

UNIVERSITÉ D'ORLÉANS

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES ET CHIMIE DU VIVANT
Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :

Caroline GIRARDIN

soutenue le : **06 mai 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Transfert de gènes par vecteurs synthétiques :

**Optimisation du transport intracellulaire et délivrance
dans le noyau d'un plasmide ADN**

THÈSE dirigée par :
Patrick MIDOUX

Directeur de Recherche, INSERM, Orléans

RAPPORTEURS :
Marie-Pierre ROLS
Guy ZUBER

Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse
Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg

JURY :

Chantal PICHON
Marie-Pierre ROLS
Guy ZUBER
Tristan MONTIER
Philippe GUEGAN
Patrick MIDOUX

Professeur des Universités, Orléans, Président du jury
Directeur de Recherche, CNRS, Toulouse
Directeur de Recherche, CNRS, Strasbourg
Professeur des Universités, Brest
Professeur des Universités, Paris
Directeur de Recherche, INSERM, Orléans

Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier le Dr Patrick Midoux de m'avoir donné l'opportunité de travailler à ses côtés sur le thème de la thérapie génique ainsi que pour ses conseils et le temps qu'il m'a accordé tout au long de mon doctorat.

J'exprime ma gratitude au Pr. Chantal Pichon pour m'avoir accueillie au sein du groupe thématique "Thérapies innovantes et nanomédecine". Je tiens également à la remercier pour son engagement dans la réussite des étudiants et des doctorants, et de nous avoir permis de reprendre nos recherches dans les meilleures conditions malgré la situation sanitaire.

Je remercie la directrice du CBM, le Dr. Eva Jakab Toth, de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie également le Dr. Marie-Pierre Rols et le Dr. Guy Zuber, mes rapporteurs de thèse, d'avoir accepté de juger mon travail ainsi que le Pr. Tristan Montier et le Pr. Philippe Guégan d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant qu'examineurs.

Evidemment, ces travaux n'auraient pas été possibles sans ton aide, Delphine. Ton professionnalisme, ta détermination et ta générosité m'ont permis de m'intégrer au mieux dans l'équipe. A toi ma bretonne préférée, je te souhaite bon vent pour l'avenir ainsi que tous mes vœux de bonheur.

Je souhaite également présenter mes remerciements à Vinni, Elodie, Amandine, Christophe et Yoan. Je vous remercie d'avoir mis des couleurs dans ma vie de doctorante. Vos qualités personnelles et professionnelles m'ont aidées à me surpasser un peu plus chaque jour. En souvenirs de nos sorties plus ou moins culturelles, ne changez rien et bonne route à vous tous !

Merci à vous, Cristine et Virginie, pour votre regard maternel, votre soutien et vos bons conseils. Je tenais à vous dire que vous m'avez inspirée chaque jour. Je me sens chanceuse d'avoir croisé votre chemin. Prenez soin de vous !

Fédérico, je te remercie d'avoir pris le temps de partager tes connaissances, tes compétences scientifiques, bref ta passion pour la biologie. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir.

Je remercie également, David Gosset, responsable de la plateforme P@cifique, de m'avoir formée aux techniques de microscopie, de vidéomicroscopie et de cytométrie qui ont été des outils essentiels à la réalisation de mon projet.

Au reste de l'équipe, Pinpin, Geoffrey, Florence, Fatma, Anthony, Jean-Marc, Philippe, Patrick, Rudy et Cyril, je tiens à vous exprimer ma gratitude car d'une manière ou d'une autre, vous avez participé à mon éducation scientifique par vos avis et vos conseils techniques. Merci, aux anciens doctorants de nous avoir montré quelques ficelles.

Je tiens à remercier Anja, Esma, Andréane et Jules, les différents stagiaires que j'ai eu l'opportunité de rencontrer. Grâce à eux j'ai pu progresser sur le plan pédagogique et humain. J'espère avoir pu leur être utile en leur apportant l'aide et les conseils dont ils avaient besoin. Merci à Anja, stagiaire M2 dont je me souviendrai longtemps pour sa curiosité, sa joie de vivre et son positivisme.

Je tiens également à remercier le Dr Durand, le Dr Jagla, Emilie, Odile, Isabelle, Patrick P., Maxime, Thomas L., Diane, Thomas B. et Anaïs ainsi que toutes les personnes qui m'ont permis de grandir et de m'épanouir en prenant le temps de partager avec moi leur passion quelle qu'elle soit.

A mes amis de longues dates, de l'école, du collège et du lycée, je tiens naturellement à vous remercier pour votre soutien sans faille durant toutes ces années.

Je souhaite présenter toute ma gratitude à Olivier et Sylvie pour leur bienveillance et leur soutien ainsi qu'à mes parents pour tous leurs efforts et leur patience. En espérant être à la hauteur, je continue ma route sans oublier d'où je viens.

Enfin, je ne remercierai jamais assez Johan d'être à mes côtés à chaque instant, pour tous les kilomètres parcourus durant ces trois années et surtout pour sa confiance. En espérant conserver au mieux cette précieuse harmonie pour mener au mieux nos futurs projets. Merci à toi.

Table des matières

Liste des figures	6
Liste des tableaux.....	9
Liste des abréviations	11
Introduction.....	16
1 Chapitre I : La thérapie génique	18
1.1 Principe et généralité	18
1.2 Histoire	18
1.3 Les différentes stratégies de la thérapie génique.....	22
1.3.1 Addition de gènes	23
1.3.2 Inhibition ciblée de l'expression génique	27
1.3.3 L'édition de génome	30
1.4 Les vecteurs viraux.....	36
1.4.1 Virus associés aux adénovirus	39
1.4.2 Lentivirus	39
1.5 Les succès de la thérapie génique	41
1.6 Dystrophie Musculaire de Duchenne.....	49
1.6.1 Généralités.....	49
1.6.2 Le gène DMD / la protéine	50
1.6.3 Les mutations	55
1.6.4 Stratégies thérapeutiques et essais cliniques	57
1.7 Mucoviscidose.....	65
1.7.1 Généralités.....	65
1.7.2 CFTR Gene / Protéine	65
1.7.3 Les mutations	67
1.7.4 Traitements pharmaceutiques	69
1.7.5 Traitements de la mucoviscidose par thérapie génique	72
1.8 Conclusion	77
2 Chapitre II : Les systèmes de délivrance non viraux dans le contexte de la DMD et de la Mucoviscidose	79
2.1 Les vecteurs non viraux.....	79
2.1.1 Liposomes cationiques	81

2.1.2	Polymères cationiques.....	85
2.1.3	Lipopolyplexes.....	88
2.2	Traffic intracellulaire des vecteurs non viraux.....	88
2.2.1	Généralités.....	88
2.2.2	Franchissement de la membrane plasmique	89
2.2.3	Echappement endosomal.....	92
2.2.4	Migration cytosolique.....	98
2.2.5	Franchissement de l'enveloppe nucléaire	99
2.3	Optimisation de l'ADN plasmidique favorise le transport intracellulaire.....	100
2.4	Migration cytosolique	102
2.4.1	Microtubules	102
2.4.2	Passage de l'enveloppe nucléaire	111
3	Chapitre III : Fonctionnalisation d'un plasmide ADN par un peptide	122
3.1.1	Les liaisons non covalentes	122
3.1.2	Les liaisons covalentes	126
3.2	Formation de triple hélice	131
3.2.1	Généralités.....	131
3.2.2	Modifications de la base	133
3.2.3	Modifications du sucre	134
3.2.4	Modifications des liaisons phosphodiester	137
4	Chapitre IV : Matériel et méthodes.....	139
4.1	Cellules.....	139
4.1.1	Lignée HeLa	139
4.1.2	Lignée CFBE	139
4.1.3	Lignée C2C12 et cellules mdx.....	140
4.1.4	Lignées HeLa-eGFP-tub, HeLa-MRFP-Tub, HeLa-FIP1eGFP	140
4.1.5	Passage des cellules.....	140
4.1.6	Transfection avec PTG1	141
4.1.7	Mesure de l'efficacité de transfection	142
4.2	Les plasmides	144
4.2.1	Construction du plasmide pTG11033-6TH	144
4.2.2	Amplification et purification de plasmide	147
4.2.3	Peptides et oligonucléotides	147

4.2.4	Formation des triples hélices	148
4.3	Caractérisation des complexes ADN/Polymères	149
4.4	Microscopie confocale	149
4.4.1	Immunomarquages de la protéine CFTR.....	149
4.4.2	Immunomarquages de la protéine Dystrophine	150
4.5	Interactions microtubules isolés Qdot-P4	150
4.5.1	Quantum dots.....	150
4.5.2	Microtubules isolés	152
4.5.3	Co-Immunoprécipitation.....	153
5	Chapitre V : Partie expérimentale	156
5.1	Construction de plasmide de différentes tailles	156
5.1.1	Fonctionnalité des ADNp : expression du gène codant la luciférase par bioluminescence	162
5.1.2	Fonctionnalité des ADNp : immunomarquage des protéines CFTR et Dystrophine et spécificité des promoteurs	163
5.2	Caractérisation des étapes de construction des ADNp-TH-peptide	166
5.2.1	Conjugaison entre peptide et TFO	166
5.2.2	Hybridation des TFO-FAM aux plasmides ADN	169
5.2.3	Hybridation des TFO-P4 aux plasmides ADN.....	173
5.3	Efficacité de transfection des plasmides nus ou complexés associés au peptide P4 par une triple hélice	175
5.3.1	Efficacité de transfection des plasmides associés au peptide P4 et complexés à un vecteur synthétique.....	176
5.3.2	Vérification de la fonctionnalité du peptide	179
5.3.3	Optimisation de la triple hélice.....	184
5.3.4	Efficacité de transfection des plasmides nus associés au peptide P4	201
5.3.5	Efficacité <i>in vivo</i>	204
6	Conclusions et perspectives	213
6.1	Construction des ADNp-TFO-peptide.....	213
6.2	Efficacité de transfection des ADNp-TFO-peptide.....	214
7	Bibliographie	218
8	Annexes	258

Liste des figures

Figure 1 : Chronologie des étapes importantes en thérapie génique	21
Figure 2 : Les thérapie génique ex vivo et in vivo.....	22
Figure 3 : Exemple du mode d'action des vaccins à ADN.	26
Figure 4 : Les principaux analogues d'acides nucléiques utilisés pour la synthèse des oligonucléotides antisens.	28
Figure 5 : Les stratégies d'inhibition de gènes.....	29
Figure 6 : Schéma du mécanisme de saut d'exon.....	30
Figure 7 : Les mécanismes d'édition de génome et de réparation des cassures double brin dans l'ADN.	33
Figure 8 : Mode d'action des systèmes d'édition de bases et de « prime editing »	35
Figure 9 : Les essais cliniques en thérapie génique.	37
Figure 10 : Représentation des vecteurs adénoassociés et des lentivirus recombinants..	38
Figure 11 : La dystrophine et ses isoformes.....	51
Figure 12 : Localisation et interactions de la dystrophine dans la cellule musculaire.. ..	52
Figure 13 : Le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC).....	54
Figure 14 : Structure de la mini- et la microdystrophine.....	59
Figure 15 : Schéma du mécanisme de saut d'exon illustré par l'exemple du saut de l'exon 52 du gène codant la dystrophine.....	60
Figure 16: Délétion d'une grande région dans le gène dmd murin par le système CRISPR... ..	64
Figure 17 : La protéine CFTR et sa localisation dans la membrane plasmique.....	66
Figure 18 : Le gène CFTR, le transcrit et la distribution des mutations.	67
Figure 19 : Classification des mutations de la protéine CFTR.	68
Figure 20 : Représentation schématique des vecteurs non viraux.	79
Figure 21 : Structures des lipides cationiques et co-lipides utilisés dans les liposomes.	82
Figure 22 : Structure de la PEI linéaire et de la PEI branchée.....	86
Figure 23 : Les voies d'internalisation d'endocytose à clathrine et à cavéoline.....	91
Figure 24 : Schéma du mécanisme d'éponge à protons..	95
Figure 25 : Mécanisme d'infection d'un adénovirus.....	101
Figure 26 : Composition et structure des microtubules.....	104

Figure 27 : Le complexe de la dynéine.....	105
Figure 28 : Le peptide P79-98 favorise le transport des plasmides ADN le long des microtubules.....	111
Figure 29 : Composition de l'enveloppe nucléaire.....	113
Figure 30 : Schéma de la voie de signalisation NF- κ B.	118
Figure 31 : Les séquences 3NF améliore la délivrance au noyau des plasmides et leur favorise leur expression.	120
Figure 32 : Conjugaison d'un peptide NLS à un plasmide ADN selon la stratégie de triple hélice de Branden <i>et al.</i>	124
Figure 33 : Etapes de construction dans la stratégie padlock.....	125
Figure 34 : Stratégies de couplage chimique entre un peptide NLS et une molécule d'ADN.....	127
Figure 35 : Stratégies de couplage entre un oligonucléotide-peptide NLS par la stratégie de ligation à un ADN double brin linéarisé.	128
Figure 36 : Orientations des oligonucléotides formant des triples hélices en fonction de leurs motifs.....	131
Figure 37 : Conformation des C3'-endo et C2'-endo des sucres des nucléotides.	134
Figure 38 : Réaction de l'activité de la luciférase.....	142
Figure 39 : Réaction colorimétrique du test d'acide bicinchonique de dosage des protéines.	143
Figure 40 : Caractéristiques des Qdots® 525 conjugués à la streptavidine..	151
Figure 41 : Les stratégies de conjugaison du peptide P4 sur un plasmide ADN..	156
Figure 42 : Exemple des principaux types d'analogues de nucléotides retrouvés dans les TFO.	158
Figure 43 : Schéma des plasmides utilisés dans le projet.....	161
Figure 44 : Efficacité de transfection des différents ADNp dans les cellules HeLa, CFBE et C2C12.....	163
Figure 45 : Immunomarquage et spécificité tissulaire des promoteurs spc5.12 et hCEF1.	165
Figure 46 : Schéma de la conjugaison entre le TFO et le peptide P4.....	166
Figure 47 : Etude cinétique de la conjugaison entre l'oligonucléotide-DBCO et un fluorochrome FAM-azide.....	167
Figure 48 : Etude de saturation entre l'oligonucléotide-DBCO et un peptide-azide.....	169
Figure 49 : Formation de triples hélices.....	171
Figure 50 : La formation des triples hélices entre le TFO-P4 et le plasmide pGeneGrip ou pspc5-12-DYS-3NF-6TH.....	174

Figure 51 : Cinétique de formation de la triple hélice.....	175
Figure 52 : Caractérisation de la taille (A) et du potentiel zeta (B) des complexes.....	177
Figure 53 : Efficacité de transfection en fonction de la quantité en ADN..	178
Figure 54 : Observation par microscopie confocale des interactions entre le peptide P4 et les microtubules..	182
Figure 55 : Co-immunoprécipitation des complexes FIP1-eGFP/P4..	184
Figure 56 : Efficacité de transfection des plasmides phCEF1-CFTR-6TH en fonction de la quantité de peptides associés et complexés au polymère His/IPEI à 24 et 48 heures après la transfection de cellules HeLa..	187
Figure 57 : Schéma du greffage d'un TFO-P4 et d'un TFO-PEG-P4 à un plasmide ADN..	188
Figure 58 : Efficacité de transfection des plasmides phCEF1-CFTR-6TH en fonction de la quantité de TFO-PEG-peptides, 48 heures après la transfection.....	189
Figure 59 : Efficacité de transfection des plasmides phCEF1-CFTR-6TH complexés à la IPEI-P4, la IPEI-P1, la IPEI ou la PTG1.....	190
Figure 60: Efficacité de transfection des lipoplexes phCEF1-CFTR-TFO-peptide/lipofectamine 3000 en fonction de la concentration en TFO-peptide.....	191
Figure 61 : Etude qualitative de la stabilité de la triple hélice	192
Figure 62: Stabilité de la triple hélice après la complexation et la décomplexation avec la IPEI.....	194
Figure 63 : Efficacité de transfection des phCEF1-CFTR-TFO-peptides après purification l'éthanol (A) ou par dialyse (B).....	197
Figure 64: Test de stabilité de déplacement entre les TFO-FAM et les TFO-DBCO. ...	198
Figure 65 : Test de formation des triples hélices avec différents types d'oligonucléotides.....	200
Figure 66 : Mesures de bioluminescence 48h après électroporation en fonction de la concentration en TFO-peptides.....	201
Figure 67: Choix de la concentration en TFO-peptide à greffer sur les pDys-6TH +/- 3NF.	205
Figure 68 : Injection hydrodynamique par la veine saphène dans les membres postérieurs murins.	206
Figure 69 : Mesure de l'activité de la luciférase par bioluminescence après l'injection des plasmides pDYS-6TH-P1 et pDYS-6TH-P4 ou d'une solution saline NaCl. ...	206
Figure 70 : Mesure de l'activité de la luciférase par bioluminescence après l'injection des plasmides pDYS-3NF-6TH-P1 et pDYS-3NF-6TH-P4 ou d'une solution saline NaCl.	207

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les principales stratégies en thérapie génique.....	36
Tableau 2 : Evolution de la distribution des vecteurs viraux employés en thérapie génique entre 2012 et 2019	37
Tableau 3 : Comparaison des vecteurs recombinants associés aux adénovirus et lentiviraux.....	40
Tableau 4 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies métaboliques.	41
Tableau 5 : Les succès de la thérapie génique pour les déficits immunitaires sévères.	42
Tableau 6 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies neuromusculaires ...	43
Tableau 7 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies neurodégénératives	44
Tableau 8: Les succès de la thérapie génique pour les maladies hématologiques	45
Tableau 9 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies dermatologiques	45
Tableau 10: Les succès de la thérapie génique pour les maladies ophtalmiques	46
Tableau 11: Les succès de la thérapie génique pour les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers.....	47
Tableau 12 : Produits de thérapie génique possédant une autorisation de mise sur le marché	48
Tableau 13 : Exemples d'essais cliniques utilisant la stratégie de saut d'exon dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	61
Tableau 14 : Essais cliniques en thérapie génique en cours dans le contexte de la DMD	63
Tableau 15 : Etudes du saut d'exon dans le contexte de la DMD.	64
Tableau 16 : Traitements pharmacologiques utilisés dans le contexte de la mucoviscidose	71
Tableau 17 : Vecteurs viraux utilisés dans le transfert du gène codant la protéine CFTR.	75
Tableau 18 : Récapitulatif des vecteurs non-viraux utilisés dans le traitement de la mucoviscidose	84
Tableau 19 : Exemples de séquences DTS.....	116
Tableau 20 : Comparaison des différentes stratégies de couplage d'un peptide sur une molécule d'ADN.	130
Tableau 21 : Nombre de triple hélice en fonction de la taille du plasmide et du nombre de sites TH.....	173
Tableau 22 : Purification des triples helices entre les FAM-TFO et les ADNp sans site TH (pTG11033) et ADNp avec 6 sites TH (ADNp-6TH).....	196

Tableau 23 : Résultats de luminescence <i>ex vivo</i> sur les broyats de muscles.	210
Tableau 24 : Effet du peptide P4 et des séquences 3NF sur la transfection à partir des résultats de luminescence obtenus pour 8 muscles squelettiques de membres inférieurs de souris Swiss après une injection HLV.	210
Tableau 25 : Effet général de P4 sur la transfection des muscles squelettiques des membres inférieurs de souris Swiss par injection HLV.	211
Tableau 26 : Analyse des résultats d'efficacité de transfection dans les muscles squelettiques des membres inférieurs de souris Swiss par injection HLV.....	212

Liste des abréviations

(b/l) PEI : polyéthyleimine (branchée/linéaire)
(r)AAV : virus (recombinant) associés aux adénovirus
(r)Ad : adénovirus (recombinants)
(r)LV : lentivirus recombinant
2'-O-me : 2'-O-methyl
2'-O-MEO : 2'-O-methoxyethyl
5-FC : 5-fluorocytosine
6-FAM : 6-carboxyfluorescéine
AAV2-hAADC-2 : associated adenovirus-human dopa decarboxylase
ABCA4 : ATP binding cassette subfamily A member 4
ABCD1 : ATP binding cassette subfamily D member 1
ABE : adenosine base editor
ADA : adénosine désaminase
ADA-SCID : déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase
ADN : acide désoxynucléique
ADNc : acide désoxynucléique codant
APC : cellule présentatrice d'antigène
ARN : acide désoxyribonucléique
ARNm : acide désoxyribonucléique messenger
ARSA : arylsulfatase A
ASO : oligonucléotide antisens
ATP : adénosine triphosphate
CAR-T : lymphocytes T exprimant un récepteur chimérique d'antigène
CBE : cytosine base editor
CCR5 : C-C motif chemokine receptor 5
CFBE : cystic fibrosis bronchial epithelial
CFTR : cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CMV : human cytomegalovirus
COL7A1 : collagen type VII α 1 chain
complexe RISC : RNA-induced silencing complex

CPI : cyclopropapyrroindole
 CRISPR/Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Caspase 9
 C-ter : extrémité C-terminale
 CTP : cytidine triphosphate
 CYBB : cytochrome b-245 beta chain
 DC-Chol/DOPE : DC-Cholesterol/Dioleoyl Phosphatidylethanolamine
 DDC : dopa decarboxylase
 DGC : dystrophin glycoprotein complex
 DHC : chaîne lourde de la dynéine
 DIC : chaîne intermédiaire de la dynéine
 DLC : chaîne légère de la dynéine
 DLIC : chaîne légère intermédiaire de la dyénine
 D-Lin-MC3-DMA : dilinoleylmethyl-4-dimethylaminobutyrate
 DLS : diffusion light scattering
 DMD : dystrophie musculaire de Duchenne
 DMG-PEG : 1,2-Dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol
 DMPE-PEG 5000 : 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-5000]
 DOPC : L- α -dioleoyl phosphatidyl choline
 DOPE : di-oleoyl phosphatidyl ethanolamine [L- α -di-oleoyl phosphatidyl ethanolamine
 DOSPA : 2,3-dioleyloxy-N-[2-(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl -1-propanaminium trifluoroacetate
 DOTAP : 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane
 DOTMA : 1,2-di-O-octadecenyl-3-trimethylammonium propane
 DPim : 1,2-di-palmitoyl-deoxyglycerol (4-(2,3-bis-palmitoyloxy-propyl)-1-methyl-1H-imidazole
 DSP : 3,3-Dithio- bis-(sulfosuccinimidyl)propionate
 DTS : séquence ADN de ciblage nucléaire
 DYS : dystrophine
 EDL : extenseur long des doigts
 EDMPC : p-ethyl-dimyristoylphosphadityl choline
 EMA : agence européenne de médecine
 ESE : exonic splicing enhancers

