich avec déficit en collagène VI	COL6A1 ou A2 ou A3	Collagène de type VI, sous unité $\alpha 1$, $\alpha 2$ ou $\alpha 3$	Autosomique récessif	Protéine de la matrice extracellulaire
Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en intégrine $\alpha 7$ ou $\alpha 9$	ITGA7 ou ITGA9	Intégrine $\alpha 7$ ou $\alpha 9$	Autosomique récessif	Protéine sarcolemmique
Dystrophie musculaire avec lipodystrophie généralisée	PTRF	« Polymerase 1 and transcript release factor » (cavine-1)	Autosomique récessif	Tubules T et sarcolemme
Dystrophie musculaire oculopharyngée	PABPN1	Protéine nucléaire de liaison aux résidus polyalanines	Autosomique dominant ou récessif	Noyau et cytoplasme



C	Pistes d'optimisations	Références	Principale(s) étape(s) ciblée(s) (Panel B)	Evaluations effectuées	Résultats	Validation
	Un lipide cationique serait bénéfique pour la transfection par injection HLV	(Lindberg et al. 2015; Picquet et al. 2005)	E1 et E4	Injections HLV de lipoplexes KLN47:pGM144 (n=6)	Inhibition de la transfection comparativement à de l'ADNp seul	Non
	Un polymère cationique serait bénéfique pour la transfection par injection HLV	(Boussif et al. 1995)	E1 et E4	Injections HLV de polyplexes bPEI:pGM144 (n=16)	Inhibition de la transfection comparativement à de l'ADNp seul	Non
	Du PEG serait bénéfique pour la transfection par injection HLV et les effets seraient dépendant de la longueur de la chaîne du polymère	(Tomasetti et al. 2016; Ishida et al. 2006)	E3 et E5	Injections HLV de PEG2000 0,1%:pGM144 (n=3) et PEG5000 0,1%:pGM144 (n=4)	Efficacités de transfection similaires à celles obtenues avec de l'ADNp seul	?
	L'effet du PEG, sur l'efficacité de transfection par injection HLV, serait dépendant de la dose à laquelle il est injecté	(Tomasetti et al. 2016; Ishida et al. 2006)	E3 et E5	Injections HLV de PEG5000 0,0025%:pGM144 (n=4) et PEG5000 0,05%:pGM144 (n=4)	Efficacités de transfection similaires à celles obtenues avec de l'ADNp seul	?
	Un composé original à base de poly(2-oxazolyne) (Jun-132-B1) augmenterait l'efficacité de la transfection par injection HLV	(Bauer et al. 2012; Brissault et al. 2007; Knop et al. 2010)	E3 et E5	Injections HLV de Jun-132-B1 0,1%:pGM144 (n=2)	Efficacités de transfection similaires à celles obtenues avec de l'ADNp seul	?
	Des CTAN de type poloxamère (188 et 407) pourraient apporter un bénéfice pour la transfection du muscle par injection HLV	(Bello-Roufai, Lambert, and Pitard 2007; Chèvre et al. 2011; Alimi-Guez et al. 2009)	E4	Injections HLV de poloxamère 188 3%:pTG11033 (n=6) et poloxamère 407 0,05%:pTG11033 (n=6)	Bénéfices en faveur des poloxamères (Le Guen en préparation)	Oui
	Le CTAN original BR059 apporterait un bénéfice en transfection par injection HLV	(Brissault et al. 2007; Pomel et al. 2008)	E4	Injections HLV de BR059 0,1%:pTG11033 (n=4)	Bénéfices en faveur du BR059	Oui
	Le CTAN original BR059 apporterait un bénéfice en transfection par injection HLV chez la souris mdx	(Brissault et al. 2007; Pomel et al. 2008)	E4	Injections HLV de BR059 0,1%:pTG14860 (n=10)	Bénéfices en faveur du BR059	Oui
	Des ré-administrations HLV de BR059 permettrait d'obtenir des bénéfices cumulatifs chez la souris mdx	(Brissault et al. 2007; Pomel et al. 2008; Zhang et al. 2009)	E4	Trois injections HLV de BR059 0,1%:pTG14860 à 10 jours d'intervalle (n=10)	Bénéfices en faveur du BR059	Oui
	L'injection d'un ADNp comportant des DTS de type 3NF pourrait augmenter l'efficacité du transfert de gènes par HLV	(Gonçalves et al. 2009; Mahindhoratp et al. 2014)	E5 et E6	Injection HLV de 0,5 µg de p(3NF ₁ -Luc-3NF ₂)m (n=4) et p(Scr ₁ -Luc-Scr ₂)m (n=4)	Tendances en faveur de p(3NF ₁ -Luc-3NF ₂)m (Le Guen et al. en préparation)	Oui
	La dose de plasmide délivrée influencerait sur les bénéfices conférés par les DTS de type 3NF par HLV		E5 et E6	Injection HLV de 5 µg de p(3NF ₁ -Luc-3NF ₂)m (n=5) et p(Scr ₁ -Luc-Scr ₂)m (n=5)	Pas d'influence de la dose de plasmide sur les bénéfices des DTS (Le Guen et al. en préparation)	Non
	Le bénéfice des DTS, par injection HLV, seraient plus important pour un plasmide de grande taille		E5 et E6	Injection HLV de 0,5 µg de p(3NF ₁ -Luc-3NF ₂)c (n=5) et p(Scr ₁ -Luc-Scr ₂)c (n=5)	Les bénéfices des DTS semblent plus important avec p(3NF ₁ -Luc-3NF ₂)c qu'avec p(3NF ₁ -Luc-3NF ₂)m (Le Guen et al. en préparation)	Oui
	L'administration HLV de NaCl 0,9% pourrait comme pour l'injection hydrodynamique à destination du foie réactiver l'expression d'un gène rapporteur	(Ochiai et al. 2007)	Post-E6	Injection HLV de NaCl 0,9% un mois après injection HLV de pTG11033 (n=3)	Aucun effet constaté	Non