FDA : food and drug administration
 FIP-1 : fourteen interacting protein 1
 FISH : hybridation in situ en fluorescence
 GAG : glycoaminoglycanes
 GM-CSF : granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
 GRE : éléments de réponse aux glucocorticoïdes
 HEX A/B : hexosaminidase subunit α/β
 HLV : hydrodynamic limb vein
 HR : recombinaison homologue
 HSV-tk/GCV : thymidine kinase du virus herpès simplex de type-1/ganciclovir
 IL2RG : interleukin 2 receptor subunit gamma
 INM : membrane nucléaire interne
 K⁺ : ions potassium
 LAMB3 : laminin subunit β 3
 LNA : locked nucleic acid
 LTR : séquence terminale longue répétée
 Luc : luciférase
 MAP : protéine associée aux microtubules
 miARN : microARN
 MT-ATP6 : mitochondrially encoded ATP synthase 6
 MT-CO 1/3 : mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I/III
 MT-CYB : mitochondrially encoded cytochrome b
 MTM1 : myotubularine 1
 MT-ND 1/2/4/5 : NADH dehydrogenase subunit 1/2/4/5
 MTOC : centre organisateur des microtubules
 NAGLU : N-acetyl- α -glucosaminidase
 nCas9 : nickase Caspase 9
 NGF : nerve growth factor
 NHEJ : jonction d'extrémités non homologues
 NLS : signal de localisation nucléaire
 nNOS : neural nitric oxide synthase
 NPC : complexe nucléoprotéique

N-ter : extrémité N-terminale
 ONM : membrane nucléaire externe
 OTC : ornithine transcarbamylase
 PAM : protospacer adjacent motif
 PEG : polyéthylène glycol
 pegRNA : prime editing guide RNA
 peptide cyclo RGD : peptide arginine-glycine-aspartate cyclique
 PIC : complexe de préintégration
 PLGA : Poly Lactic-co-Glycolic Acid
 PMO : morpholino phosphoroamidate
 PNA : peptide nucleic acid
 PS : phosphorothioates
 RE : réticulum endoplasmique
 rFIV-GP64 : recombinant feline immunodeficiency virus-glycoprotein GP64
 RLU : unité relative de lumière
 RMN : résonance magnétique nucléaire
 RPE65 : retinoid isomerohydrolase RPE65
 rSIV.F/HN : recombinant Sendai virus - F and HN glycoproteins
 Serca2 : ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 2
 siARN : small interfering ARN
 SIN lentivirus : self-inactivating lentivirus
 SIN-COL7A1 : self-inactivating lentivirus - collagen type VII α 1 chain
 site TH : site triple hélice
 SMCC : succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate
 SMN1/2 : survival of motor neuron 1/2
 SRF : serum response factor
 TALEN : Transcription activator-like effector nuclease
 TCTEL1 : Dynein light chain Tctex-type 1
 TFO : oligonucléotide capable de former une triple hélice
 TFPAM-6 : N-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzyl)-6-maleimidylhexanamide
 TRAIL : human tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand
 UGTA : UDP-1 peptide glycosyltransferase A1

UTP : uridine triphosphate

VIH : virus de l'immunodéficience humaine

WAS : Wiskott-Aldrich syndrome

X-SCID : immunodéficience sévère liée à au chromosome X

ZFN : nucléase à doigt de zinc

Introduction

Le transfert de gène est l'une des stratégies utilisées en thérapie génique notamment dans le cadre de pathologies monogéniques afin de restaurer l'expression d'une protéine. Depuis l'an 2000, les succès en thérapie génique se multiplient et de plus en plus de médicaments apparaissent sur le marché international. Les gènes thérapeutiques sont transportés dans les cellules à l'aide de vecteurs viraux. Ces virus recombinants correspondent à des particules virales non répliquatives capables de franchir les barrières cellulaires et de délivrer le matériel génétique dans le noyau des cellules de manière efficace. Cependant, la taille des transgènes capable d'être insérés dans ces vecteurs est limitée, ce qui restreint leur utilisation lorsque le gène à introduire est de grande taille comme c'est le cas pour des pathologies comme la dystrophie musculaire de Duchenne ou la mucoviscidose. D'autre part leur coût de production demeure très élevé et leur immunogénicité reste présente. Aussi, des recherches sur des vecteurs synthétiques sont effectuées par de nombreux laboratoires. Ces vecteurs sont des polymères cationiques ou des lipides cationiques avec lesquels l'immunogénicité est faible et la taille du transgène n'est pas un facteur limitant. Cependant, les applications cliniques de ce type de vecteur sont limitées par leur faible efficacité de transfection comparée à celle des virus, notamment due à leur difficulté à franchir les barrières cellulaires (*i.e.* membrane plasmique, endosome, cytosol et enveloppe nucléaire).

C'est dans ce contexte que j'ai réalisé mon projet de thèse. Des études réalisées dans mon laboratoire d'accueil ont montré l'intérêt de trois signaux moléculaires inspirés des mécanismes d'infection des adénovirus pour augmenter l'efficacité de transfection des

vecteurs non-viraux. Il s'agit de molécules d'histidines greffées à un polymère cationique qui facilitent l'échappement endosomal des complexes, et de deux signaux associés directement à la séquence ADN qui sont le peptide P4 et les séquences 3NF qui facilitent la migration le long des microtubules et le franchissement de l'enveloppe nucléaire, respectivement.

L'objectif de mon projet de thèse consiste à associer ces signaux à des plasmides d'intérêt pour traiter la dystrophie musculaire de Duchenne et la mucoviscidose.

1 Chapitre I : La thérapie génique

1.1 Principe et généralité

Le transfert de gènes consiste à introduire une copie fonctionnelle d'un gène dans une cellule afin de promouvoir l'expression de la protéine qu'il code. C'est l'un des aspects de la thérapie génique qui repose sur l'introduction de matériel génétique dans des cellules, ou des tissus cibles, pour lutter contre une pathologie génétique (héréditaire) ou acquise (comme les cancers). Ce traitement est autorisé uniquement dans les cellules somatiques afin d'éviter la transmission à la descendance. En effet, la modification des cellules germinales par l'introduction de gènes fonctionnels engendrerait des modifications dans tout l'organisme qui seraient transmises aux générations suivantes. C'est pourquoi, d'un point de vue éthique et législatif, il est impossible de réaliser de telles modifications génétiques chez l'Homme.

1.2 Histoire

La transmission de l'information génétique d'une cellule à une autre a été mise en évidence par le bactériologiste Frederick Griffith, en 1928 (Griffith, 1928) (figure 1). En 1944, la nature chimique de la substance transformante est identifiée comme étant un acide désoxyribonucléotide (ADN) par Avery, McCarty et MacLeod (Avery *et al.*, 1944). Le transport de l'ADN entre cellules devient alors un sujet de recherche majeur afin de comprendre quels sont les mécanismes mis en jeu. Ainsi, il a été mis en évidence que les virus ont la capacité de transporter l'ADN entre deux souches bactériennes (Zinder et Lederberg, 1952) et que les cellules animales subissent des modifications génétiques à la suite d'une infection virale (Temin, 1961). Puis, Szybalski a démontré la possibilité de

corriger des défauts génétiques dans des cellules de mammifères issues de moelle épinière (lignée humaine D98S) par un ADN étranger et que cette nouvelle information génétique est transmise aux cellules filles (Szybalska et Szybalski, 1962).

A cette époque, les virus étaient des outils attractifs pour délivrer des gènes dans des cellules d'intérêt. Les recherches autour de ces outils, ou vecteurs, s'intensifièrent à tel point que leur application thérapeutique est devenue un nouvel objectif à conditions de remplacer les gènes responsables de leur virulence par des gènes thérapeutiques (Tatum, 1966). La preuve de concept a été réalisée par Rogers et son équipe en 1968 (Rogers et Pfuderer, 1968) (figure 1).

Les premiers espoirs de la thérapie génique naissent dans les années 1990 avec la restauration des fonctions de l'enzyme adénosine désaminase (ADA) chez deux patients traités contre l'ADA-SCID, une immunodéficience sévère (figure 1). La méthode utilisée consistait à prélever des cellules souches hématopoïétiques chez des patients, puis à les modifier génétiquement *ex vivo* à l'aide d'un rétrovirus afin de rétablir l'expression de l'enzyme, avant de les réinjecter chez les patients (Blaese *et al.*, 1995). Les résultats de ce test clinique ont montré que le nombre de cellules T chez un des deux patients est redevenu normal et que le taux de lymphocytes T circulants exprimant toujours le transgène reste stable sur une période d'au moins 5 ans. Cependant, le traitement enzymatique initialement administré à ces patients a été maintenu après leur greffe, puis progressivement réduit, compliquant ainsi l'interprétation des bénéfices uniquement liés à la thérapie génique.

Ce résultat a encouragé le développement de la thérapie génique et les essais cliniques se sont multipliés. En 1999, la thérapie génique montre ses limites après un essai clinique utilisant un adénovirus pour introduire le gène de l'ornithine transcarbamylase (OTC). L'administration d'une forte dose de ce vecteur viral a déclenché une réponse immunitaire fatale pour le patient. Cet accident a rappelé les limites de la thérapie génique et notamment les inconvénients de l'emploi des virus recombinants pour introduire un gène thérapeutique afin de traiter les patients souffrant de pathologie génétique. Les recherches tendent alors à développer de nouveaux virus recombinants et des vecteurs non-viraux qui présenteraient moins de risques.

L'an 2000 a été marqué par le premier succès de la thérapie génique pour le traitement d'enfants atteints d'une immunodéficience sévère liée au chromosome X (X-SCID) par le professeur Alain Fisher et son équipe (figure 1). Ces enfants, surnommés bébés bulles, étaient porteurs d'une mutation dans le gène IL2RG qui code la sous-unité γ_c d'un récepteur aux cytokines. Cette déficience conduit à une absence totale de lymphocyte T et de cellule NK responsables de l'immunité innée. En absence de greffe allogénique de moelle osseuse, les patients atteints par cette pathologie n'ont pas de défense immunitaire et succombent aux maladies opportunistes. La stratégie utilisée lors de cet essai clinique repose sur le prélèvement de cellules CD34+ prélevées chez les patients, puis transduites *in vitro* avec un virus défectueux, le rétrovirus Moloney γ -c (MFG γ -c), porteur d'une copie fonctionnelle de la sous-unité γ_c du récepteur, avant d'être réinjectées chez les patients. Le suivi des patients a montré que le nombre de lymphocytes T augmente à partir de 30 jours pour le patient 1 et à partir de 60 jours pour

le patient 2. A 150 et 275 jours après le traitement, une forte proportion de lymphocytes T porte toujours le transgène (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000).

Aujourd'hui, plusieurs produits de thérapie génique à base de vecteurs viraux sont commercialisés à travers le monde (figure 1). En 2003, la Chine fût le premier pays à les autoriser pour le traitement de cancers « tête et cou » (Gendicine™, Sibiono Gene Tech Co.). Puis, en 2012, l'agence européenne de médecine (European Medicine Agency, EMA) autorise l'emploi d'un produit de thérapie génique en Europe (Glybera, Amsterdam Molecular Therapeutics).

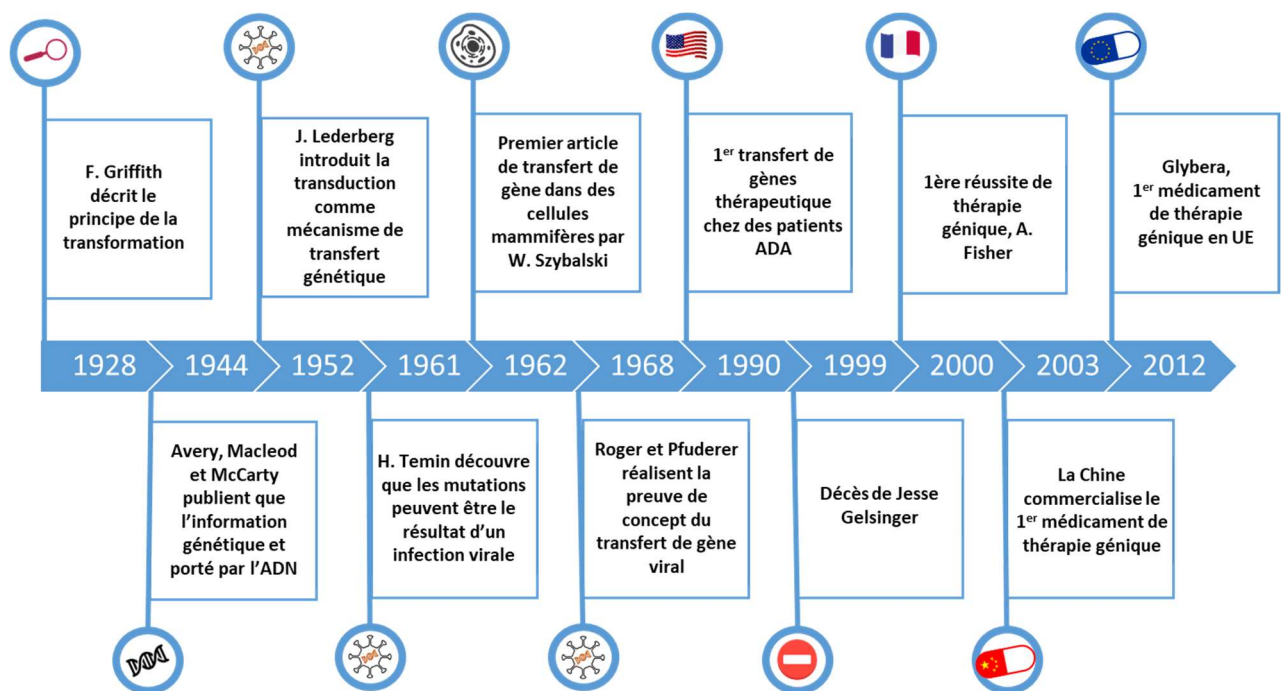


Figure 1 : Chronologie des étapes importantes en thérapie génique d'après (Wirth *et al.*, 2013).

1.3 Les différentes stratégies de la thérapie génique

Les recherches concernant l'introduction de matériel génétique dans des cellules humaines s'intensifient dans le but de mettre au point une stratégie thérapeutique efficace pour lutter contre les dérégulations du génome et remplacer les traitements pharmaceutiques souvent à l'origine d'effets secondaires sur le long terme. La connaissance des grandes étapes de régulation des gènes au niveau de la transcription ou de la traduction a permis de mettre en place diverses méthodes répertoriées selon leur mode d'action : l'addition de gènes, l'inhibition ciblée de l'expression génique, l'induction de l'apoptose, l'édition du génome. Le transfert du matériel génétique peut se faire de manière *ex vivo* (traitement de cellules extraites de l'organisme puis réintroduites) ou *in vivo* (injection directe du gène médicament dans l'organisme) grâce à des vecteurs viraux ou des vecteurs synthétiques (figure 2).

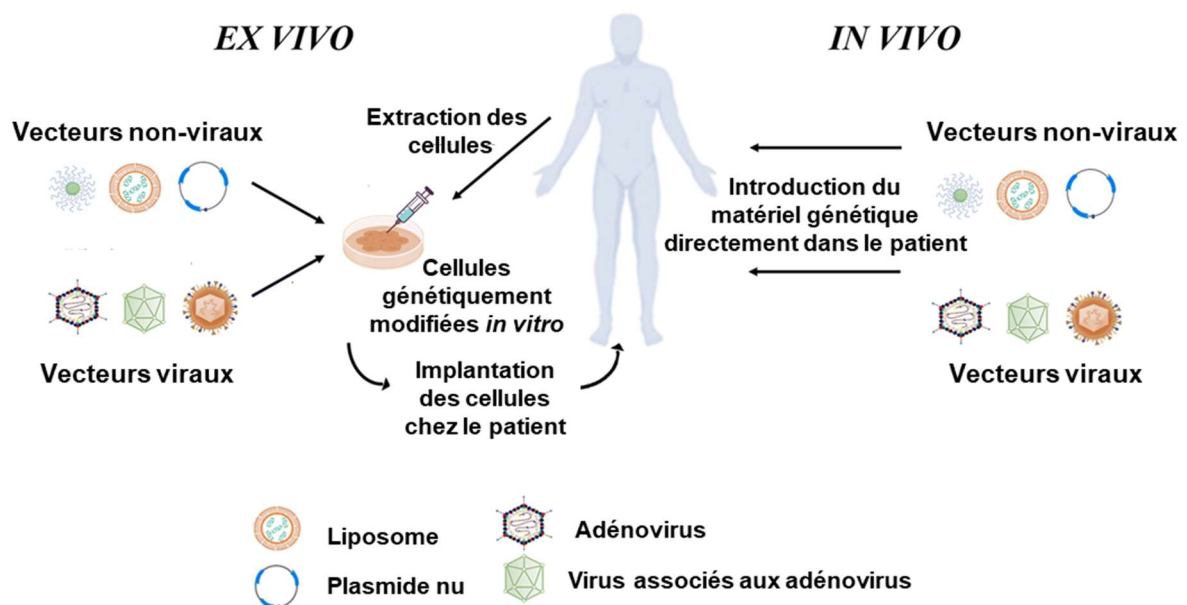


Figure 2 : Les thérapie génique *ex vivo* et *in vivo*. La première étape de thérapie génique *ex vivo* est l'extraction de cellules à partir du corps du patient, puis les cellules sont modifiées génétiquement par transfection *in vitro* par des vecteurs viraux ou non-viraux porteurs de l'acide nucléique thérapeutique. Ensuite, les cellules positives sont réimplantées chez le patient. En thérapie génique *in vivo*, l'introduction du matériel génétique et des vecteurs viraux ou non-viraux se fait directement chez le patient. Figure adaptée d'après (Melim *et al.*, 2020).

1.3.1 Addition de gènes

La compensation génique, ou l'addition d'un gène, est utilisée dans le cas où le gène défectueux ne s'exprime pas ou produit une protéine non fonctionnelle. Cette stratégie correspond à l'insertion d'un ADNc codant une copie fonctionnelle du gène défectueux dans le noyau, afin de restaurer l'expression d'une protéine normale. Ainsi, l'addition du gène médicament, au génome de la cellule, permet de palier la déficience du gène endogène et de rétablir les fonctions cellulaires.

L'addition de gènes est également une solution envisagée pour lutter contre certaines formes de cancers afin d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses de manière spécifique. En effet, celles-ci sont caractérisées par leur indépendance face aux signaux régulateurs de leur prolifération, leur capacité à proliférer de manière excessive et leur indifférence face aux signaux apoptotiques. Dans ce contexte, la thérapie génique permet d'introduire un gène « suicide » pour déclencher la mort cellulaire en induisant l'apoptose.

L'induction du mécanisme d'apoptose repose sur la conversion de prodrogues non-toxiques en molécules cytotoxiques dans des cellules cibles, la tumeur et/ou le micro-environnement immédiat (Wang *et al.*, 2016; Uludag *et al.*, 2019). Les vecteurs viraux sont utilisés en thérapie génique des cancers pour introduire le transgène responsable de l'expression d'une enzyme capable de convertir une prodrogue administrée en molécule toxique pour les cellules cancéreuses. Les exemples les plus connus sont ceux de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex de type-1, associée

au ganciclovir (HSV-tk/GCV) ou de la cytosine désaminase associée au 5-fluorocytosine (5-FC). Chacune de ces enzymes convertit son substrat en produit intermédiaire qui est pris en charge par les enzymes endogènes pour le transformer en molécules cytotoxiques induisant l'apoptose. Des résultats précliniques et cliniques ont déjà été obtenus avec le couple HSV-tk/GCV pour traiter certains cancers (Wang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016). La cytosine désaminase a prouvé son efficacité dans le cadre de gliomes, de cancers des gaines nerveuses et du sein (Kang *et al.*, 2012; Mizrak *et al.*, 2013).

Toujours dans le contexte des cancers, la mort des cellules cancéreuses peut être induite par la surexpression de protéines pro-apoptotiques comme la protéine BAX ou du *human tumor necrosis factor α -related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). La protéine BAX est un membre pro-apoptotique de la famille BCL-2, responsable de l'activation de la signalisation des caspases par la libération de molécules apoptotiques tel que le cytochrome C. La surexpression de BAX conduit les cellules vers la voie apoptotique. Son efficacité a été prouvée dans plusieurs types cellulaires dérivés de la prostate et du cerveau (Huh *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2001). Lorsque le TRAIL, membre de la famille des cytokines TNF, s'homodimérise, il induit l'apoptose en se liant aux récepteurs de mort cellulaire localisés à la surface cellulaire. Les TRAILS sont cytotoxiques mais uniquement dans les cellules tumorales. Cette caractéristique est un point fort pour les applications cliniques qui permettraient de cibler divers types de tumeurs sans altérer les cellules saines (Perlstein *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015).

L'addition de gènes est également utilisée pour induire ou augmenter la réponse immunitaire notamment dans le cadre de cancers ou de certaines maladies infectieuses. C'est le principe des vaccins à base d'acides nucléiques. Concrètement, la séquence ADN ou ARN codante d'un antigène cible est administrée par voie cutanée, sous-cutanée ou de manière intramusculaire afin de transfecter les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) comme les cellules de Langerhans. D'autres cellules comme les kératinocytes ou les myocytes peuvent également être transfectées et produire l'antigène. Dans ce cas, les APCs vont reconnaître l'antigène à partir de corps apoptotiques ou nécrotiques ou encore d'exosomes provenant des cellules transfectées. Une fois que les APCs ont assimilé l'antigène, de manière directe ou indirecte, elles migrent vers les nœuds lymphatiques pour présenter l'antigène aux cellules T naïves et induire une réponse immune spécifique dirigée contre l'antigène (figure 3) (Hager *et al.*, 2020).

L'addition de gènes est employée pour des thérapies à l'interface entre la thérapie génique et la thérapie cellulaire. Ces stratégies thérapeutiques reposent sur le prélèvement de lymphocytes T à partir du patient, isolés puis modifiés génétiquement pour exprimer un récepteur chimérique d'antigène (CAR). Deux produits thérapeutiques de ce type sont déjà commercialisés KYMRIATM et YESCARTATM pour le traitement d'enfants en échec thérapeutique d'une leucémie lymphoïde aiguë et pour le traitement des lymphomes non hodgkiniens agressifs chez l'adulte, respectivement (Catros, 2019).

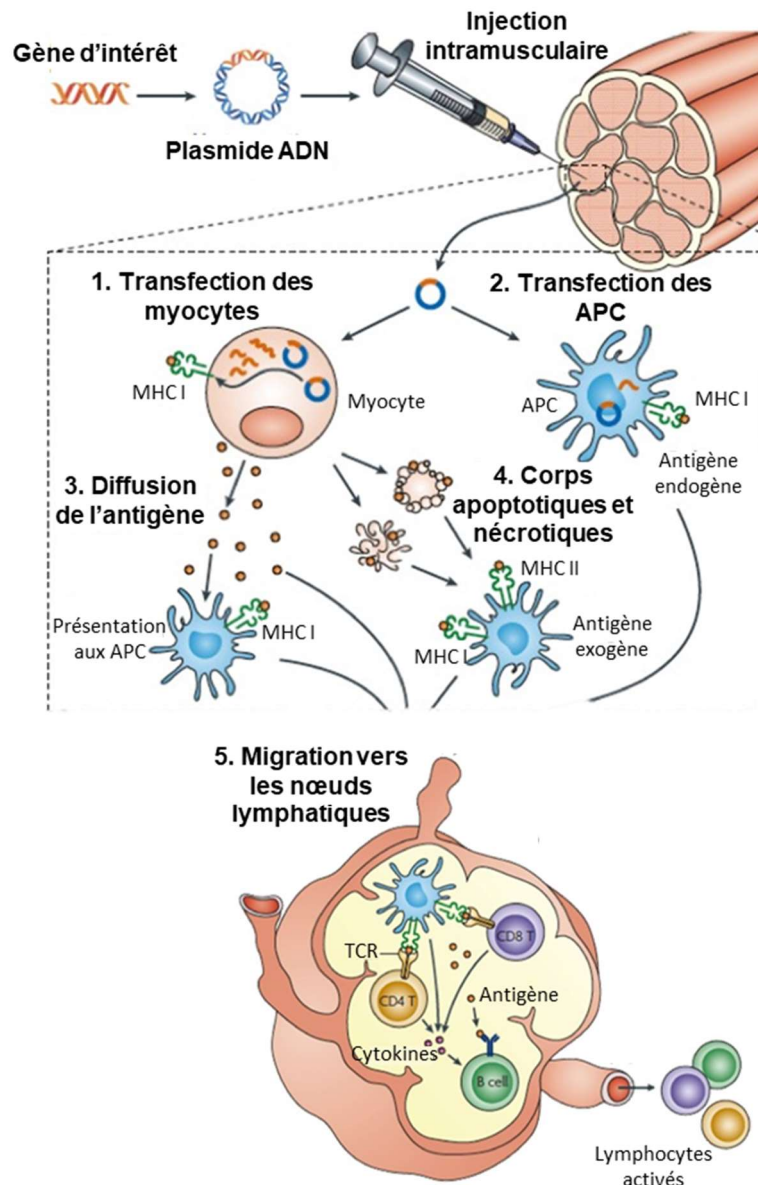


Figure 3 : Exemple du mode d'action des vaccins à ADN. Le gène d'intérêt codant pour une séquence antigénique est inséré dans un plasmide. L'injection intramusculaire du transgène permet la transfection des cellules présentatrices d'antigènes (APCs) ou des myocytes dans le but de leur faire exprimer la protéine ou le peptide antigénique. Les APCs jouent un rôle majeur dans l'induction de l'immunité par les vaccins ADN en présentant l'antigène par le complexe MHC I soit après leur transfection directe, soit après la reconnaissance de corps apoptotiques ou nécrotiques des cellules transfectées. Les APC présentent également l'antigène par le complexe MHC II. Les APCs chargées d'antigènes migrent vers les nœuds lymphatiques et présentent le peptide antigénique aux cellules T naïves en combinaison avec des molécules costimulatrices. Ce deuxième signal permet d'initier la réponse immunitaire par les LT ainsi que leur expansion. Les cellules T helper activées sécrètent des cytokines durant leur interaction avec les cellules B, provoquant ainsi l'activation des cellules B. Finalement, cette procédure permet l'induction d'une réponse cellulaire et humorale par l'activation des cellules T CD4⁺ et des cellules cytotoxiques CD8⁺. Figure adaptée de (Kutzler et Weiner, 2008).

1.3.2 Inhibition ciblée de l'expression génique

Au contraire, lorsqu'un gène est surexprimé, les acides nucléiques introduits dans les cellules visent à dégrader ou inhiber la synthèse de protéine. Dans ce cas, ce sont des oligonucléotides ADN ou ARN synthétiques d'une vingtaine de nucléotides, simple ou double brin, qui agissent au niveau des ARNm cibles conduisant ainsi à leur dégradation ou au blocage de la traduction. Ceux sont des oligonucléotides antisens (ASOs), des siARN ou des miARN (Merienne et Déglon, 2015; Uludag *et al.*, 2019).

Les oligonucléotides antisens sont des séquences ADN ou ARN, simple brin, de petite taille et complémentaires d'un ARNm cible. La maturation et la traduction des ARNm sont interrompues car l'hétéroduplexe ASO-ARNm est dégradé par la RNase H (Bennett et Swayze, 2010). La synthèse des ASOs implique des modifications chimiques qui diminuent leur toxicité et augmentent leur résistance aux nucléases, leur efficacité et leur demi-vie. Les modifications de types 2'-O-methyl (2'-O-me), 2'-O-methoxyethyl (2'-O-MEO) et gapmers sont les plus employées pour améliorer les ASOs. Les *peptides nucleic acid* (PNA), *locked nucleic acid* (LNA) et les oligomères morpholino phosphoroamidate (PMO) sont des analogues de nucléotides modifiés au niveau du sucre. Ces modifications améliorent la pénétration dans la cellule, l'affinité d'hybridation, la stabilité et la résistance aux nucléases (Bennett et Swayze, 2010) (figure 4). L'étude de ces oligonucléotides antisens est orientée dans le contexte des cancers dans le but d'inhiber l'expression des gènes responsables de la croissance tumorale.

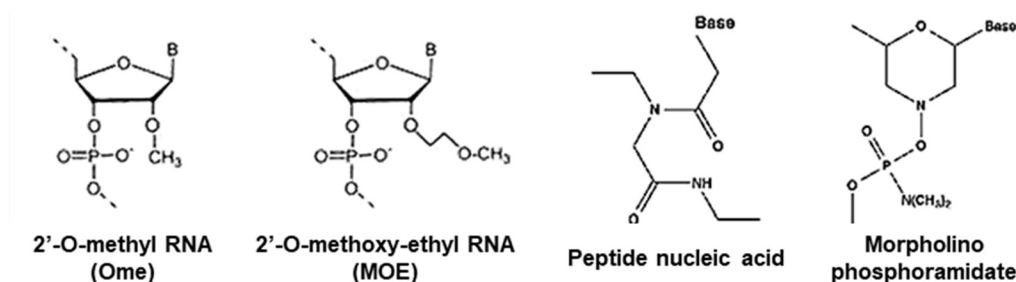


Figure 4 : Les principaux analogues d'acides nucléiques utilisés pour la synthèse des oligonucléotides antisens.

Les siARN sont des ARN double brin, de 20 à 24 pb qui interviennent dans la dégradation des ARNm cibles en recrutant le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) par le biais du brin anti-sens (Lam *et al.*, 2015) (figure 5). La stabilité et l'efficacité des siARN sont améliorées lorsque des modifications 2'-OMe ou de leur squelette sont incorporées lors de leur synthèse.

Les miARN correspondent à des ARN non codant, transcrits à partir de plusieurs loci du génome. Ces gènes codent pour des long ARNs structurés en épingle à cheveux qui sont ensuite pris en charge par la RNase III pour former des duplexes de 15-22 nucléotides composés d'un brin guide et d'un brin passager (Lam *et al.*, 2015). Les miARN sont utilisés en thérapie génique pour influencer la traduction des ARNm cibles en bloquant ou en induisant leur dégradation (figure 5). Les oligonucléotides de petite taille, comme les miRNA, peuvent être utilisés tel quel ou bien être exprimés à partir d'une séquence codante pour les produire *in situ*.

Des séquences artificielles de petite taille composées d'ADN ou d'ARN simple brin, appelées aptamères, sont également synthétisées pour inhiber l'expression d'un gène de manière ciblée (figure 5). Ces séquences sont caractérisées par une structure

secondaire et tertiaire et sont capables de reconnaître un large panel de cibles tels que des acides aminés, des drogues, des protéines ou des cellules. Ces dernières années, des études autour des aptamères ont été menées afin de tirer profit de leurs avantages (petite taille, forte affinité, non-immunogénicité, modifications simples) pour en faire des outils thérapeutiques (Yang *et al.*, 2018).

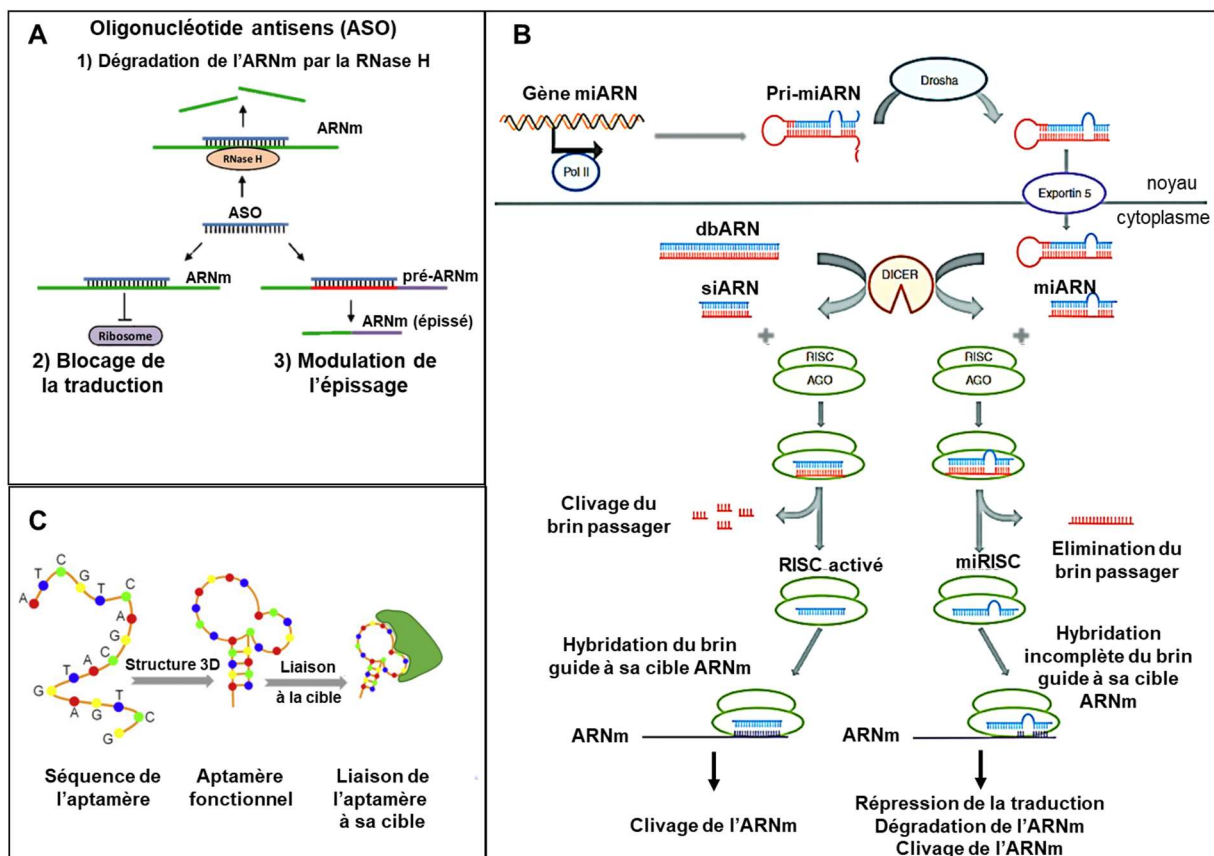


Figure 5 : Les stratégies d'inhibition de gènes. (A) les oligonucléotides antisens (ASOs) répriment l'expression génique par la dégradation des ARNm par la RNase H (1), en s'hybridant sur le site de liaison des ribosomes (2) ou en régulant l'épissage (3). (B) Une fois dans la cellule, les ARNs double brin sont reconnus par Dicer, puis pris en charge par le complexe RISC qui entraîne la séparation des deux brins d'ARN, un brin est dégradé et l'autre s'associe à RISC pour provoquer le clivage de l'ARN complémentaire cible. (C) La séquence oligonucléotidique de l'aptamère est choisie dans le but de former des structures 3D fonctionnelles en se liant à leurs cibles avec une spécificité et une affinité élevée. Figure adaptée de (Rossor *et al.*, 2018) et de (Yang *et al.*, 2018).

1.3.3 L'édition de génome

L'une des méthodes pour rétablir l'expression d'une protéine mutée est de corriger la mutation de manière ciblée, directement au niveau génomique grâce à des nucléases, ou au niveau de l'épissage de son ARNm par la méthode du saut d'exon.

La méthode de saut d'exon concerne les mutations localisées aux alentours d'un exon (figure 6). Les agents thérapeutiques mis en jeu dans le saut d'exon sont des oligonucléotides antisens (ASOs) d'une vingtaine de nucléotides synthétisés chimiquement et capables de s'hybrider avec la séquence complémentaire cible au niveau de l'ARN pré-messager. Ils s'hybrident à la frontière exon-intron ou au niveau des ESE (*exonic splicing enhancers*) pour réguler l'épissage et corriger le cadre de lecture (Yokota *et al.*, 2007; Nakamura, 2017). L'hybridation de l'oligonucléotide sur sa cible module l'étape d'épissage pour aboutir à une protéine tronquée mais fonctionnelle.

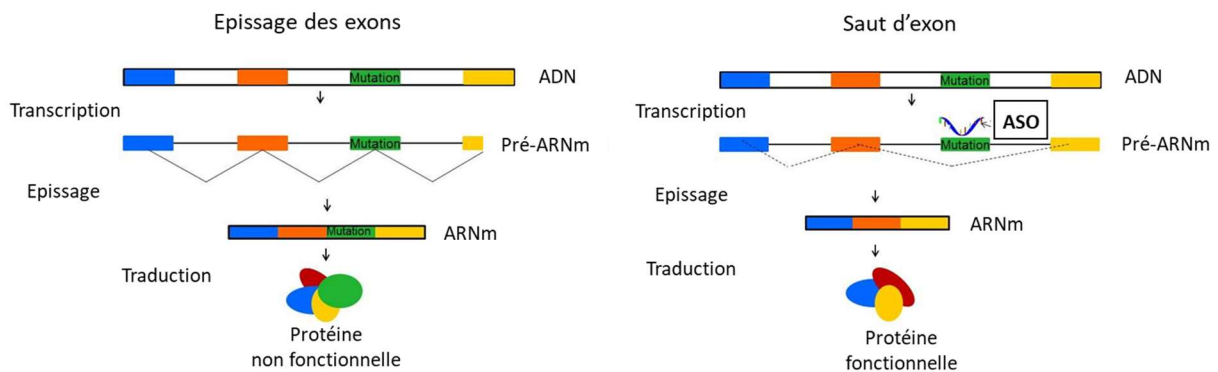


Figure 6 : Schéma du mécanisme de saut d'exon. (A) Les pré-ARNm deviennent des ARNm matures après l'épissage des introns. Lorsqu'une mutation est présente au sein d'un exon, elle peut alors se retrouver dans la protéine finale et la rendre non-fonctionnelle. (B) L'utilisation d'ASOs empêche l'intégration de l'exon muté dans la séquence de l'ARNm mature. Par conséquent, la protéine finale est plus courte mais fonctionnelle. D'après <https://weekly.biotechprimer.com/dmd-makes-the-cut>.

L'édition de génome permet des modifications de petite (1 à 10 pb) ou de grande taille (> 20 pb) du génome de manière précise. Il existe deux types d'approches d'édition génomique. La première approche repose sur des coupures double-brin de l'ADN à un locus cible suivi ou non par l'introduction d'un ADN exogène. La seconde approche modifie le génome sans coupure double-brin de l'ADN en introduisant des molécules formant des triples hélices ou des molécules combinant une activité enzymatique désaminase avec une endonucléase dont le site catalytique est altéré.

L'approche d'édition de génome avec coupure double brin de l'ADN exploite les capacités d'endonucléases à reconnaître des séquences dans le génome et réaliser des coupures doubles brins de manière spécifique, ainsi que les mécanismes de réparation de l'ADN de la cellule hôte pour combler ces coupures (figure 7). Les méganucléases, les nucléases à doigts de zinc (ZFNs), les systèmes TALEN ou encore le système CRISPR/Cas9 sont des outils développés pour opérer des modifications ciblées du génome. Celles-ci visent à inactiver un gène par recombinaison non homologues des extrémités (NHEJ) ou à corriger et à remplacer un gène par recombinaison homologues (HR) (Wang et Gao, 2014).

Les méganucléases sont des endonucléases capables de reconnaître une séquence spécifique de 12 à 45 pb.

Les ZFN sont des protéines chimériques contenant 3 à 5 domaines de liaison à l'ADN et un domaine FokI. Chaque domaine à doigt de zinc est spécifique de la séquence cible. L'activité catalytique a lieu quand la ZFN est sous forme de dimère. Deux ZFN sont

nécessaires pour cibler une séquence ADN séparée par une courte séquence de reconnaissance de l'autre ZFN (Kim *et al.*, 1996b; Urnov *et al.*, 2010).

Le système TALENs est originaire d'effecteurs bactériens, appelés TALEs. Ce système est composé d'un domaine de liaison à l'ADN, d'un domaine correspondant à l'endonuclease FokI et des protéines TALE qui peuvent être modifiées selon la séquence cible. Le système TALEN contient deux domaines différents, un domaine de liaison à l'ADN issu des protéines TALE modifiable selon la séquence cible et un domaine FokI portant l'activité de l'endonuclease. Les TALENs agissent uniquement sous forme de dimère. Par conséquent, il est nécessaire de synthétiser deux TALENs pour cibler une séquence ADN particulière (Yin *et al.*, 2017).

Le système CRISPR/Cas9 dérive d'un système d'immunité adaptative des prokaryotes qui agit comme mécanisme de défense contre certaines infections virales. CRISPR/Cas9 est un complexe composé de protéines et de molécules d'ARNs qui guident l'endonuclease Cas9 vers sa cible ADN pour la cliver (Jinek *et al.*, 2012). Ce système d'édition de génome est plus facile à optimiser que les systèmes précédents car seules les séquences ARNs doivent être modifiées en fonction de la séquence ADN cible.

A la suite de la cassure double brin de l'ADN génomique provoquée par les différents outils d'édition, deux systèmes de réparation de l'ADN peuvent rentrer en jeu. Le premier mécanisme de réparation se fait de manière non homologue par la jonction des extrémités libres (NHEJ). Le second mécanisme, quant à lui, repose sur des mécanismes de recombinaison homologue entre l'ADN génomique et un ADN donneur exogène (HR) (Pavlovic *et al.*, 2020).

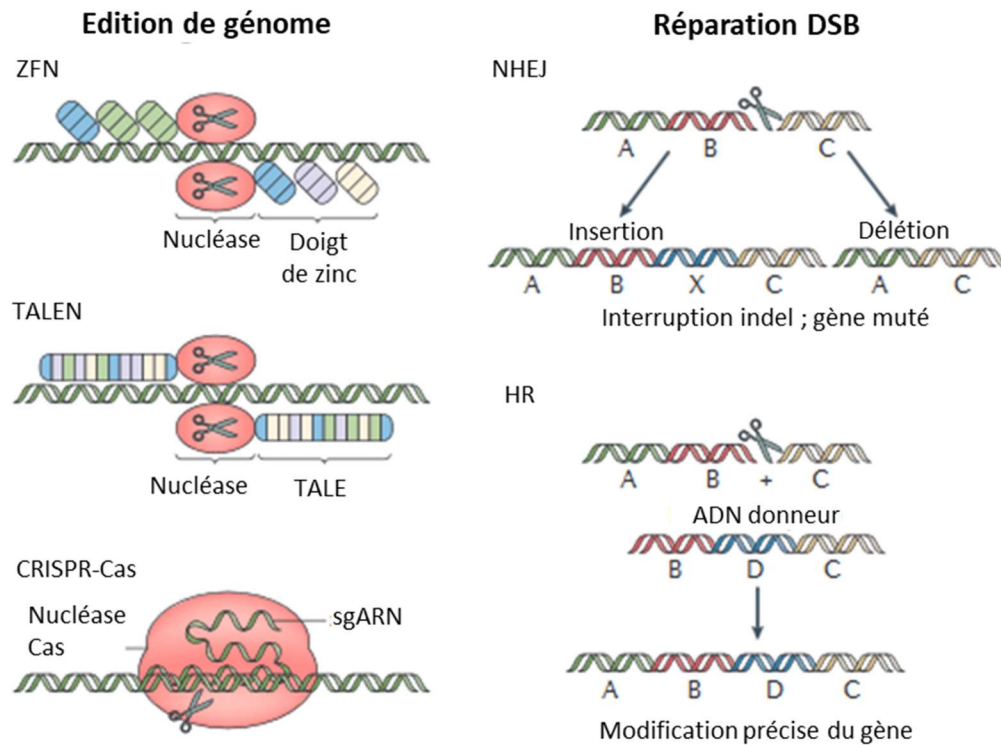


Figure 7 : Les mécanismes d'édition de génome et de réparation des cassures double brin dans l'ADN. Les nucléases à doigt de zinc (ZFN), les nucléases associées à des activateurs de la transcription (TALEN) et les systèmes CRISPR-Cas induisent des cassures double brin (DSB) dans l'ADN. La réparation par jonction d'extrémité non-homologue (NHEJ) ou la réparation par recombinaison homologue (HDR) sont les deux mécanismes de réparations permettant l'édition de génome. La réparation NHEJ interrompt le gène cible en créant des mutations de type insertion ou délétion. La réparation HDR permet d'insérer une séquence d'ADN dans la région cible du génome engendrant potentiellement des insertions, des délétions dans la séquence génomique. sgARN : ARN guide simple brin. Figure adaptée de (Yin *et al.*, 2017).