Figure 1 : Les différentes étapes du transfert de gènes par injection HLV et les différentes

pistes d'optimisation testées dans cette thèse (liste non-exhaustive). (A) La solution contenant l'acide nucléique (AN) est délivrée au niveau de la grande veine saphène du membre à traiter. (B) l'AN pénètre ensuite au sein du système veineux (Étape 1, E1). La pression hydrodynamique générée permet alors une extravasation de la solution injectée au travers des vaisseaux (E2), l'AN se retrouve alors au niveau des tissus sous-jacents. L'AN doit alors traverser la matrice extracellulaire (MEC) (E3) avant de franchir le sarcolemme (E4). Il s'en suit une étape de trafic au travers du sarcoplasme (E5) avant translocation dans le noyau (E6), où l'AN peut finalement être exprimé. (C) Liste non-exhaustive des différentes pistes d'optimisations explorées au cours de ce travail de thèse. Les références indiquées dans la colonne dédiée, correspondent aux différentes publications sous-tendant l'hypothèse explorée. Pour chaque traitement présenté dans la colonne « évaluations effectuées », le nombre d'injection réalisée est indiqué par « n= ». ADNp, ADN plasmidique ; CTAN, Copolymère Tribloc Amphiphile Neutre ; DTS, DNA nuclear Targeting Sequence ; PEG, Polyéthylène glycol ; HLV, Hydrodynamic Limb Vein ; ?, les résultats ne permettent pas de clairement établir des conclusions définitives.

Diplômes en expérimentation animale



Figure 2 : Diplôme en expérimentation animale, niveau concepteur et réalisateur de procédures.

Attestation de Formation à l'Expérimentation Animale

* Vu le décret et les arrêtés du 01 Février 2013 (JO du 07/02/2013), relatif à la réglementation

* Vu le suivi de la Formation spécifique destinée aux « personnes concevant ou appliquant des procédures expérimentales chirurgicales » et la réussite aux contrôles de connaissances de la formation dispensée en **Avril 2018** à Oniris.