Cependant, des insertions ou des délétions de nucléotides peuvent apparaître à la suite de l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN par le système CRISPR/Cas9. Afin d'éviter ces « indels », de nouveaux systèmes d'édition de génome ont été développés (Zeballos et Gaj, 2020). Ces systèmes conservent les caractéristiques de programmation et de flexibilité du système CRISPR d'origine auxquelles sont ajoutées des capacités supplémentaires d'édition de génome sans avoir recours à une cassure double brin de l'ADN (figure 8). Ces nouvelles stratégies sont l'édition de bases et la « *prime edition* ».

La stratégie d'édition de base s'appuie sur une Cas9 nickase, qui est un variant de la Cas9 responsable des coupures simple brin, appelée caspase nickase ou nCas9, associée à une désaminase spécifique des cytosines (CBE : *cytosine base editor*) ou des adénosines (ABE). L'emploi des désaminases permet de faciliter leur conversion en thymine ou en guanosine, respectivement, lors de la réplication de l'ADN ou lorsqu'un mécanisme de réparation s'enclenche. Le système ABE a été étudié dans un modèle murin de la dystrophie musculaire de Duchenne en vue d'éliminer un codon stop prématuré par l'édition d'une adénosine en guanine, A>G. Les résultats *in vivo* ont montré que la délivrance du système ABE permet de restaurer l'expression de la dystrophine dans ce modèle murin. Cependant, cette stratégie est limitée par la nécessité d'employer deux AAV recombinants pour introduire l'ensemble du système dans une même cellule (Zeballos et Gaj, 2020).

La stratégie de « *prime editing* » met en jeu une nCas9 associée à un domaine de reverse transcriptase et à un « *prime editing guide RNA* » (pegRNA) pour cibler la séquence génomique d'intérêt et servir de matrice pour la rétro-transcription, lors de la réparation de l'ADN. Cette stratégie permet d'augmenter la flexibilité du système CRISPR/Cas9 et permet de corriger une grande variété de mutations par l'insertion ou la suppression de séquences. La preuve de concept a été réalisée en culture cellulaire *in vitro*, dans le contexte de maladie de Tay-Sachs, une maladie génétique lysosomale (Zeballos et Gaj, 2020). Ce système nécessite encore des optimisations car l'action de la reverse transcriptase peut induire des effets hors cible et de la même façon que la stratégie d'édition de bases, le complexe de « *prime editing* » nécessite deux vecteurs AAV pour être transporté efficacement (Zeballos et Gaj, 2020).

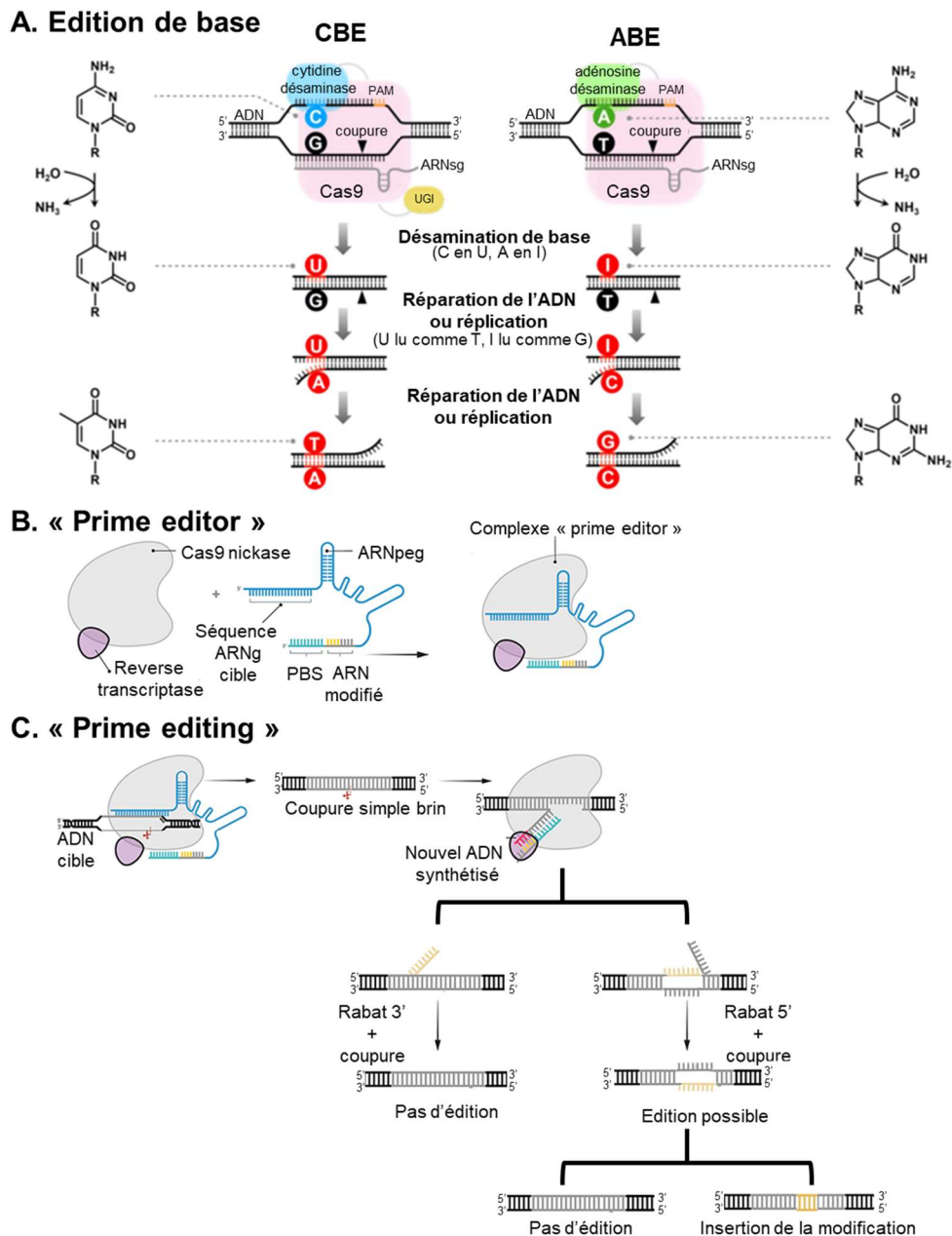


Figure 8 : Mode d'action des systèmes d'édition de bases et de « prime editing ». (A) Le principe des systèmes d'édition de bases CBE et ABE repose sur l'emploi d'une caspase 9 nickase fusionnée avec une cytosine désaminase ou une adénine désaminase et d'un brin ARN guide, noté ARNsg. Le complexe Cas9 :ARNsg:ADN donne un ADN simple brin qui devient le substrat de la désaminase. Les conversions chimiques des bases sont représentées de chaque côté. La Cas9 nickase clive le brin non-édité et crée un mismatch U•G ou I•T qui sera converti en U•A ou I•C lors de la réplication ou de la réparation de l'ADN. L'inhibiteur de l'uracile glycosylase (UGI) protège les uraciles (U) générées par les *mismatch*, des uracile glycosylases endogènes. Les motifs adjacents au proto-espaceur (PAM) sont essentiels à la reconnaissance de la séquence cible. (B) Le système « prime editor » met en jeu un ARN guide, appelé ARNpeg, et d'une protéine de fusion composée d'une caspase 9 nickase fusionnée avec une « reverse transcriptase ». (C) La Cas9 digère l'ADN cible et le domaine RT polymérise l'ADN sur le brin coupé grâce à la séquence de l'ARNpeg.

Tableau 1 : Les principales stratégies en thérapie génique

Stratégies	Méthodes	Outils moléculaires	Exemples de références
Addition de gènes	Introduction d'une copie fonctionnelle du gène cible	Copie fonctionnelle du gène cible	(Cavazzana-Calvo et al., 2000)
	Induction apoptose	Expression d'enzyme de conversion d'une prodrogue en molécules toxiques	(Wang et al., 2016; Uludag et al., 2019)
		Surexpression d'une protéine pro-apoptotique	(Li et al., 2001; Huang et al., 2010) (Huh et al., 2001; Wang et al., 2016) (Wang et al., 2015) (Perlstein et al., 2013)
		Stimulation des récepteurs de mort cellulaire	(Wang et al., 2016) (Rosenberg et Restifo, 2015)
	Induction du système immunitaire	Stimulation du système immunitaire	(Kutzler et Weiner, 2008; Hager et al., 2020) (Catros, 2019)
Inhibition ciblée de l'expression génique	Ciblage des pré-ARNm et ARNm	Oligonucléotides antisens (ASO)	(Southwell et al., 2012)
		ARNi (small-interfering RNA)	(Yu et al., 2012)
	Interruption de gène	Méganucléases, Nucléases à doigts de zinc, TALENs, CRISPR/Cas9	(Tebas et al., 2014)
Correction de mutations ciblées	Saut d'exons	oligonucléotides	(Goemans et al., 2016), (Mendell et al., 2016) (Aartsma-Rus et al., 2017)
	Edition de génome	Méganucléases	(Rouet et al., 1994)
		Nucléases à doigt de zinc	(Kim et al., 1996a; Porteus et Carroll, 2005) (Klug, 2010) (Bibikova et al., 2003) (Porteus et Baltimore, 2003) (Urnov et al., 2005)
		TALENs	(Yin et al., 2017)
		CRISPR/Cas9	(Jinek et al., 2012)

1.4 Les vecteurs viraux

D'après le journal *Journal of Gene Medicine*, 3180 essais cliniques ont été recensés en 2021 à travers le monde, dont 58,3% en Amérique, 20,2% en Europe et 13,1% en Asie. En 2019, les deux tiers (67,4%) des essais cliniques concernaient les cancers, 11,6% étaient dédiés aux maladies monogéniques, 5,8% aux les maladies infectieuses et 5,8% aux maladies cardiovasculaires (figure 9). Le nombre d'essais cliniques s'accroît chaque année. En effet, depuis 2012 le nombre d'essais cliniques a

doublé grâce à l'amélioration de la production des lots de virus recombinants consacrés aux essais cliniques.

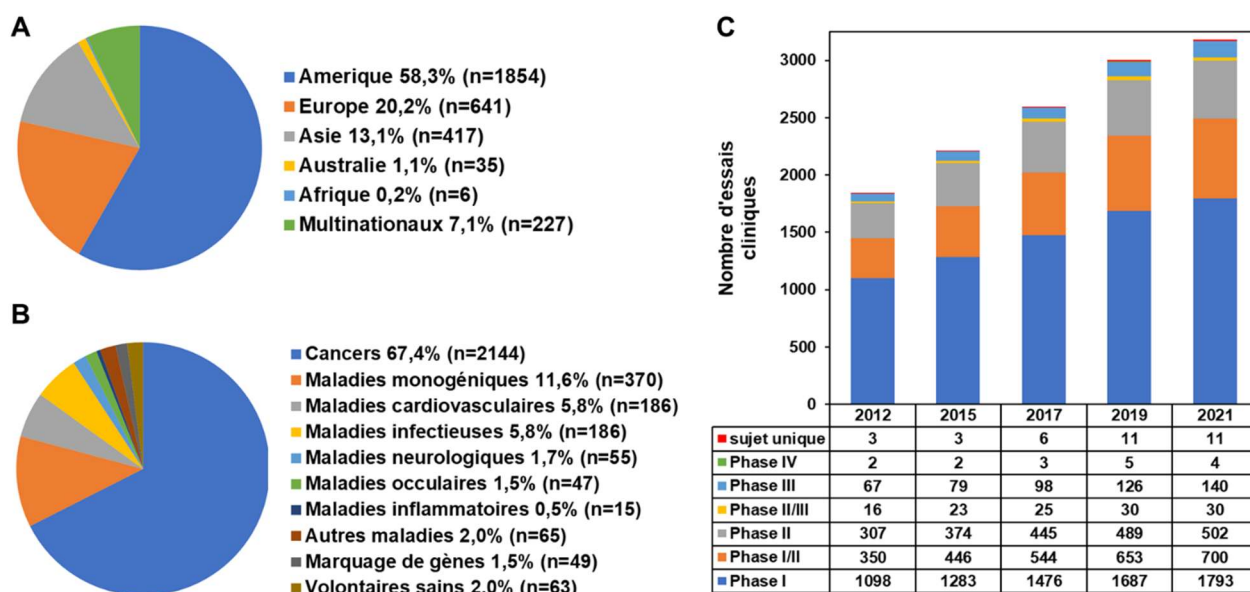


Figure 9 : Les essais cliniques en thérapie génique. (A) Distribution géographique des essais cliniques (par continent). (B) Distribution des essais cliniques en fonction de la pathologie. (C) Distribution des essais cliniques selon leur avancée depuis l'année 2012.

Les vecteurs viraux ou virus recombinants sont les plus utilisés (80 %) mais leur type a évolué au cours des années. Les adénovirus (17,5%) et les rétrovirus (16,4%) ont été utilisés aux débuts des essais cliniques, les virus adénoassociés (AAV ; 8%) et les lentivirus (LV ; 10,1%) sont actuellement les deux classes de virus recombinants privilégiées (tableau 2).

Tableau 2 : Evolution de la distribution des vecteurs viraux employés en thérapie génique entre 2012 et 2019

Part des vecteurs viraux en thérapie génique (en %)				
	2012	2017	2019	2021
Adénovirus	23,3	20,5	18,6	17,5
AAV	4,9	7,6	7,9	8
Lentivirus	2,9	7,3	9,9	10,1

Les vecteurs viraux, ou virus recombinants, sont obtenus par le remplacement des séquences virales responsables du cycle d'infection pathogène par le gène thérapeutique et par la conservation des gènes codant des protéines impliquées dans l'assemblage des particules virales (figure 10). Le choix du vecteur viral dépend de plusieurs facteurs intrinsèques à la particule virale comme son tropisme, sa capacité d'empaquetage, son potentiel d'intégration au génome de l'hôte et sa toxicité.

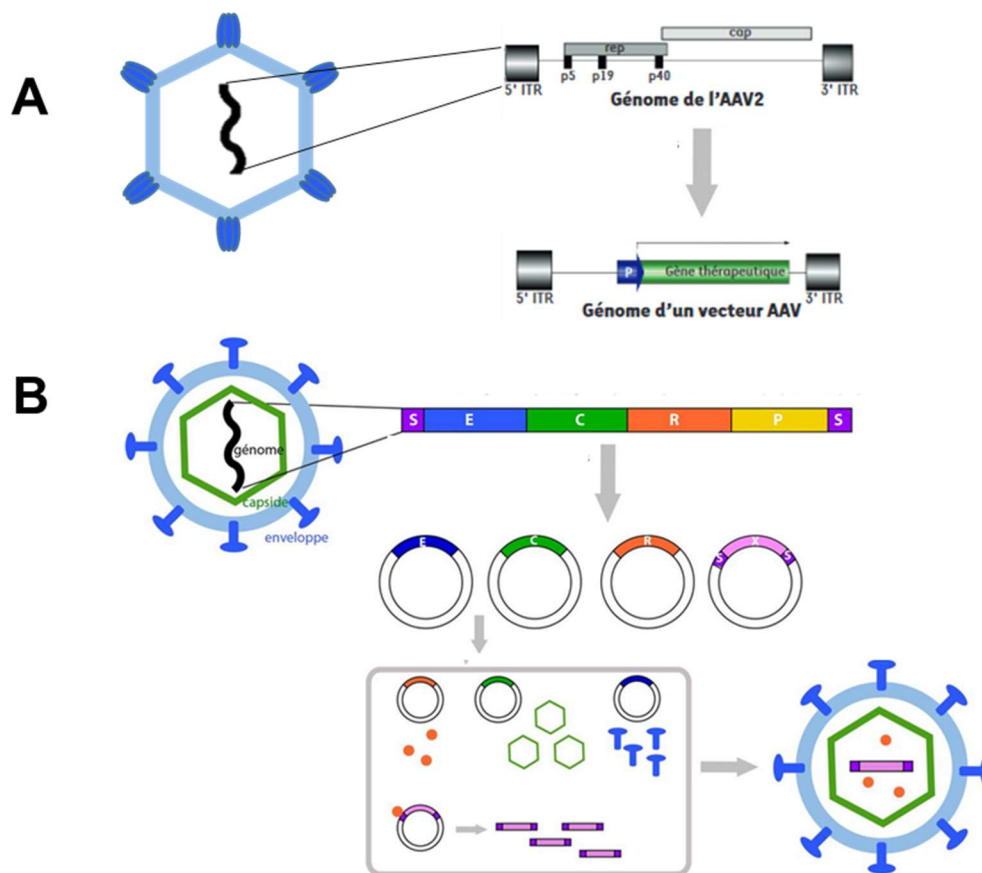


Figure 10 : Représentation des vecteurs adénoassociés et des lentivirus recombinants. (A) Les deux cassettes d'expression virales (*rep* et *cap* responsables de la réplication et de l'encapsidation) des AAV sont remplacées par le transgène thérapeutique placé sous la dépendance de son propre promoteur. Ces éléments sont insérés entre les répétitions terminales inversées (5'ITR et 3'ITR). Le retrait des séquences virales permet d'assurer la biosécurité de ces vecteurs qui ne peuvent pas se multiplier par eux-mêmes. (B) Les lentivirus recombinants sont établis à partir de plasmides indépendants dans lesquelles chaque élément génétique a été isolé. Les gènes pathogènes sont éliminés. Ensuite, les différents plasmides sont cotransfectés dans des cellules en culture dans le but d'obtenir des particules virales contenant uniquement le transgène thérapeutique et les éléments S. E : gène codant les protéines de l'enveloppe, C : gène codant les protéines de la capside, R : éléments de régulation de la réplication, P : gènes pathogènes, S : éléments signal désignant quelle séquence doit être répliquée et empaquetée.

1.4.1 Virus associés aux adénovirus

Les virus associés aux adénovirus sont des virus non enveloppés à ADN simple brin. Il s'agit d'une classe de virus non-pathogène pour l'Homme capable de pénétrer efficacement dans beaucoup de types cellulaires sans engendrer de processus inflammatoires (Bono *et al.*, 2020).

Les vecteurs viraux dérivés des AAV sont obtenus par la substitution quasi-totale de leur génome par le transgène thérapeutique. En effet, l'expression du transgène est réalisée uniquement à partir des ITR, d'une taille de 145 pb (Bleker *et al.*, 2005), qui sont également responsables de la production des vecteurs et de la persistance de l'expression. Les différents sérotypes d'AAV sont caractérisés par différents récepteurs, situés au niveau de leur capsid, responsables de la diversité de leur tropisme. En plus de leur faible immunogénicité, cette diversité de tropisme rend les rAAV attractifs pour des traitements administrés par voie sanguine pouvant cibler différents types cellulaires (Shirley *et al.*, 2020). Cependant, l'inconvénient majeur des rAAV concerne leur petite capacité, inférieure à 5 kpb, pour insérer un gène thérapeutique dans leur génome (tableau 3) (Bono *et al.*, 2020).

1.4.2 Lentivirus

Les lentivirus sont des virus enveloppés à ARN simple brin. Il s'agit d'une classe de virus capable de pénétrer efficacement dans beaucoup de types cellulaires et d'intégrer leur matériel génétique dans le génome de l'hôte (Bono *et al.*, 2020; Shirley *et al.*, 2020). Les lentivirus font partie de la grande famille des *Retroviridae* caractérisés par

leur génome ARN converti en ADN dans les cellules infectées grâce à une enzyme virale appelée reverse transcriptase (Milone et O'Doherty, 2018).

Les lentivirus recombinants sont des vecteurs dérivés du virus d'immunodéficience humain qui est capable de pénétrer dans des cellules en division ou dans des cellules quiescentes (tableau 3) (Shirley *et al.*, 2020). Ces vecteurs viraux sont préférentiellement utilisés *ex vivo* pour modifier génétiquement des cellules souches hématopoïétiques et les lymphocytes T afin de produire des CAR-T pour le traitement de certains cancers comme les lymphomes (Guedan *et al.*, 2018; Shirley *et al.*, 2020).

L'inconvénient majeur des lentivirus recombinants concerne leur potentiel oncogénique lié à leur capacité à s'intégrer dans le génome hôte dans des régions non spécifiques (Bono *et al.*, 2020).

Tableau 3 : Comparaison des vecteurs recombinants associés aux adénovirus et lentiviraux.

	Virus associés aux adénovirus	Lentivirus
Génome	ADN simple brin	ARN simple brin
Taille du génome	5 kb	3 – 9 kb
Capacité d'emballage	4,5 kb	8-9 kb
Transduction	Cellules en division ou quiescentes	Cellules en division ou quiescentes
Interaction avec le génome de l'hôte	Pas d'intégration	Intégration
Expression du transgène	Potentiellement longue durée	Longue durée
Avantages	Non pathogène	Intégration dans le génome hôte
Inconvénients	Faible capacité d'emballage	Faible capacité d'emballage, potentiel oncogénique

1.5 Les succès de la thérapie génique

Les nombreuses études menées depuis plus de trente ans ont prouvé la faisabilité de la thérapie génique dans les modèles animaux et chez l'Homme, au travers de résultats remarquables ciblant des pathologies variées comme des immunodéficiences, des cancers, des myopathies, des atteintes neurologiques, des maladies dermatologiques, ophtalmologiques ou hématologiques. Certaines stratégies se rapprochent des premiers traitements curatifs pour la pathologie étudiée, quand d'autres ont déjà réussi à être commercialisées (Tableaux 4 à 11).

Tableau 4 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies métaboliques.