L'ATTESTATION DE SUIVI ET DE REUSSITE A LA FORMATION

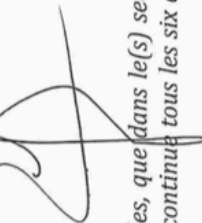
INITIATION A LA CHIRURGIE EXPERIMENTALE

est conférée à **M. Yann LE GUEN**

pour en jouir avec les droits et prérogatives qui y sont attachés.

Fait à Nantes, le 02/07/2018
La Directrice Générale
Mme Dominique BUZONI-GATEL

Responsables pédagogiques de la formation approuvée par le Ministère chargé de l'Agriculture n° R-44ENVN-Chir1-11 (validité jusqu'au 09/02/2021)
Dr M. Yassine MALLEM
Pr Jean-Claude DESFONTIS



La personne compétente ne peut exercer les missions qui lui sont confiées, que dans le(s) secteur(s) précisé(s) sur l'attestation de réussite à la formation. Elle doit, en outre, réaliser 3 jours de formation continue tous les six ans afin de maintenir ses compétences (Article 5 de l'arrêté du 01/02/2013).

Figure 3 : Diplôme en expérimentation animale, initiation à la chirurgie expérimentale.

Travaux et réalisations effectués au cours de cette thèse

1) Publications et communications

a) Publication parue : 1

- « Bis-Thioether-Containing Lipid Chains in Cationic Amphiphiles: Physicochemical Properties and Applications in Gene Delivery ». Amal Bouraoui, Rosy Ghanem, Mathieu Berchel, Véronique Vié, Yann Le Guen, Gilles Paboef, Laure Deschamps, Tony Le Gall, Tristan Montier et Paul-Alain Jaffrès.

Journal : ChemPhysChem, le 8 août 2019.

b) Articles en préparation : 5

- « Dystrophie musculaire de Duchenne : état actuel et perspectives thérapeutiques ». Yann T Le Guen, Tony Le Gall, Véronique Laurent, Frédérique d'Arbonne et Tristan Montier.

Journal visé : Bulletin de l'Académie nationale de médecine.

- « Gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations ». Yann T Le Guen, Tony Le Gall, Patrick Midoux, Philippe Guégan, Serge Braun and Tristan Montier.

Soumis à : The Journal Of Gene Medicine.

- « Non-viral gene transfer to skeletal muscles combining Hydrodynamic Limb Vein injection and poloxamers ». Yann T Le Guen et al.

Journal visé: PLOS One

- « DNA nuclear targeting sequences for enhanced non-viral gene transfer – An in vitro and in vivo study ». Yann T Le Guen et al.

Journal visé : Molecular Therapy Nucleic Acids.

- « Improving radiotherapy outcomes in LFS syndromes by particle therapy ». Luc Ollivier, Yannick Saintigny, Arnaud Beddok, Laurent Castera, Sophie Krieger, Dominique Vaur, Jacques Balosso, Gilles Girault, Yann T Le Guen, Ulrike Schick, Thierry Frebourg and Juliette Thariat.

Journal visé : Non déterminé

c) Communications orales : 3

- « L'injection hydrodynamique d'un copolymère tribloc amphiphile neutre permet de promouvoir la délivrance d'un plasmide codant la mini-dystrophine aux muscles squelettiques de souris *mdx* ». Yann Le Guen, Tony Le Gall, Thomas Haudebourg, Thibault Colombani, Yann Sibiril, Pierre Lehn, Chantal Pichon, Patrick Midoux, Philippe Guégan, Bruno Pitard et Tristan Montier.

Journée Jeunes Chercheurs en Santé, 25 avril 2018, Brest (France).

- « Amphiphilic Triblock Copolymer promotes delivery of a mini-dystrophin plasmid DNA in skeletal muscles of *mdx* rodents following Hydrodynamic Limb Vein injection ».

Yann Le Guen, Tony Le Gall, Thomas Haudebourg, Thibault Colombani, Yann Sibiril, Pierre Lehn, Chantal Pichon, Patrick Midoux, Philippe Guégan, Bruno Pitard et Tristan Montier.

21st annual meeting of the American Society of Gene and Cell Therapy, 17 mai 2018, Chicago (USA).

- « Un copolymère original pour la transfection du muscle squelettique de souris *mdx* par injection hydrodynamique ».

Yann Le Guen, Tony Le Gall, Thomas Haudebourg, Thibault Colombani, Yann Sibiril, Pierre Lehn, Chantal Pichon, Patrick Midoux, Philippe Guégan, Bruno Pitard et Tristan Montier.

16ème Journées de la Société Française de Myologie, 21 novembre 2018, Brest (France).

d) Communications sous forme de posters : 2

- « L'injection hydrodynamique d'un copolymère tribloc amphiphile neutre permet de promouvoir la délivrance d'un plasmide codant la mini-dystrophine aux muscles squelettiques de souris *mdx* ».

Yann Le Guen, Tony Le Gall, Thomas Haudebourg, Thibault Colombani, Yann Sibiril, Pierre Lehn, Chantal Pichon, Patrick Midoux, Philippe Guégan, Bruno Pitard et Tristan Montier.
Poster, 18eme Journée Jeunes Chercheurs en santé, 25 avril 2018, Brest (France).

- « An original triblock copolymer promotes the delivery of plasmid in skeletal muscles of mdx rodents following hydrodynamic limb vein injection ».

Yann Le Guen, Tony Le Gall, Thomas Haudebourg, Thibault Colombani, Yann Sibiril, Pierre Lehn, Chantal Pichon, Patrick Midoux, Philippe Guégan, Bruno Pitard et Tristan Montier.
Poster, Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale Biologie et Santé de l'Université Bretagne Loire, 13 décembre 2018, Rennes (France).

2) Membre de jury : 1

- Participation au jury de la session poster intitulée « Synthetic/Molecular Conjugates and Physical Methods for Delivery of Gene Therapeutics » du 21^{ème} congrès annuel de l'American Society of Gene and Cell Therapy 2018.

3) Enseignements : 2

- Enseignement sous forme de cours magistral dispensé dans le cadre du parcours « Génétique, Génomique et Biotechnologies » de la 2^{ème} année du master « Biologie-santé », UE : Thérapie cellulaire et génétique, 2 h, 14 novembre 2018.

- Enseignement sous forme de travail dirigé dispensé dans le cadre du du parcours « Génétique, Génomique et Biotechnologies » de la 2^{ème} année du master « Biologie-santé », UE : Thérapie cellulaire et génétique, 4 h, 16 novembre 2018.

4) Activités de vulgarisation scientifique : 2

- Nuit des chercheurs : Organisation et participation au stand de l'UMR INSERM 1078, éditions 2016, 2017, 2018 et 2019.

- Fête de la Science : Organisation et participation au stand de l'UMR INSERM 1078, éditions 2016, 2017 et 2018.

5) Participation à des projets internationaux :1

- PHC PROCOPE (France/Allemagne), 3 séjours effectués (14 jours au total) à l'Université de Siegen (Allemagne).

6) Formations suivies : 6

- Expérimentation animale, niveau I (conception et réalisation des procédures expérimentales) à l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort, 12 au 23 septembre 2016.

- Formation à la chirurgie expérimentale (rongeur et lagomorphe) à l'École Nationale Vétérinaire de Nantes, 9 au 13 avril 2018.

- Les exigences en matière d'éthique pour construire et réaliser une recherche, 10 février 2017.

- Ethique et Intégrité de la recherche Scientifique, 3 juillet 2017.

- Formation au logiciel APAFIS, 3 mars 2017.

- Formation hygiène et sécurité, 9 mars 2017.