Pathologies	Gène muté	Avancées cliniques	Produits	TG <i>in vivo</i>	TC <i>ex vivo</i>	Références
Maladie de Crigler-Najjar de type 1	UGTA (UDP-1 peptide glycosyl-transferase A1)	Essai phase I/II en cours (CareCN), injection intraveineuse dans les cellules hépatiques	AAV8 + UGT1A	✓		(Aronson et al., 2019), NCT03466463
Maladie de stockage lysosomal (maladies de Tay-Sachs et Sandhoff)	HEXA ou HEXB	Expression et sécrétion de l'enzyme fonctionnelle dans un modèle murin	Lentivirus + gène Hexa ou Hexb,	✓		(Ornaghi et al., 2020)
Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency (AADC deficiency)	Dopa decarboxylase (DDC)	Amélioration des fonctions motrices et mentales	AAV2-hAADC-2	✓		(Hwu et al., 2012), (Kojima et al., 2019)

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

Tableau 5 : Les succès de la thérapie génique pour les déficits immunitaires sévères

Pathologies	Gène muté	Avancées cliniques	Produits	TG In vivo	TC Ex vivo	Références
Immuno-déficience sévère combinée liée à l'X (X-SCID)	IL2RG	Stratégie efficace et sécurisée	Vecteur rétroviral SIN-LV		✓	(Cavazzana-Calvo et al., 2000; Fisher et al., 2004)
Immunodéficience sévère combine associée à la déficience en adénosine désaminase (ADA-SCID)	ADA	Diminution du taux d'infection sévère sur le long terme, efficace pour restaurer le métabolisme des purines et les fonctions immunes	Strimvelis, cellules CD34+ (cellules souches hématopoïétiques) transduites avec gène + gamma rétrovirus GT		✓	http://www.genetherapynet.com/stimvelis.html
Syndrome de Wiskott Aldrich	WAS	Disparition de l'eczéma sévère et des infections graves	Vecteur lentiviral LV-w1.6WASp, (Généthon)		✓	(Aiuti et al., 2003)
Granulomatose septique chronique liée à l'X	CYBB	Récupération de l'activité oxydase et stable (suivi sur 3 ans)	Cellules souches hématopoïétiques transduites vecteur lentiviral (G1XCGD), OTL-102, Généthon, Orchard Therapeutics,		✓	Afm-telethon.fr (Kohn et al., 2020)

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

Tableau 6 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies neuromusculaires

Pathologies	Gène muté	Avancées cliniques	Produits	TG In vivo	TC Ex vivo	Références
Dystrophie musculaire de la ceinture	α ou δ -sarcoglycane	Bien toléré, apport du gène SGCB, expression de la protéine, diminution de la créatine kinase	vecteur viral AAVrh74, promoteur MHCK7, (MYO-101, Sarepta Therapeutics)	✓		NCT03652259
		Amélioration de la force musculaire, augmentation de la taille des fibres	scAAVrh74.tMCK.hSGCA	✓		NCT01976091 ; (Chicoine et al., 2019)
		Co-injection de deux segments du gène codant la dysferline, Restauration de la force au niveau du diaphragme dans un modèle murin, Pas de toxicité observée chez les primates. Essai clinique en cours	rAAVrh74.MHCK7.DYSF.DV	✓		NCT02710500 ; (Sondergaard et al., 2015)
Myopathie myotubulaire	Myotubularine (MTM1)	Essai Clinique en phase I/II, amélioration des capacités respiratoires, du maintien postural et de la marche	AT132 (AAV8 + gène MTM1)	✓		Essai ASPIRO, Ana Buj-Bello à Genethon (Évry) (Dupont et al., 2019)
Amyotrophie spinale infantile	SMN1 SMN2	AMM par EMA en 2017, amélioration des fonctions motrices des patients	oligonucléotide antisens (SPINRAZA® (Nusinersen))	✓		AFM-téléthon.fr (Pane et al., 2018) (Strauss et al., 2018)
		AMM par FDA en 2020, amélioration des fonctions motrices	Risdiplam (voie orale)	✓		(Sturm et al., 2019)
		AMM par FDA en 2019	Gène SMN1 + AAV (Zolgensma)	✓		(Al-Zhaidy et al., 2019)
Dystrophie musculaire de Duchenne	Dystrophine (DMD)	Restauration de l'expression de la dystrophine et stabilisation des symptômes chez le chien Essais Clinique	AAV, microdystrophine	✓		(Le Guiner et al., 2017)

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

Tableau 7 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies neurodégénératives

Pathologies	Gène muté	Avancées cliniques	Produits	TG In vivo	TC Ex vivo	Références
Leucodystrophies (leucodystrophie métachromatique)	arysulfatase A (ARSA)	Expression stable de l'enzyme, stabilisation de la pathologie au stade précoce	Greffe de cellules souches modifiées par un LV + copie de gène ARSA		✓	NCT01560182 (Biffi et al., 2013)
Adrénoleuco- dystrophie	ABCD1	Essai clinique, expression de la protéine ALD, symptômes cliniques minimes, résultats encourageants	CD34+ transduites avec un lentivirus		✓	(Eichler et al., 2017)
Maladie de Sanfilippo (mucopoly- saccharidoses type III B)	NAGLU	Injection intracérébrale multi-site, production durable de l'enzyme	AAV2.5 + gène NAGLU	✓		(Tardieu et al., 2017)
Maladie de Parkinson	Tyrosine hydroxylase, cyclo-hydroxylase 1, décarboxylase d'acides aminés	Bien toléré, amélioration des fonctions motrices chez tous les patients	ProSavin ® Lentivirus avec 3 gènes nécessaire à la synthèse de la dopamine	✓		(Palfi et al., 2014)
Maladie d'Alzheimer	Nerve Growth Factor (NGF)	Ralentissement de la pathologie,	Implantation de fibroblastes autologues modifiés pour exprimer NGF humain		✓	(Tuszynski et al., 2005)

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

Tableau 8 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies hématologiques

Pathologies	Gène muté	Avancées cliniques	Produits	TG In vivo	TC Ex vivo	Références
Hémophilie A	Facteur VIII	Disparition des symptômes, par injection unique	AAV-Facteur VIII	✓		Inserm.fr (Rangarajan et al., 2017)
Hémophilie B	Factor IX	Disparition des symptômes, par injection unique	AAV-Facteur IX	✓		Inserm.fr (George et al., 2017)
Drépanocytose	β-globine	Rémission complète (suivi sur 15 mois), essai clinique en phase I/II	Lentivirus + gène β-globine		✓	Inserm.fr (Ribeil et al., 2017)
β-Thalassémie	β-globine	Réduction ou élimination des besoins de transfusion, victoire 2018,	Vecteur lentiviral « Lentiglobin »		✓	Inserm.fr, afm-téléthon.fr, (Thompson et al., 2018)

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

Tableau 9 : Les succès de la thérapie génique pour les maladies dermatologiques

Pathologies	Gène muté	Avancées cliniques	Produits	TG In vivo	TC Ex vivo	Références
Épidermolyse bulleuse jonctionnelle	Sous unité α, β ou γ de la laminine 5	Expression de la protéine dans les kératinocytes transduits, greffe parfaite, épiderme normal un an après la greffe	ADNc LAMB3 (branche β3 de la laminine 5), rétrovirus (virus de Moloney)		✓	(Mavilio et al., 2006)
Épidermolyse bulleuse dystrophique	Collagène VII (COL7A1)	• Greffage d'équivalents de peau corrigés • Expression du collagène VII et restauration de l'adhérence entre le derme et l'épiderme chez les souris Essai clinique en cours	SIN-COL7A1		✓	(Titeux et al., 2010) NCT04186650 (Lwin et al., 2019) NCT02493816

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

Tableau 10: Les succès de la thérapie génique pour les maladies ophtalmiques

Pathologies	Gène muté	Avancées cliniques	Produits	TG In vivo	TC Ex vivo	Références
Amaurose congénitale de Leber	RPE65 enzyme	Médicament commercialisé	AAV + gène RPE65 (Luxturna®)	✓		(Cideciyan, 2010) (Pierce et Bennett, 2015) (Maguire et al., 2019) (Gao et al., 2020)
Neuropathie optique de Leber	MT-ND4, MT-ND6 et MT-ND1, et moins souvent MT-ND2, MT-ND5, MT-ATP6, MT-CO1, MT-CO3 et MT-CYB. Gène mitochondrial	Amélioration de la vision durable et cliniquement significative (acuité et sensibilité aux contrastes),	AAV2-ND4 (GenSight Biologics, France)	✓		(Bouquet et al., 2019)
Maladie de Stargardt	ABCA4	Essai Clinique en phase I/II	SAR422459 (Sanofi USA et France)	✓		NCT01367444
		La protéine ABCA4 est exprimée chez les souris Abca4-/- à un niveau suffisant pour améliorer le phénotype	Injection subrétinale d'un système AAV double + 2 segments du gène codant ABCA4	✓		(McClements et al., 2019)

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

Tableau 11: Les succès de la thérapie génique pour les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers

Pathologies	Gène	Avancées cliniques	Produits	TG In vivo	TC Ex vivo	Références
Resténose	Serca2	Injection intra-coronaire bons résultats chez animal	AAV1 + Serca2	✓		(Samuel et al., 2018), (Hadri et al., 2010)
VIH	CCR5	Essais cliniques a montré la tolérance au traitement	Cellules T CD4 modifiées avec ZFN gène CCR5		✓	(Tebas et al., 2014), NCT00842634 ; NCT03666871
Leucémies de type B	CD19	Médicament commercialisé	Kymriah (médicaments)		✓	(Neelapu et al., 2017) ; (Kochenderfer et al., 2009)
		Médicament commercialisé	(CAR-T cells, Yescarta)		✓	(Schuster et al., 2018); (Schuster et al., 2020)
Mélanomes	GM-CSF	Médicament commercialisé	Virus herpès simplex + GM-CSF (Imlygic (médicament)	✓		(Chesney et al., 2018)

TG : thérapie génique ; TC : thérapie cellulaire

En 2003, la Chine est le premier pays à utiliser Gendicine™ (développé par Sibiono Gene Tech Co.), un produit de thérapie génique pour le traitement de cancer « tête et cou ». Il s'agit d'un adénovirus dans lequel le gène viral E1 a été remplacé par l'ADNc de la protéine p53 humain (Kerstin B. Kaufmann, 2013).

C'est seulement en 2012, huit ans plus tard, que l'agence européenne de médecine (EMA) autorise la mise sur le marché du produit de thérapie génique appelé Glybera (développé par Amsterdam Molecular Therapeutics) pour le traitement de personnes adultes souffrant d'un déficit familial en lipoprotéine lipase et de crises de pancréatites sévères ou multiples malgré un régime pauvre en lipides. Il s'agit d'un AAV construit de manière à insérer le gène codant la lipoprotéine lipase dans les tissus musculaires (Miller, 2012; Ylä-Herttuala, 2012). Depuis, plusieurs autres produits sont apparus sur le marché asiatique, européen et américain (tableau 12).

Tableau 12 : Produits de thérapie génique possédant une autorisation de mise sur le marché

Produits	Région, Année	Composition	Pathologie
Gendicine	Chine, 2003	Adénovirus + gène p53	Cancer tête et cou
Glybera*	Europe, 2012	AAV + gène de la lipoprotéine lipase	Déficiencia en lipoprotéine lipase
Imlygic	USA et Europe, 2015	Virus oncolytique + protéine immunostimulante	Mélanomes non résécables
Kymriah	USA, 2017	Cellules T autologues modifiées (CAR T cells)	Lymphome B
Luxturna	USA, 2017	AAV + gène RPE65	Amaurose congénitale de Leber
Oncorine	Chine, 2005	Adénovirus oncolytique + chimiothérapie	Cancers nasopharyngés réfractaires
Strimvelis	Europe, 2016	Thérapie génique + cellulaire : CD34+ autologues + gène ADA	ADA-SCID
Yescarta	USA, 2017	Cellules T autologues modifiées (CAR T cells)	Lymphome B
Zalmoxis	Europe, 2016	Cellules T allogéniques modifiées avec un rétrovirus	Rejet de greffe
Zolgensma	USA, 2019	Oligonucléotide antisens pour le gène SMN2	Amyotrophie spinale liée à SMN2
Zynteglo	Europe, 2019	Cellules CD35+ autologues transduites avec le gène β -globine	β -thalassémie

* Retiré du marché par faute de demande

Les avancées de la thérapie génique sont la conséquence d'un investissement mondial dans la recherche de nouveaux outils capables de restaurer les fonctions cellulaires. Aujourd'hui, les prouesses thérapeutiques se succèdent mais certaines pathologies telles que la dystrophie musculaire de Duchenne ou la mucoviscidose n'ont toujours pas de traitement.

1.6 Dystrophie Musculaire de Duchenne

1.6.1 Généralités

La dystrophie musculaire de Duchenne est une pathologie de dégénérescence musculaire classée parmi les maladies rares. La transmission de cette pathologie est récessive et liée au chromosome X. Sa prévalence est de 1 /5000 nouveaux nés garçons. Elle a été identifiée comme une pathologie génétique au milieu du 19^e siècle par Edward Meyron, un physicien anglais, et indépendamment par Guillaume Benjamin Armand, un médecin français (Emery, 1993). Cette pathologie provoque une perte progressive de la masse musculaire, une faiblesse musculaire croissante allant jusqu'à l'incapacité de marcher avant l'âge de 16 ans ainsi que des cardiomyopathies. Des retards de développement, des neurotransmissions anormales au niveau de la rétine ainsi que des dysfonctionnements des muscles lisses dans le tractus gastrointestinal peuvent être observés chez certains patients. Les atteintes respiratoires et cardiaques sont les principales causes de décès des patients (vers environ 30 ans).

1.6.2 Le gène DMD / la protéine

1.6.2.1 Gène

Le gène défectueux responsable de cette pathologie a été identifié par l'équipe du professeur Kunkel (Monaco *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1987). Ce gène est localisé sur le chromosome X en position Xp21 et s'étend sur plus de 2,5 millions de paires de bases. Il s'agit du gène le plus long chez l'Homme, réparti sur 79 exons et donnant un ARNm de 14 kb (figure 11). Le gène de la dystrophine possède sept promoteurs permettant des épissages alternatifs qui aboutissent aux différents isoformes de la dystrophine (den Dunnen, 2006; Doorenweerd *et al.*, 2017). La forme majoritaire, la dystrophine Dp427, est exprimée dans les muscles squelettiques, lisses et cardiaques mais également dans le cerveau, les cellules de Purkinje et les cellules lymphoblastoïdes. Il existe d'autres isoformes exprimées dans des tissus non musculaires comme les formes Dp427c, Dp140, Dp71, Dp40 dans le cerveau, ou les formes Dp260, Dp71 et Dp40 au niveau de la rétine etc... (Nicolas *et al.*, 2014) La présence de ces isoformes dans différents types de tissus explique les atteintes multisystémiques observées chez les patients.

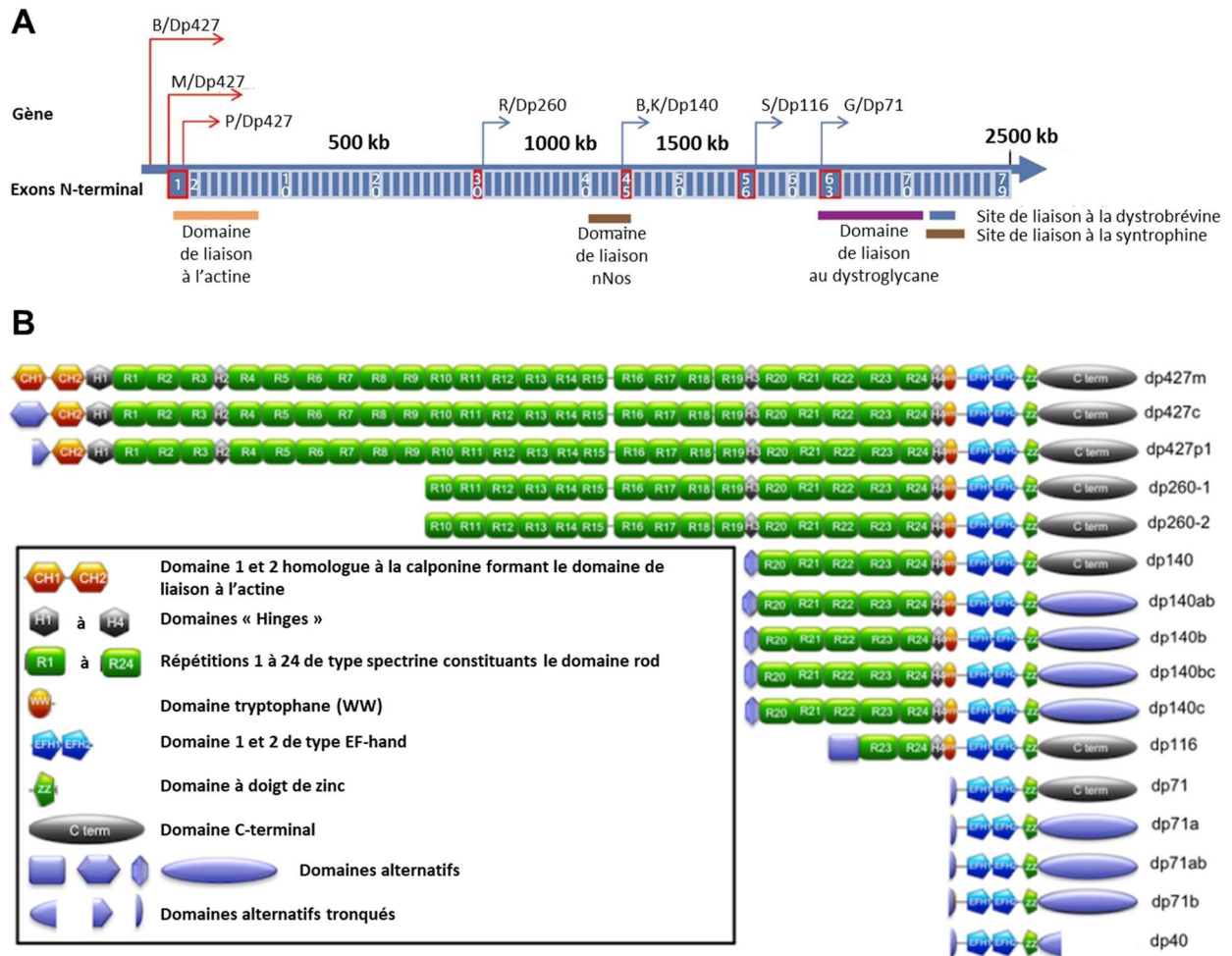


Figure 11 : La dystrophine et ses isoformes. (A) Les 79 exons de la dystrophine entière avec les sites d'épissage représentés par des flèches et des rectangles rouges pour chaque promoteur alternatif. Les promoteurs de la dystrophine complète sont le promoteur musculaire M, le promoteur cérébrale B et le promoteur des cellules de Purkinje P. Les autres isoformes sont : Dp260 exprimé dans la rétine R ; Dp140 exprimé dans les reins K et le cerveau B ; Dp116 exprimé dans les cellules de Schwann S et le Dp71 qui est exprimé de manière ubiquitaire. Les principaux domaines et sites d'interactions sont identifiés. (B) Représentation schématique des différentes isoformes de la dystrophine. Le site de liaison à l'actine est composé des domaines CH1 et CH2. Le domaine riche en cystéines contient un nombre important de cystéine et chevauche le domaine WW, deux EF-hands et le domaine en doigt de zinc. Le domaine WW est identifié par la présence de deux résidus tryptophanes espacés de 21 acides aminés. L'EF hand est un motif en hélice-boucle-hélice retrouvé dans beaucoup de protéines se liant au calcium bien que la dystrophine ne se lie pas au calcium. Les 4 domaines (WW, les deux EF hands et le domaine à doigt de zinc) sont impliqués dans la liaison avec le β -dystroglycane et la dystrophine. Figure adaptée d'après (Kamdar et Garry, 2016) et <http://edystrophin.genouest.org>.

1.6.2.2 Protéine

La dystrophine est une grosse protéine de 427 KDa qui est localisée du côté cytoplasmique du sarcolemme dans les muscles squelettiques (Hoffman *et al.*, 1987; Watkins *et al.*, 1988) (figure 12). Elle participe au maintien de l'intégrité membranaire durant la contraction musculaire. La dystrophine a une structure en forme de « tige » divisée en quatre domaines fonctionnels : domaine ABD1, domaine Rod, un domaine riche en cytosine et un domaine C-terminal.

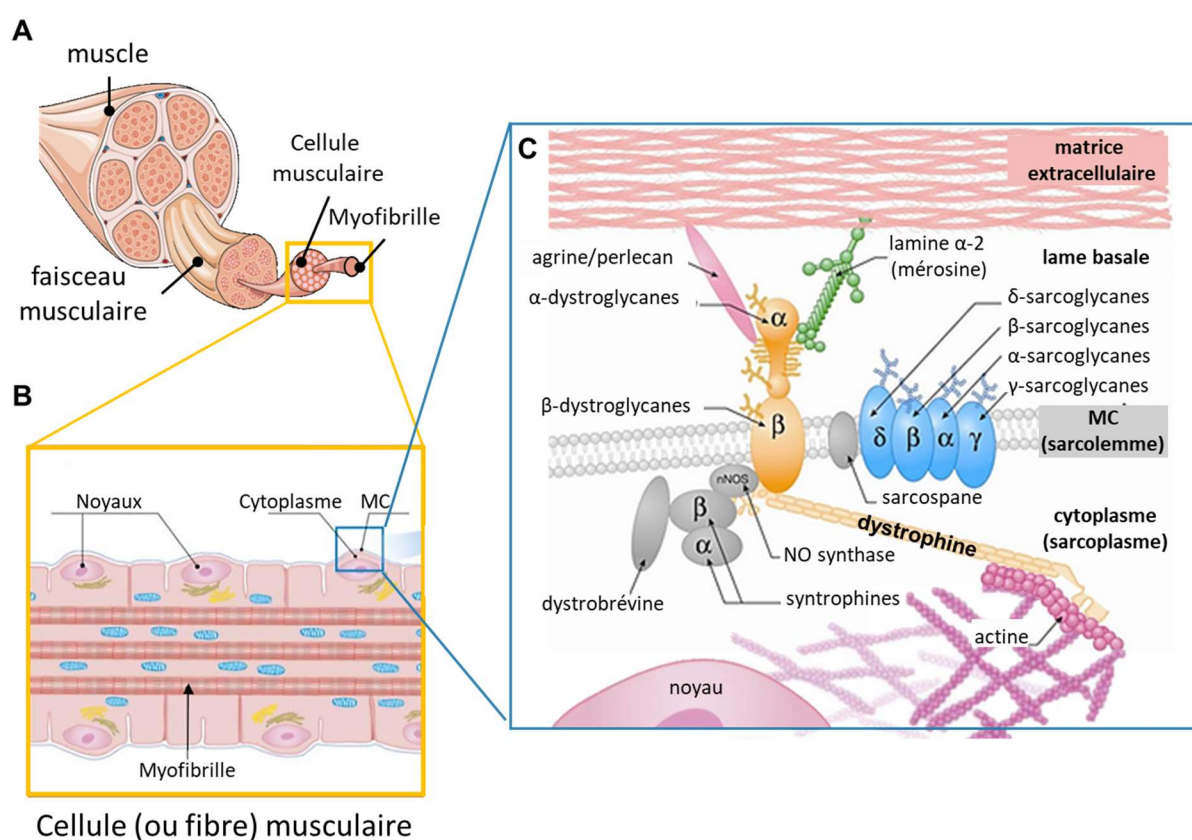


Figure 12 : Localisation et interactions de la dystrophine dans la cellule musculaire. Dans les muscles squelettiques, les cellules musculaires (ou fibres musculaires ou myofibres) sont regroupées en faisceaux (A). (B) Les cellules musculaires sont des cellules polynuclées délimitées par une membrane cellulaire (MC), aussi appelée sarcolemme, qui renferme plusieurs myofibrilles (faisceaux contractiles de protéines filamenteuses). (C) Sous le sarcolemme, la dystrophine interagit avec d'autres protéines pour solidifier la cellule musculaire en reliant le cytosquelette à la matrice extracellulaire. En conditions pathologique, l'absence de dystrophine déstabilise ces interactions et fragilise le sarcolemme face aux contraintes musculaires. Figure adaptée d'après (AFMTéléthon, 2020) et (AFM-Téléthon>Myoinfo, 2020).

Il a été montré que le domaine ABD1, localisé dans la partie N-terminale de la protéine interagit directement avec le réseau d'actine sub-sarcolemmique (Way *et al.*, 1992). Le domaine, Rod, situé en position centrale de la dystrophine, est composé de 24 motifs répétés « *spectrin-like* » et contient, en son centre, un site de liaison à l'actine, le domaine ABD2. Dans les cellules de muscles squelettiques, ABD2 participe à la liaison avec les filaments d'actine en interagissant avec le domaine ABD1 et au maintien du réseau de microtubules grâce aux répétitions 20 à 23 (Prins *et al.*, 2009; Belanto *et al.*, 2014). Ce domaine Rod possède des résidus tryptophanes qui favoriseraient l'adressage au sarcolemme et interviendraient dans les interactions avec les phospholipides (Le Rumeur *et al.*, 2002). La flexibilité et l'élasticité du domaine Rod sont dues à la présence de quatre espaceurs entre les motifs *spectrin-like*, notés Hinge. L'Hinge 4 contient un domaine WW impliqué dans les interactions protéine-protéine (Ilsley *et al.*, 2002) et plus précisément avec la partie C-terminale de β -dystroglycan (ancré dans le sarcolemme) (Rentschler *et al.*, 1999).

Le domaine riche en cystéines, intervient dans la liaison avec les complexes dystroglycane/ sarcoglycane. Ce domaine contient deux *EF-hands* et un domaine ZZ (doigt de zinc) contenant des résidus cystéines conservés qui forment une structure en présence d'ions divalents Zn^{2+} (Ponting *et al.*, 1996). Le domaine ZZ se lie à la calmoduline de manière dépendante au calcium (Anderson *et al.*, 1996). Il a également été mis en évidence que ce domaine riche en cystéine interagit avec la synémine, une protéine des filaments intermédiaires, (Bhosle *et al.*, 2006) et avec l'ankyrin-B, une protéine adaptatrice impliquée dans l'ancrage de la dystrophine au niveau du sarcolemme (Ayalon *et al.*, 2008).

Le domaine C-terminal de la dystrophine interagit avec le complexe syntrophine et avec la dystrobrevine grâce à ses motifs « *coiled coils proteins* », connus pour leur rôle dans les interactions protéines-protéines (Sadoulet-Puccio *et al.*, 1997).

1.6.2.3 Complexe de la dystrophine

La dystrophine fait partie d'un complexe (DGC : *dystrophin glycoprotein complex*) avec les dystroglycanes, sarcoglycanes et les complexes de syntrophines. Ces protéines peuvent être classées en trois catégories basées sur leur localisation cellulaire : extra-cellulaire (α -dystroglycane), transmembranaires (β -dystroglycane, sarcoglycanes, sarcospan) et cytoplasmiques (dystrophine, dystrobrevine, syntrophine et la *Neuronal nitric oxide synthase*) (Gao et McNally, 2015) (figure 13).

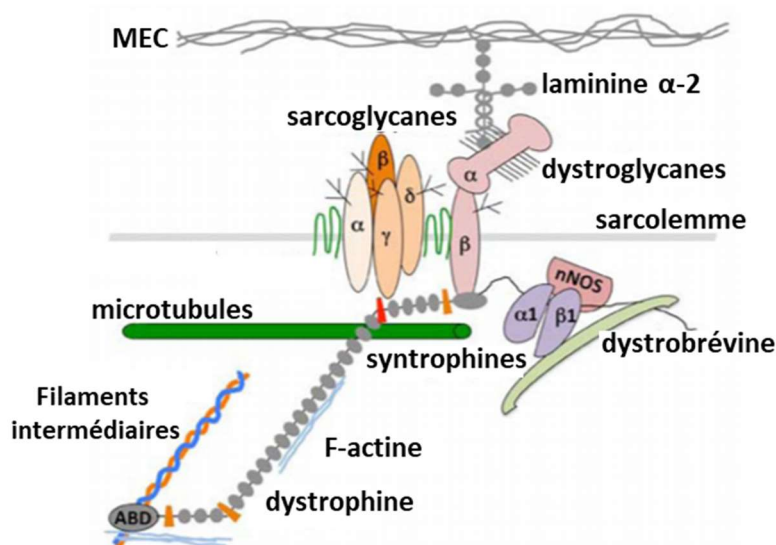


Figure 13 : Le complexe dystrophine-glycoprotéine (DGC). Le domaine Rod de la dystrophine interagit avec le réseau du cytosquelette et les protéines transmembranaires du DGC (sarcoglycanes, dystroglycanes et sarcospanes). La sous-unité α des dystroglycanes est localisée dans le milieu extracellulaire. Elle est un intermédiaire dans les interactions entre le DGC et la matrice extracellulaire (MEC) en jouant un rôle de récepteur à la laminine α -2. Les sous-complexes sarcospanes-sarcoglycanes ont un rôle structural et sont également impliqués dans la transduction du signal et la mécanoprotection. Les syntrophines, dystrobrevines et nNOS sont recrutés par la partie C-terminale de la dystrophine et participent à la transduction du signal. Les fines lignes noires présentes sur les α -Dystroglycanes représentent leur O-glycosylation tant dis que les branches présentes sur les β -Dystroglycanes et les sarcoglycanes indiquent des sites de N-glycosylation. Figure traduite à partir de (Gao et McNally, 2015).

Ce complexe dystrophine-glycoprotéines relie le cytosquelette des cellules de muscles squelettiques à la matrice extracellulaire. Il joue donc un rôle dans la stabilisation des membranes mais aussi dans la transmission des signaux entre l'environnement extracellulaire et le cytoplasme. Dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne, le complexe DGC est déstabilisé par l'absence de dystrophine provoquant une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Dans ces conditions, les protéases dépendantes du calcium comme la calpaïne et diverses chemokines ou cytokines sont activées et participent à la dégénération musculaire, la nécrose et éventuellement l'infiltration de cellules adipeuses (Nakamura, 2019).

1.6.3 Les mutations

La taille du gène de la dystrophine le rend vulnérable à l'apparition de mutations et explique leur diversité. Dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne, 70% des cas sont provoqués par des phénomènes de délétion(s) et/ou duplication(s) entraînant un décalage du cadre de lecture. Ainsi, un codon stop prématuré apparaît dans la séquence et provoque l'absence de protéine Dystrophine fonctionnelle.

Le syndrome de Becker est un syndrome proche de la dystrophie musculaire de Duchenne puisque cette pathologie est également due à une mutation dans le gène codant la dystrophine. Cependant, dans ce contexte pathologique, la protéine est exprimée en faible quantité entraînant des symptômes similaires à la DMD mais moins sévères comme la faiblesse musculaire.

Il existerait deux points chauds de mutations sur le gène codant la dystrophine, un au niveau des exons 45-55 (portion centrale du domaine Rod) et un autre au niveau des exons 3-7 (domaine ABD1) (Lietchi-Gallati *et al.*, 1989). Ces régions recensent environ 60% et 7% de l'ensemble des mutations observées sur le gène de la dystrophine. Cependant, d'autres types de mutations peuvent être à l'origine de cette pathologie tels que des variations d'un seul nucléotides, des petites délétions, des substitutions de bases (<http://edystrophin.genouest.org>) (Nakamura, 2019).

Selon la mutation mise en jeu, le cadre de lecture peut être décalé. Dans cette situation, la protéine dystrophine est absente des fibres musculaires, le complexe DGC est déstabilisé et donc le sarcolemme se fragilise lors des stress mécaniques (Hutter *et al.*, 1991; Petrof *et al.*, 1993). Une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium est observée dans les cellules musculaires provoquant l'activation des protéases dépendantes du calcium responsables de la fibrose et de l'infiltration de cellules adipeuses (Kumar et Borier, 2003; Yeung *et al.*, 2005). La dégénérescence du tissu musculaire serait également dû à la dérégulation d'autres molécules, comme l'enzyme nNOS (*neuronal nitric oxide synthase*) (Brenman *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 2008), l'aquaporine 4 (Wakayama *et al.*, 2002; Frigeri *et al.*, 2004) et différents canaux calciques (Iwata *et al.*, 2003; Friedrich *et al.*, 2008; Matsumura *et al.*, 2011). L'ensemble de ces dérégulations entraîne la perte de la motricité.

Lorsque le cadre de lecture est conservé malgré la mutation, la protéine tronquée est produite en faible quantité. Ce qui a pour conséquences l'apparition de phénotypes intermédiaires dépendants de la mutation ou du syndrome de Becker.

1.6.4 Stratégies thérapeutiques et essais cliniques

Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement pour la dystrophie musculaire de Duchenne. La prise en charge des patients repose sur le ralentissement de la perte musculaire et sur la conservation des fonctions ambulatrices grâce à l'utilisation de corticostéroïdes (prednisone et deflazacort) (Chamberlain et Chamberlain, 2017). Les traitements pharmacologiques continuent à être développés afin de prévenir les atteintes cardiaques ou respiratoires et de préserver la force musculaire. L'une des stratégies est la pratique du repositionnement de médicaments. Il s'agit d'une manière de proposer un produit déjà présent sur le marché pour le traitement d'autres pathologies et de les exploiter dans le contexte de la DMD. Par exemple, le tamoxifène, utilisé en cancérologie, améliorerait la force musculaire et diminuerait la fibrose cardiaque chez des souris *mdx*, modèles de la pathologie. Deux essais cliniques sont actuellement en cours dans le contexte de la DMD (NCT02835079 et NCT03354039).

Bien que les corticoïdes correspondent au traitement standard pour prolonger la motricité, ils n'arrêtent pas la progression de la dystrophie et causent de sévères effets secondaires à long terme (Nakamura, 2019). Il est donc nécessaire de développer d'autres stratégies capables de restaurer les fonctions motrices des patients sans

provoquer d'effets secondaires. C'est pourquoi, les recherches autour du transfert de gènes, du saut d'exon et de la thérapie cellulaire s'accroissent.

Le développement de nouvelles stratégies moléculaires innovantes faisant appel à la thérapie génique est en cours afin de restaurer l'expression de la dystrophine par i) un transfert du gène fonctionnel de la dystrophine, ii) un saut d'exon pour restaurer le cadre de lecture, iii) par la thérapie cellulaire ou encore par iv) l'édition de gènes.

1.6.4.1 Transfert du gène de la dystrophine

Le transfert de gènes est utilisé pour restaurer l'expression de la dystrophine par l'introduction d'une version fonctionnelle du gène par des vecteurs viraux dans les cellules musculaires des patients DMD (Okada et Takeda, 2013). Le transfert de gènes est réalisé le plus fréquemment par les virus associés aux adénovirus (AAV). Cependant, leur utilisation est limitée par la petite taille du transgène (4,7 kb) qu'il est possible d'y insérer (Howarth *et al.*, 2010). En effet, la grande taille du gène de la dystrophine (2,5 Mpb) est un obstacle majeur pour son transfert par les vecteurs viraux. C'est pourquoi, le transfert de gènes codant pour des mini- et micro-dystrophines fonctionnelles a été testé *in vivo* dans des modèles animaux puis en conditions cliniques. Ces versions courtes de la dystrophine sont composées du domaine de liaison à l'actine (en N-ter), du domaine riche en cystéine et du domaine C-ter et amputées du domaine Rod (Nakamura, 2019) (figure 14).

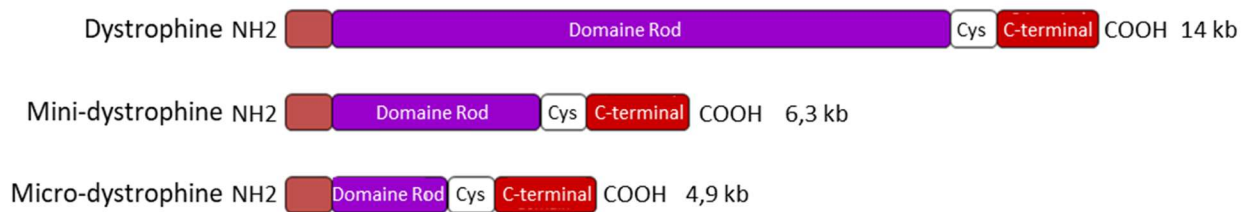


Figure 14 : Structure de la mini- et la microdystrophine d'après (Nakamura, 2019) La minidystrophine correspond à la forme de la dystrophine retrouvée chez les patients atteints du syndrome de Becker sa taille est de 6,2 kb. Le domaine rod peut être tronqué pour créer la microdystrophine (4,9 kb) qui peut être incorporée dans les vecteurs viraux. Ces deux formes courtes de la dystrophine conservent leurs domaines de liaison à l'actine, le domaine riche en cystéine et le domaine C-terminal de la dystrophine entière (14 kb).

Il a été montré que le phénotype dystrophique des souris mdx peut être atténué par la transfection d'une minidystrophine ($\Delta 17-48$) (Phelps *et al.*, 1995). Cependant, les formes courtes mini- et micro- dystrophine ne possèdent pas la totalité des domaines Hinge et des domaines d'interaction avec les autres protéines du complexe DGC. Donc, contrairement à la forme entière, elles ne permettent donc pas de restaurer totalement les défauts causés par la pathologie comme, par exemple, la rigidité membranaire (Koo *et al.*, 2014). De plus, ces formes raccourcies doivent être exprimées en plus forte quantité que la version complète pour obtenir des effets similaires (Phelps *et al.*, 1995). Pour contourner ce problème de taille et délivrer la dystrophine humaine entière, certains auteurs ont découpé la séquence codante de la dystrophine en trois parties et l'ont insérée dans trois vecteurs AAV indépendants contenant également des signaux uniques de recombinaison directionnelle. Bien que cette stratégie permette l'expression de la protéine entière chez les souris mdx, le taux de reconstitution reste faible (Lostal *et al.*, 2014).

1.6.4.2 Le saut d'exon

La stratégie de saut d'exon correspond à une correction génique qui permet l'élimination de l'exon porteur de la mutation, le rétablissement du cadre de lecture et la restauration de l'expression de la dystrophine au niveau du sarcolemme (figure 15) (Lu *et al.*, 2000; Yokota *et al.*, 2006).

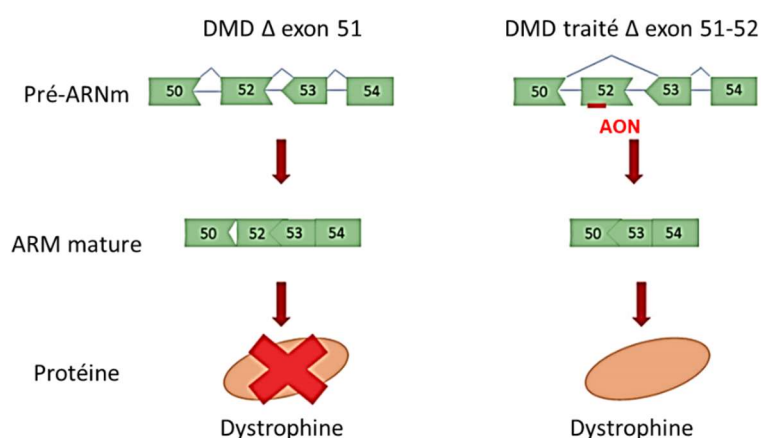


Figure 15 : Schéma du mécanisme de saut d'exon illustré par l'exemple du saut de l'exon 52 du gène codant la dystrophine. Une délétion de l'exon 51 engendre une terminaison prématurée du transcrit et par conséquent l'absence de production de dystrophine. L'hybridation d'un oligonucléotide antisens (AON, en rouge) permet le saut de l'exon 52 rétablissant ainsi le cadre de lecture et donc la production d'une protéine dystrophine tronquée mais fonctionnelle. D'après (Dzierlega & Yokota, 2020).

Les oligonucléotides les plus fréquemment utilisés et les plus efficaces sont des 2'-O-méthyl-phosphorothioates AO (2'OMeAO) et des oligomères morpholino phosphorodiamidate (PMO ou morpholino) (Nakamura et Takeda, 2009; Echigoya *et al.*, 2015). Des études *in vivo* ont montré que l'injection de 2'OMeAO ciblant l'exon 23, permet une restauration de la dystrophine dans plus de 20% des fibres musculaires chez des souris mdx, normalement déficientes (Fletcher *et al.*, 2006). Cette stratégie prometteuse a été soutenue par plusieurs entreprises dans le but de développer des AOs de type PMO et 2'OMeAO testés en essais cliniques (tableau 13).

Tableau 13 : Exemples d'essais cliniques utilisant la stratégie de saut d'exon dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne

Cible	Outils	Essais clinique	Références
Exon 51	2'OMeAO (ou PR051 ou drisapersen)	Phase I/II, expression dystrophine mais bénéfices pas statistiquement significatifs	BioMarin, Prosensa
Exon 51	PMO : AVI-4658 ou Eteplirsén ou Exondys51	Phase II (NCT03985878) pour évaluer la tolérance des patients, efficacité non significative statistiquement	Sarepta Therapeutics
Exon 53	PMO : Golodirsén ou VYONDYS 53 ou SRP-4053	Amélioration de l'expression de la dystrophine	Sarepta Therapeutics
Exon 45	PMO : Casimersén ou SRP4045	Faible augmentation de la dystrophine	Sarepta Therapeutics
Exon 53	(NS-065 / NCNP-01)	Phase II	(Komaki et al., 2018)

1.6.4.3 La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire est elle aussi une stratégie activement développée (Ikemoto *et al.*, 2007) dans le but de transplanter des patients avec des cellules satellites musculaires modifiées à l'aide d'un lentivirus portant la microdystrophine CS1. Les études précliniques ont mis en évidence que ces cellules montrent une capacité à la régénération des muscles, dans le contexte de la DMD, quatre semaines après la greffe (Ikemoto *et al.*, 2007).

La société Capricor Therapeutics a développé une autre approche, intitulée « CAP-1002 », qui utilise des cellules progénitrices cardiaques de donneurs. Les études précliniques ont montré les capacités anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et régénératives de ces cellules dans le modèle murin mdx. Les résultats de l'essai clinique HOPE (NCT02485938) ont montré une bonne tolérance de l'injection ainsi qu'une amélioration morphologique et fonctionnelle du cœur et amélioration de la fonction des membres supérieurs (Taylor *et al.*, 2019). Aujourd'hui, la phase II de l'essai clinique est

en cours afin d'évaluer les effets du traitement sur les performances motrices des patients (Essai HOPE-2, NCT03406780).

1.6.4.4 Les essais cliniques dans le contexte de la DMD

Les investissements et l'intérêt mondial portés dans les différentes stratégies de thérapie génique ont permis de lancer une vingtaine d'essais cliniques, au cours de ces dernières années, dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ainsi, le transfert de gènes, le saut d'exon et la thérapie cellulaire sont en cours d'évaluation clinique afin de jauger leur sécurité d'utilisation, leur efficacité ainsi que leur devenir dans l'organisme. Aujourd'hui plusieurs protocoles sont en phase III (tableau 14) et l'espoir de voir un traitement thérapeutique pourrait se concrétiser pour les patients atteints de la DMD.