7) Prix :1

- « Meritorious Abstract Travel Award » obtenu lors du 21^{ème} congrès annuel de l'American Society of Gene and Cell Therapy 2018.

8) Comités de suivi individuel : 2

- Comité de suivi individuel de première année de thèse avec pour membres les docteurs Thibaut Larcher (INRA UMR0703, Nantes) et Pascal Loyer (INSERM UMR-S 1241, Rennes), 15 juin 2017.

- Comité de suivi individuel de deuxième année de thèse avec pour membres les docteurs Thibaut Larcher (INRA UMR0703, Nantes) et Pascal Loyer (INSERM UMR-S 1241, Rennes), 27 juin 2018.

Titre : Transfert de gènes non-viral à destination des muscles squelettiques par injection hydrodynamique *via* la veine saphène : pistes d'optimisations et mise en application chez la souris

Mots clés : Transfert de gènes ; Vecteurs synthétiques ; Injection hydrodynamique ; Muscles squelettiques ; Dystrophie musculaire de Duchenne

Résumé : L'injection hydrodynamique par la veine (HLV) est une méthode physique d'administration locorégionale utile en transfert de gènes. Elle permet en effet de cibler l'ensemble de la musculature d'un membre isolé par un garrot *via* la délivrance d'un volume important contenant des constructions d'acides nucléiques d'intérêt complexés ou non à des vecteurs synthétiques. Cette approche a pour avantages de conserver son efficacité du petit au grand animal tout en étant cliniquement applicable. Elle se révèle donc attractive pour le traitement par thérapie génique de myopathies comme celle de Duchenne. Lorsqu'utilisée dans sa configuration originelle, l'injection HLV permet de transférer de l'ADN nu avec une certaine efficacité. Cependant, les niveaux de transfection obtenus de la sorte sont limités et

insuffisants pour conférer un réel bénéfice thérapeutique. Dans ce contexte, ce travail s'est premièrement intéressé à l'identification des étapes potentiellement limitantes pour le transfert de gènes par administration HLV. Différentes pistes d'optimisations ont été proposées et ensuite testées en utilisant la souris en tant qu'animal modèle. Ainsi, divers vecteurs synthétiques ont été utilisés, notamment des copolymères tribloc amphiphiles neutres, pouvant aider au franchissement du sarcolemme des fibres musculaires. De même, une série d'ADN plasmidiques comportant des séquences spécifiques pouvant faciliter l'étape de l'import nucléaire (appelées « DNA nuclear Targeting Sequences » ou DTS) a été mise au point et évaluée en exploitant la procédure HLV.

Title: Non-viral gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: optimization strategies and application in the mouse

Keywords: Gene transfer; Synthetic vectors; Hydrodynamic Limb Vein injection; Skeletal muscles; Duchenne muscular dystrophy

Abstract: Hydrodynamic Limb Vein injection (HLV) is a physical loco-regional gene delivery method. In fact, it allows to treat the whole musculature of a given limb isolated by a tourniquet thanks to the delivery of a large volume containing nucleic acid constructs complexed or not with synthetic vectors. This delivery approach is efficient in small as well as in large animals and clinical trial demonstrated its feasibility and safety in humans. Thus, HLV injection is attractive for gene therapy applications dedicated to myopathies, comprising Duchenne muscular dystrophy. While used in its first indication, naked DNA can be transfected with some efficiency. However, the gene transfer efficacies obtained

are insufficient to reach a therapeutic threshold. In this context, the first part of this work was dedicated to the identification of potential hurdles that could limit the transfection efficiency during HLV injection. Then, some optimizations have been proposed and evaluated using mice as a convenient animal model. Accordingly, synthetic vectors comprising neutral amphiphilic triblock copolymers were used with the aim to help the transfection process when crossing the sarcolemma of muscle fibers. Likewise, in view to enhance the gene transfer at the nuclear translocation step, plasmid DNA equipped with DNA nuclear targeting sequences were designed and delivered *via* HLV injection.