Tableau 14 : Essais cliniques en thérapie génique en cours dans le contexte de la DMD, source afm-téléthon.fr

Stratégie	Produits	Phase	Numéro de l'essai clinique	Résultats intermédiaires
Transfert de gène	rAAVrh74.MCK.Micro-Dystrophine	I/II	NCT03375164	Forte expression de la micro-dystrophine, amélioration fonctionnelle de 33% en moyenne, bonne tolérance sans effet indésirable sérieux
	rAAVrh74.MCK.Micro-Dystrophine (SRP-9001)	II	NCT03769116	Evaluation des effets d'une injection intraveineuse du produit rAAVrh74.MCK.Micro-Dystrophine
	PF-06939926	I	NCT03362502	Evaluation de la sécurité d'utilisation de l'injection intraveineuse de PF-06939926 chez des personnes atteintes de DMD ambulantes
	SGT-001	I/II	NCT03368742	3 mois de traitement production de dystrophine fonctionnelle dans 10% des fibres musculaires
Saut d'exons	Eteplirsén ou Exondys51® (exon 51)	II	NCT03218995	Evaluation de la sécurité d'utilisation, la tolérance, le devenir dans l'organisme et l'efficacité de l'eteplirsén
		II	NCT03985878	Evaluation de la sécurité d'utilisation et efficacité de l'eteplirsén
	SRP-4053 et du SRP-4045 (essai : ESSENCE)	III	NCT02500381	Evaluation de la sécurité d'utilisation et efficacité du SRP-4053 et du SRP-4045
	SRP-4053 et SRP-4045 extension de phase III	III	NCT03532542	Evaluation de la sécurité d'utilisation et efficacité du SRP-4053 et du SRP-4045
	SRP-4051 (exon 51) extension	I/II	NCT03675126	Evaluation de la sécurité d'utilisation, la pharmacocinétique et l'efficacité du SRP-4051
	NS-065/NCNP-01 extension	II	NCT03167255	Evaluation de l'innocuité et de l'efficacité du NS-065/NCNP-01
	DS-5141b (exon 45)	I/II	NCT02667483	Evaluation de la sécurité d'utilisation, de la tolérance, du devenir dans l'organisme et de l'efficacité de deux doses de DS-5141b

1.6.4.5 L'Édition de génome

L'édition de génome, dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne, a été réalisé dans des modèles murins et canins de la pathologie pour retirer une région porteuse d'une mutation et corriger le cadre de lecture. Par exemple, Xu *et al.*, ont réalisé la délétion des exons 21-23 du gène de la dystrophine, soit une délétion de 23 kb, permettant de restaurer l'expression de la dystrophine dans les tissus traités (Xu *et al.*, 2016b) (figure 16). D'autres études précliniques ont montré l'efficacité du système CRISPR/Cas9, distribué à l'aide d'un AAV, pour éliminer l'exon 51 et restaurer le cadre de lecture, dans le modèle canin $\Delta E50$ -MD (Amoasii *et al.*, 2018).

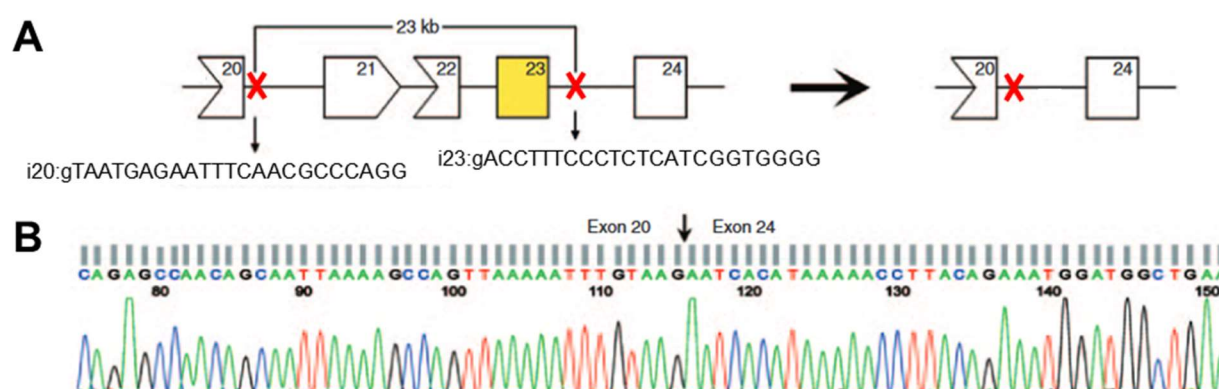


Figure 16: Délétion d'une grande région dans le gène dmd murin par le système CRISPR. (A) Schéma du sites génomique cible pour l'ARNg du système CRISPR. L'exon muté est représenté en jaune. Les croix rouges indiquent les sites de coupures doubles brins ciblés par le système CRISPR au niveau de l'intron 20 (i20) et de l'intron 23 (i23). (B) Analyse du séquençage des produits obtenus après RT-PCR des transcrits exprimés dans les cellules C2C12 traitées avec les ARNg et la Cas9. Figure adaptée de (Xu *et al.*, 2016b).

Tableau 15 : Etudes du saut d'exon dans le contexte de la DMD.

Cible	Outils	Références
Exon 23	CRISPR/Cas9 + AAV 8 ou 9	(Long et al., 2016; Nelson et al., 2016) (Tabebordbar et al., 2016)
Exon 51	CRISPR/Cas9 + AAV	(Amoasii et al., 2018)
Exons 21-23, 52-53	CRISPR/Cas9	(Xu et al., 2016a)
Exons 45-55	CRISPR/Cas9	(Bengtsson et al., 2016; Zhu et al., 2017)

1.7 Mucoviscidose

1.7.1 Généralités

La mucoviscidose est une pathologie génétique autosomique qui se transmet de manière récessive (Lowe *et al.*, 1949). Il s'agit de la pathologie rare la plus commune dans la population caucasienne. Sa prévalence est de 1 cas pour 3000-4000 naissances. Elle est caractérisée principalement par des atteintes du système gastro-intestinal et du système respiratoire comme une obstruction chronique des voies pulmonaires, une insuffisance de l'activité exocrine du pancréas ou encore par une forte concentration en sel dans la sueur. Les hommes atteints par la mucoviscidose sont stériles du fait de l'absence de canaux déférents (Kaplan *et al.*, 1968).

1.7.2 CFTR Gene / Protéine

Le gène défectueux responsable de cette pathologie a été identifié en 1989 par le clonage et la caractérisation d'ADN complémentaires (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). Il s'agit du gène CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) localisé sur le chromosome 7 dans la région 7q31.2 (Rommens *et al.*, 1989). Il est composé de 27 exons répartis sur 250 kpb. La protéine CFTR est classée dans la famille des protéines transmembranaires liant l'ATP et joue un rôle de transporteur d'ions chlorures et bicarbonates au niveau apical des cellules épithéliales. La protéine CFTR intervient donc dans la régulation de la conductance transmembranaire (figure 17).

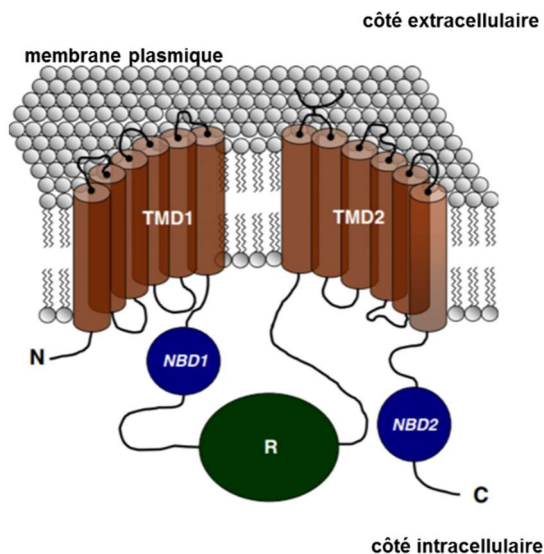


Figure 17 : La protéine CFTR et sa localisation dans la membrane plasmique d'après (Souza-Menezes *et al.*, 2014). C : domaine C-terminal, N : domaine N-terminal, NBD1 : domaine 1 de liaison aux nucléotides, NBD2 : domaine 2 de liaison aux nucléotides, R : domaine régulateur, TMD1 : domaine transmembranaire A, TMD2 : domaine transmembranaire 2

La protéine CFTR est exprimée dans les tissus pulmonaires, salivaires, sub-muqueux ainsi qu'au niveau des reins, de la rate, de l'intestin, des glandes de la vésicule biliaire, du pancréas et de l'utérus. Ceci explique les atteintes pulmonaires et gastro-intestinales observées chez les patients. Depuis 1982, Sing et ses collaborateurs ont observé une grande variabilité phénotypique de cette pathologie (Sing *et al.*, 1982). En effet, les patients peuvent présenter des maladies hépatiques (obstruction du tractus biliaire (Gaskin *et al.*, 1988), des sténoses des voies biliaires (Bilton *et al.*, 1990), des cirrhoses (Gabolde *et al.*, 2001; Bartlett *et al.*, 2009), des insuffisances pancréatiques (Corey *et al.*, 1989; Kerem *et al.*, 1989).

1.7.3 Les mutations

Selon la base de données établie par le consortium d'analyses génétique de la Mucoviscidose, il existerait 2088 mutations localisées sur le gène CFTR <http://www.genet.sickkids.on.ca/Home.html> (figure 18). Selon la mutation impliquée, ce n'est pas la même étape qui est altérée dans la production de la protéine CFTR.

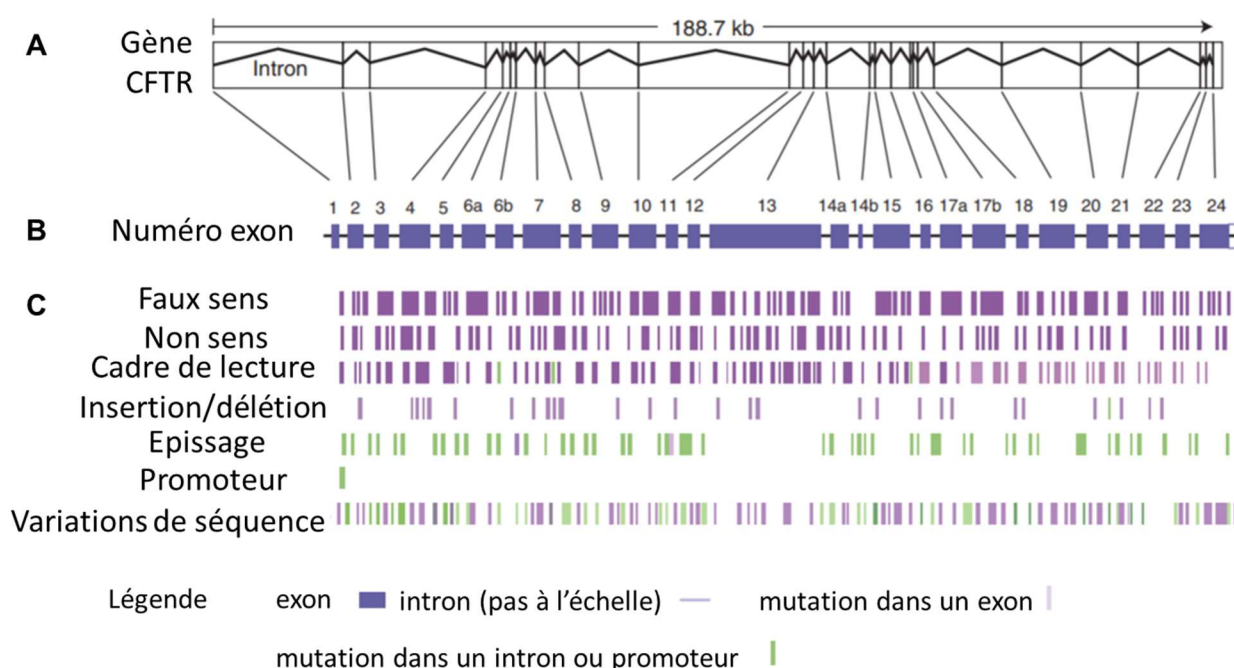


Figure 18 : Le gène CFTR, le transcrit et la distribution des mutations d'après source (Tsui & Dorfman, 2013). (A) échelle numérotée schématisant les exons et des introns. (B) Schéma des exons et des introns dont la taille n'est pas à l'échelle. (C) Distribution des mutations connues et des polymorphismes représentés par des barres verticales.

En effet, les étapes concernant le repliement, l'adressage à la membrane plasmique ou bien la fonctionnalité de la protéine peuvent être perturbées par des mutations répertoriées en 6 classes (figure 19).

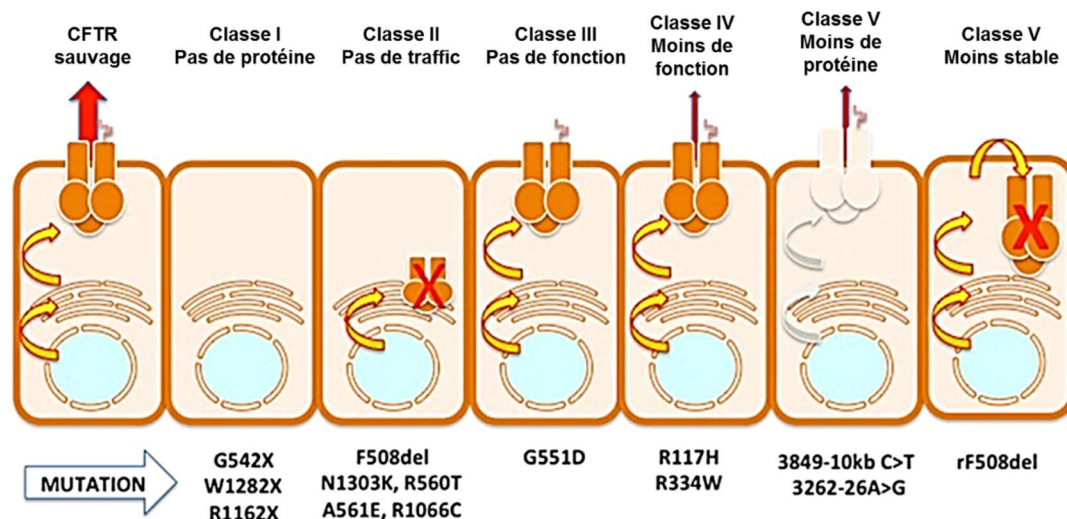


Figure 19 : Classification des mutations de la protéine CFTR d'après (Cabrini, 2018). Les six classes de défauts moléculaires retrouvés pour la protéine CFTR. Les mutations les plus communes et responsables de chaque défaut sont indiquées en dessous de chaque classe de défaut à titre d'exemple. Classe I : mutations non-sens au sein du gène CFTR qui n'aboutissent pas à la production de la protéine. L'ARNm transcrit à partir du gène muté va directement être dirigé vers une voie de dégradation. Classe II : défaut de conformation spatiale de la protéine, l'entraînant ainsi vers la voie de dégradation au niveau du réticulum endoplasmique. Classe III : protéines CFTR ayant une conformation spatiale correcte et localisée à la membrane plasmique mais qui ne sont pas fonctionnelles. Classe IV : les protéines sont correctement maturées, localisées à la membrane et peuvent être activées. Cependant, le flux d'ions qui la traverse est restreint. Cela est principalement dû à des mutations de l'arginine localisée dans le domaine MSD impliqué dans le transport des ions chlorure à travers la membrane plasmique. Classe V : les mutations qui mènent à un épissage aberrant de certains ARN aboutissant alors à une protéine erronée. Le nombre de protéines CFTR fonctionnelle et localisées à la membrane plasmique est largement réduit. Classe VI : les mutations qui affectent la stabilité de la protéine et/ou son ancrage dans la membrane plasmique.

Parmi ces nombreuses mutations, la plus fréquente en Europe est une délétion d'une phénylalanine en position 508 (Riordan *et al.*, 1989). La mutation F508del engendre un défaut de conformation et une rétention de la protéine dans le réticulum endoplasmique empêchant celle-ci d'être exprimée à la surface des cellules, ce qui entraîne un défaut dans le flux d'ions chlorure.

Globalement, le dysfonctionnement de la protéine CFTR provoque une accumulation de mucus compact au niveau des tissus pulmonaires ainsi qu'une diminution du nettoyage mucociliaire. Ceci favorise la colonisation des tissus par des bactéries pathogènes engendrant des infections chroniques ou des inflammations. Les souches bactériennes pathogènes les mieux identifiées sont *Staphylococcus aureus*, *Herpes influenzae* et *Pseudomonas aeruginosa*. Ces souches établissent des biofilms et déclenchent des infections responsables de la dégradation des tissus pulmonaires voir la mort du patient dans la majorité des cas (Domingue *et al.*, 2020).

1.7.4 Traitements pharmaceutiques

De nos jours, aucun traitement curatif n'existe pour cette pathologie. La prise en charge des patients repose sur le traitement de leurs symptômes par des stratégies pharmacologiques et donc sur l'emploi d'antibiotiques, de médicaments anti-inflammatoires, de bronchodilatateurs, de mucolytiques et d'agents osmotiques. Ces différentes molécules diminuent la progression de la maladie et retardent les dommages irréversibles au niveau pulmonaire (Trandafir Laura M, 2019).

Le développement des stratégies pharmacologiques permet, aujourd'hui, d'élever l'espérance de vie d'un patient à 50 ans, contre 5 ans dans les années 1960 (www.vaincrelamuco.org). Le tableau 16 regroupe les principaux produits pharmacologiques autorisés sur le marché européen et américain. Récemment, en octobre 2019, la FDA a autorisé la vente d'une trithérapie, nommée Trikafta®, qui repose sur l'emploi combiné de Tezacaftor/ Ivacaftor (Symdeko ®) et d'Elexacaftor pour les

patients âgés de plus de 12 ans et ayant au moins une copie de la mutation F508del, soit 90% de la population atteinte de la mucoviscidose. Elexacaftor et Tezacaftor jouent le rôle de correcteur en augmentant le nombre de protéine CFTR F508del au niveau de la membrane plasmique, en facilitant leur conformation et leur trafic jusqu'à la membrane. L'ivacaftor joue le rôle de modulateur du potentiel du canal ionique CFTR en augmentant son ouverture pour faciliter le passage des ions chlorures. Cette trithérapie améliore la qualité et la fonctionnalité des protéines CFTR mutées à la surface de la cellule permettant ainsi le rétablissement du transport des ions chlorures (Hoy, 2019).

L'emploi de traitements pharmaceutiques permet de retarder l'apparition de symptômes sévères chez les patients atteints de mucoviscidose mais ne permettent pas de guérir de cette pathologie. D'autres stratégies sont en cours d'élaboration et concernent le développement de la thérapie génique.

Tableau 16 : Traitements pharmacologiques utilisés dans le contexte de la mucoviscidose d'après (De Boeck, 2020), www.cff.org et www.prescriber.co.uk

Noms	Mode d'action	Indications
Dornase α (Pulmozyme)	Cible les ADN extracellulaire pour réduire la viscosité des expectorations	Patients avec une FVC >40% et âgés de plus de 5 ans
Ivacaftor (Kalydeco)	Potentiateur CFTR qui favorise le transport des ions chlorures en augmentant l'ouverture du canal CFTR à la surface de la cellule	Patients > 2ans qui ont une mutation de classe III : G551D, G1244E, G1349D, G178R, G551S, S1251N, S1255P, S549N ou S549R
		Pour les patients >18ans avec une mutation R117H
Mannitol	Hyper-osmotique qui améliore l'évacuation du mucus dans les poumons	Patients >18ans comme thérapie complémentaire
Lumacaftor/ Ivacaftor (Orkambi)	Lumacaftor est un correcteur de CFTR qui agit directement sur la mutation F508del pour améliorer la formation et le trafic de la protéine et augmenter le nombre de CFTR fonctionnelle à la surface de la cellule	Patients >12ans homozygotes pour F508del
Symkevi, Symdeko (Tezacaftor/ Ivacaftor)	Association du potentiateur ivacaftor et du correcteur tezacaftor	Patients >12ans hétérozygotes pour F508del et ayant au moins l'une des mutations suivantes : P67L, R117C, L206W, R352Q, A455E, D579G, 711 + 3A>G, S945L, S977F, R1070W, D1152H, 2789+5G>A, 3272 26A>G ou 3849 +10kbC>T
trikafta	Tri-thérapie composée de trois modulateurs différents tezacaftor/ivacaftor (Symdeko®) combiné avec elexacaftor	Patients >12ans avec au moins une copie de la mutation F508del

1.7.5 Traitements de la mucoviscidose par thérapie génique

Le recours à la thérapie génique est une solution envisagée pour traiter cette pathologie. La stratégie la plus pertinente est basée sur le principe de la complémentation de gène. En effet, l'utilisation d'un système d'édition de génome comme CRISPR/Cas9 nécessiterait une optimisation pour chaque patient puisqu'il existe une multitude de mutations du gène CFTFR engendrant la mucoviscidose, idem pour les stratégies de saut d'exon (Gill et Hyde, 2014). C'est pourquoi, l'introduction d'une copie fonctionnelle du gène CFTR semble être une approche plus appropriée pour traiter n'importe quel patient souffrant de la mucoviscidose indépendamment de sa mutation contrairement à l'Ivacaftor (Gill et Hyde, 2014).

Les principales classes de virus utilisées pour introduire une version fonctionnelle du gène CFTR sont les adénovirus recombinants (rAd), les virus associés aux adénovirus recombinants (rAAV) et les lentivirus recombinants (rLV).

Les résultats provenant des modèles animaux ont montré que les adénovirus recombinants sont des vecteurs hautement efficaces pour le transfert de gènes (Gill et Hyde, 2014). Plusieurs essais cliniques ont été menés avec les adénovirus (tableau 17) révélant ainsi que la majorité d'entre eux sont responsables d'une réponse immunitaire qui limite largement leur effet thérapeutique.

Malgré les modifications et les progrès avancés sur ces particules adénovirales, les résultats de ces précédents essais cliniques mènent à l'abandon progressif de cette stratégie au profit des virus associés aux adénovirus (AAV). Dans le contexte de la

mucoviscidose, l'AAV2 est souvent utilisé comme vecteur pour introduire le gène CFTR dans les cellules des patients. Cependant, un essai clinique de phase II a révélé que ce traitement n'améliore pas significativement les performances pulmonaires des patients et a mis en évidence une production d'anticorps dirigés contre la particule virale chez les patients traités avec l'AAV2, vecteur du gène CFTR (Moss *et al.*, 2007a).

Les lentivirus ont une forte efficacité pour transférer des gènes dans les tissus pulmonaires et à intégrer un gène dans le génome des cellules qui se divisent ou non. L'avantage de ces virus concerne l'intégration de la séquence thérapeutique dans le génome de l'hôte qui permettrait la transmission de l'information à la cellule fille lors de la division cellulaire et donc une expression du transgène sur le long terme (Griesenbach *et al.*, 2012). La suppression des séquences LTR des vecteurs lentiviraux a permis de mettre au point une nouvelle génération de lentivirus recombinants, appelés SIN lentivirus (*Self inactivating lentiviral*). Ce type de vecteur viral s'intégrerait préférentiellement dans des séquences introniques et peut être modifié dans le but d'obtenir différents pseudotypes spécifiques d'un type cellulaire (Miah *et al.*, 2019). Dans le contexte de la mucoviscidose, le vecteur lentiviral rFIV-GP64 a montré des résultats prometteurs pour la transduction de cultures primaires de cellules épithéliales pulmonaires, de tissus murins et porcins (Miah *et al.*, 2019). Bien que ce vecteur puisse être administré plusieurs fois, il a été montré que deux semaines après l'administration par aérosol d'une seule dose du vecteur rFIV-GP64 porteur de la séquence codante du gène CFTR, le phénotype de la mucoviscidose était corrigé chez le porc et plus particulièrement le transport d'anions, le pH à l'interface air/liquide tout en diminuant les populations bactériennes (Cooney *et al.*, 2016).

Un autre vecteur lentiviral, le vecteur rSIV-F/HN comportant la protéine de fusion (F)/ Hemagglutinin/Neuramidase protein (HN), a été mis au point dans le contexte de la mucoviscidose. En 2017, un essai pré-clinique mené par Alton *et al.*, (Alton *et al.*, 2017) dans un modèle murin de la mucoviscidose a montré que l'expression du transgène perdure sur une durée de deux ans dans les poumons des souris traitées et que le taux de transduction s'élève à 15% dans les cellules pulmonaires. Ce score est largement supérieur au seuil minimal de 5% de cellules transfectées, nécessaire pour observer des bénéfices dans le contexte de la mucoviscidose. Il a également été montré que l'administration répétée de ce vecteur est possible et aboutit à une réponse cumulative dans l'expression du transgène (Miah *et al.*, 2019). A ce jour, aucun essai clinique n'a été enregistré à propos de l'emploi des lentivirus recombinants dans le contexte de la mucoviscidose tandis que des stratégies non virales, à base de liposomes ont déjà été testées.

Tableau 17 : Vecteurs viraux utilisés dans le transfert du gène codant la protéine CFTR (Prickett et Jain, 2012).

Vecteur	Méthode d'administration	Effets secondaires	Résultats	Sources
Adénovirus	Voie nasale	Non	Potentiel nasal rétabli ARNm et protéine CFTR indétectable	(Zabner et al., 1993)
Adénovirus	Voie nasale et pulmonaire	Inflammation passagère à haute dose	Potentiel nasal variable CFTR détectée dans le nez mais pas dans les poumons	(Crystal et al., 1994)
Adénovirus	Voies nasales	Inflammation locale à haute dose	Potentiel nasal inchangé ARNm CFTR détectée principalement à haute dose	(Knowles et al., 1995)
Adénovirus	Voies nasales	Non	Partielle correction du potentiel nasal	(Hay et al., 1995)
Adénovirus	Voies nasales	Non	Faible retour à la normale du potentiel nasal	(Zabner et al., 1996)
Adénovirus	Voies nasales et pulmonaires	Non	ARNm et protéine CFTR détectée plus dans le nez que dans les poumons	(Bellon et al., 1997)
Adénovirus	Voies pulmonaires	Non	ARNm CFTR positive mais diminue aux administration suivante	(Harvey et al., 1999)
Adénovirus	Voies pulmonaires	Symptômes proches de la grippe	Vecteur ADN détecté	(Zuckerman et al., 1999)
Adénovirus	Voies pulmonaires	Fièvres passagères, myalgies	CFTR ARNm et ADN détectés transitoirement	(Joseph et al., 2001)et (Perricone et al., 2001)
AAV2	Voies nasales	Non	Correction partielle du potentiel nasal ARNm CFTR non détecté	(Wagner et al., 1999)
AAV2	Voies pulmonaires	Possible	ARNm non détecté	(Aitken et al., 2001)
AAV2	Voies nasales	Non	Pas de changement du potentiel nasal Pas de changement histologique en IL-8	(Wagner et al., 2002)
AAV2	Voies nasales et pulmonaires	Possible	Pas de changement du potentiel nasal	(Flotte et al., 2003)
AAV2	Voies pulmonaires	Non	Volume d'expiration forcée en 1s a tendance à être amélioré ARNm CFTR non détecté	(Moss et al., 2004)
AAV2	Voies pulmonaires	Non	Volume d'expiration forcée en 1s, marqueurs d'expectorations, pas d'amélioration avec la prise d'antibiotiques	(Moss et al., 2007b)

D'autres stratégies reposant sur l'introduction de l'ARNm CFTR associé à des liposomes (Bangel-Ruland *et al.*, 2013) ou à des nanoparticules (Robinson *et al.*, 2018) (Kolonko *et al.*, 2020) ont également été proposées afin de traiter chaque patient atteint de la mucoviscidose indépendamment de sa mutation. L'emploi des ARNm permet d'éliminer l'étape de translocation nucléaire puisque les ARNm sont traduits directement dans le cytoplasme. Cette caractéristique diminue donc le risque d'insertion dans le génome hôte. Cependant, les ARNm ont une demi-vie courte, une faible stabilité et un caractère cytotoxique. Dans le but de pallier ces inconvénients, des ARNm modifiés chimiquement sont synthétisés pour augmenter la stabilité et diminuer l'immunogénicité notamment par la substitution des UTP et CTP par des pseudo-uridine ou des 5'-méthyl-CTP (Miah *et al.*, 2019). Les ARNm modifiés sont complexés à des nanoparticules lipidiques composées de D-Lin-MC3-DMA, DSP, cholestérol, et de DMG-PEG 2K (Haque *et al.*, 2018) ou à du PLGA recouvert de chitosan (Robinson *et al.*, 2018). En 2018, un essai clinique a été lancé pour tester l'efficacité d'un ARNm, nommé MRT5005, administré par inhalation à des patients atteints de la mucoviscidose (NCT03375047). Cet essai soutenu par la société Translate Bio, Inc. (Lexington, MA, USA) a montré des résultats encourageants concernant l'amélioration des fonctions pulmonaires.

Dans le contexte de la mucoviscidose, le système CRISPR/Cas9 permet de proposer plusieurs types de stratégies thérapeutiques. En effet, l'édition de génome ou l'insertion de la séquence saine du gène CFTR permettrait de rétablir l'expression de la protéine de manière durable. Le système CRISPR/Cas9 peut corriger la séquence sans provoquer de cassure double brin et ainsi éditer uniquement les bases (adénine et cytosine) de l'ADN (Da Silva Sanchez *et al.*, 2020).

1.8 Conclusion

Globalement, les virus recombinants sont de puissants outils de transfert de gènes capables d'introduire efficacement un transgène dans une cellule hôte. Cependant, ce type de vecteur est limité par sa capacité d'emballage du transgène. Par exemple, la taille de la séquence codante de la forme entière de la dystrophine est de 14 kbp. Ce qui est un réel obstacle au transfert de gènes par les techniques actuelles. C'est pourquoi, dans le contexte de la DMD, ce sont les formes courtes, mini- et micro-dystrophine, qui sont utilisées. Bien que les formes raccourcies de la dystrophine règlent le problème de la taille et permettent de ralentir la progression de la pathologie, ces mini- et micro-dystrophines ne sont pas aussi efficaces que la dystrophine complète. Néanmoins, des efforts sont en cours pour perfectionner les vecteurs viraux, notamment les AAV, pour pallier les défauts d'intégration du gène médicament dans les cellules musculaires et leur immunogénicité.

Chez les patients atteints de la mucoviscidose, les atteintes pulmonaires correspondent à la première cause de décès. C'est pourquoi, la majorité des traitements visent à améliorer les capacités respiratoires de ces patients. De plus, les poumons sont relativement accessibles par des aérosols. Cependant, les poumons filtrent l'air par des mécanismes physiques et immuns pour protéger le reste de l'organisme des molécules ou des pathogènes présents dans l'environnement. Par conséquent, la structure de l'organe, la composition cellulaire de l'épithélium pulmonaire et la présence de mucus sont des barrières au transfert de gènes par aérosol. En effet, l'épithélium pulmonaire est composé de cellules quiescentes et différenciées qui sont remplacées très lentement par quelques progéniteurs. En absence d'intégration du gène CFTR, la stratégie de

délivrance doit permettre des « injections » répétées en cas d'expression transitoire du transgène ou alors que le transgène s'exprime de manière permanente sans altérer les tissus (Gill et Hyde, 2014).

Afin de délivrer le gène thérapeutique dans les cellules mutées, les vecteurs doivent être capables de franchir l'épaisseur du mucus qui limite l'accès à l'épithélium, pénétrer dans la cellule cible de manière relativement rapide afin d'éviter l'exposition au système immunitaire stimulé de manière basale par les phénomènes d'inflammations des tissus. La rareté des récepteurs présents à la surface cellulaire réduit l'entrée des vecteurs dans le cytosol.

Parfois, une réponse immunitaire à certaines particules virales préexiste chez les individus et limite l'efficacité du transfert de gènes. De plus, le caractère immunogène des vecteurs viraux interdit les réinjections dans le cas où le transgène ne s'intègre pas au génome de l'hôte et disparaîtrait au fil des divisions cellulaires.

Lorsque le traitement est efficace, l'inconvénient majeur des virus recombinants concerne leur coût de production à grande échelle. Le coût du traitement contre l'amyotrophie spinale (Zolgensma) récemment mis sur le marché s'élève à 1,9 millions d'€/patient.

Il est donc nécessaire de développer d'autres systèmes de transfert de gènes notamment des vecteurs synthétiques.

2 Chapitre II : Les systèmes de délivrance non viraux dans le contexte de la DMD et de la Mucoviscidose

2.1 Les vecteurs non viraux

Les vecteurs non-viraux ou synthétiques ont été développés pour pallier l'activation du système immunitaire par les particules virales et permettre la répétition des injections des acides nucléiques thérapeutiques, le transfert de fragment d'ADN de grande taille et la diminution du coût de production.

Les vecteurs non viraux sont majoritairement représentés par les liposomes cationiques et les polymères cationiques. Lorsqu'ils se complexent aux acides nucléiques chargés négativement, ils forment des complexes électrostatiques appelés, respectivement, lipoplexes ou polyplexes. Des lipopolyplexes peuvent être obtenus lorsque des liposomes sont ajoutés à des polyplexes préalablement formés (figure 20). Cette complexation condense les acides nucléiques, facilite leur passage à travers les membranes par la dissimulation des charges négatives et les protège des nucléases.

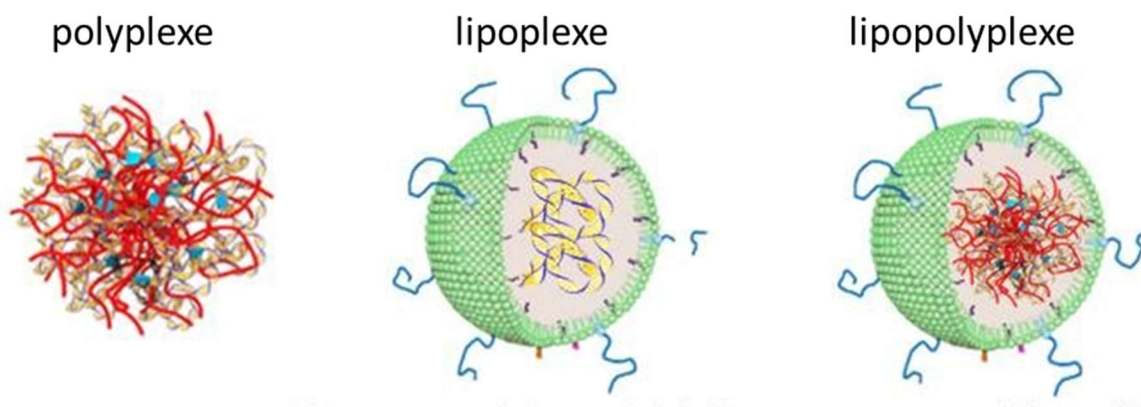


Figure 20 : Représentation schématique des vecteurs non viraux. Figure adaptée de (Zhou *et al.*, 2017).

Les vecteurs non viraux sont moins immunogènes que les vecteurs viraux mais leur efficacité de transfection reste faible. Les polyplexes, lipoplexes ou lipopolyplexes sont des assemblages supramoléculaires capables de compacter les acides nucléiques, de masquer leurs charges négatives et de les protéger des nucléases extra et intracellulaires. Afin d'être utilisé en application clinique, cet assemblage doit être biocompatible, biodégradable, spécifique du tissu cible, non immunogène et bien sûr ne pas provoquer d'effet secondaire sur des tissus hors-cible. L'expression du transgène doit persister aussi longtemps que nécessaire pour favoriser ou inhiber l'expression d'une protéine.

Le point fort des vecteurs synthétiques repose sur l'adaptabilité de leurs propriétés physico-chimiques qui influent directement sur leur toxicité, leur stabilité et leur capacité d'empaquetage du transgène qui est théoriquement illimité. De plus, la production en grandes quantités des lipides et des polymères n'est pas limitée par la reproductibilité des formulations, ni par leur coût, en comparaison aux vecteurs viraux (Godbey et Mikos, 2001; Davies, 2002; Bono *et al.*, 2020). Selon leur formulation, les complexes sont caractérisés par des structures, des propriétés physico-chimiques et des mécanismes de transfection différents (internalisation, échappement endosomal, entrée dans le noyau) (Ni *et al.*, 2019). Leur taille et leur charge sont deux critères majeurs pour contrôler leur production et leur reproductibilité. La taille est mesurée par DLS (*diffusion light scattering*) et la charge par la mesure du potentiel ζ . La taille est estimée par la mesure du diamètre hydrodynamique avec l'approximation que la structure soit une sphère tandis que la charge ou potentiel ζ (en mV) correspond à la charge autour de la particule mesurée par la mobilité des particules dans un champ électrique.

2.1.1 Liposomes cationiques

Généralement, les liposomes sont composés de deux éléments : un lipide cationique et un lipide neutre (*helper lipid*) (Tros de Ilarduya *et al.*, 2010). Les lipides mono- ou poly-cationiques sont des molécules amphiphiles structurées en trois domaines : un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe relié par un domaine de liaison. Le domaine hydrophile correspond à la tête polaire des lipides qui porte les charges positives qui interagissent avec les acides nucléiques. Le domaine hydrophobe est caractérisé par des chaînes aliphatiques ou du cholestérol (ou autres stéroïdes). Le domaine de liaison, ou linker, sépare la tête et le motif hydrophobe. Il est composé d'éther, d'ester, de carbamate, de pont disulfure ou de ponts amides qui influencent le degré de biodégradabilité (Al-Dosari et Gao, 2009; Belmadi *et al.*, 2015).

Les lipides cationiques, comme le 1,2-dioleoyl-3-triméthylammonium-propane (DOTAP) ou le 1,2-di-O-octadécenyl-3-triméthylammonium propane (DOTMA), sont généralement associés à une forte cytotoxicité et à l'instabilité des lipoplexes (Zhi *et al.*, 2010); Puras *et al.*, 2014; (Puras *et al.*, 2014; Movahedi *et al.*, 2015). L'ajout de PEG et/ou de lipides neutres, comme le di-oleoyl phosphatidyl ethanolamine [L-a-di-oleoyl phosphatidyl ethanolamine (DOPE) et le cholestérol, permet de limiter la cytotoxicité et augmenter la stabilité (Colosimo *et al.*, 1999; Cheng et Lee, 2016). Le DOPE et la L-a-dioleoyl phosphatidyl choline (DOPC) font partis des premiers co-lipides testés (Gruner *et al.*, 1988; Farhood *et al.*, 1995; Midoux *et al.*, 2009). Les lipides neutres dits fusogènes induisent généralement la fusion ou la déstabilisation des membranes par un changement de conformation (Lin *et al.*, 2014; Barba *et al.*, 2019) (figure 21).

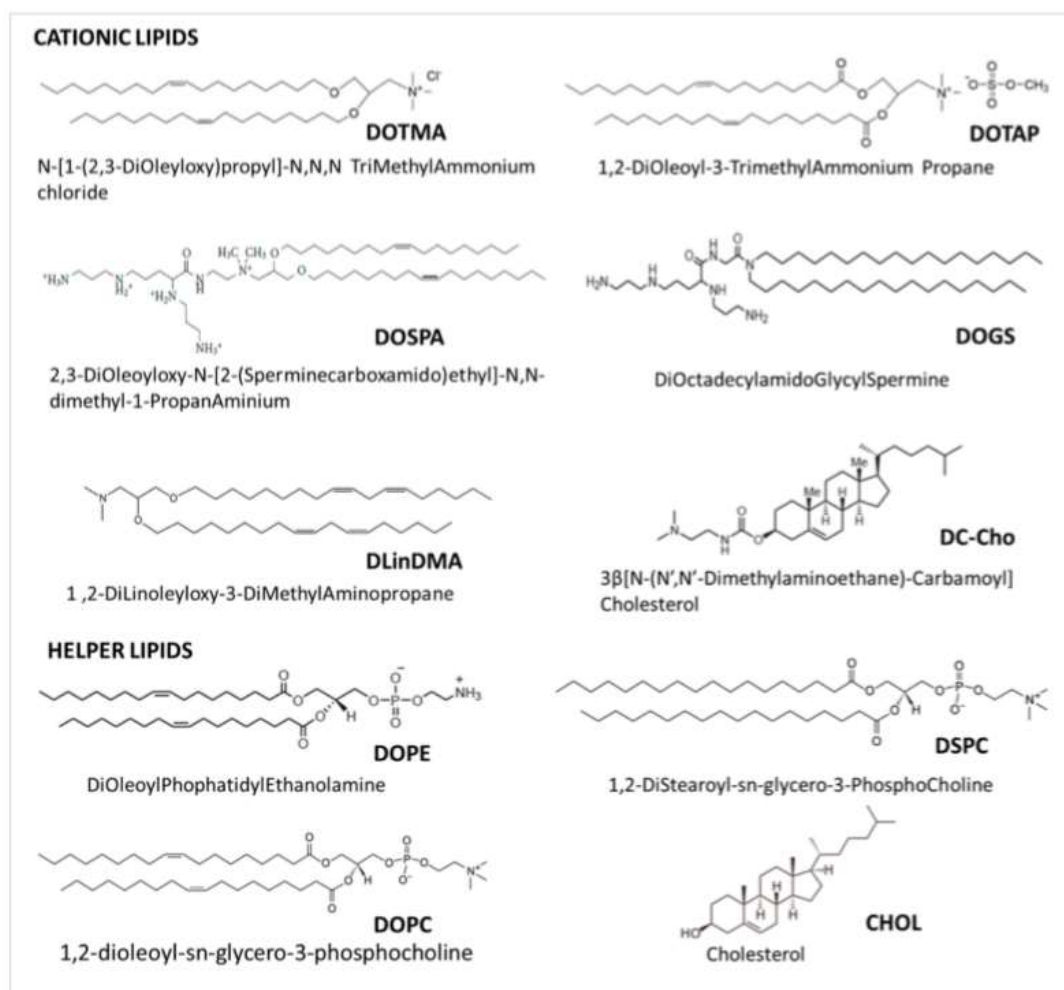


Figure 21 : Structures des lipides cationiques et co-lipides utilisés dans les liposomes d'après (Barba *et al.*, 2019).

En milieux aqueux, les lipides s'organisent en formant des vésicules (liposomes). Les têtes polaires interagissent avec l'environnement aqueux par des ponts hydrogène tant dis que les chaînes aliphatiques interagissent entre elles par des forces de van der Waals pour former des bicouches lipidiques avec un compartiment interne lipophile (Barba *et al.*, 2019).

Dans le contexte de la mucoviscidose, Alton et ses collaborateurs ont mis au point un système de délivrance non viral, appelé pGM169/GL67A, composé du plasmide pGM169 dépourvu de nucléotides CpG codant le gène CFTR placé sous la dépendance d'un promoteur, composé de l'enhancer du cytomegalovirus humain et du promoteur du facteur d'élongation 1 α humain, complexé au lipide cationique appelé GL67A synthétisé à partir de GL67, DOPE et de DMPE-PEG 5000 dans un ratio molaire de 1:2:0,05 (Hyde *et al.*, 2008; Alton *et al.*, 2013). L'essai clinique de phase IIB, réalisé chez 140 patients, a montré que ce traitement ne provoque pas d'effet secondaire, diminue les phénomènes d'inflammation et stabilise les fonctions pulmonaires des patients traités avec pGM169/GL67A en comparaison au groupe ayant reçu le placebo (Alton *et al.*, 2015). D'autres formulations à base de DC-Chol/DOPE ou de DOTAP ont été développées et testées en essais cliniques (tableau 18). Dans le contexte de la mucoviscidose, les liposomes sont administrés par voies nasales. Bien que la plupart de ces formulations ne provoquent pas ou peu d'effets secondaires, les bénéfices pour les patients sont souvent limités.

Tableau 18 : Récapitulatif des vecteurs non-viraux utilisés dans le traitement de la mucoviscidose

Vecteur	Méthode d'administration	Nombre d'essais	Effets secondaires	Résultats	Sources
DC-Chol/DOPE	voies nasales	15	Non	Correction partielle du potentiel nasal ARNm non détecté	Calpen et al., Nature Medecine 1995
DC-Chol/DOPE	voies nasales	12	Possible	Correction partielle du potentiel nasal	Gill et al., Gene Therapy 1997
DC-Chol/DOPE	voies nasales	11	Non	Correction partielle du potentiel nasal ARNm CFTR dans certains cas	Hyde et al., Gene Therapy 2000
DOTAP	voies nasales	16	Non	Correction partielle du potentiel nasal ARNm CFTR dans certains cas	Porteous et al., Gene Therapy 1997
EDMPC	voies nasales	11	Non	Pas de changement du potentiel nasal ARNm non détecté	Noone et al., Molecular Therapy 1999
GL67 vs ADN nu	voies nasales	12	Non	Réponse significative avec les deux vecteurs ARNm CFTR pas détecté	Zabner et al., J Clin Invest 1997
GL67	voies nasales et pulmonaires	16	Symptômes grippaux	Pas de changement du potentiel nasal ARNm pas détecté ADN CFTR détecté	Alton et al., Lancet 1999
GL67	voies pulmonaires	8	Symptômes grippaux	ARNm partiellement détectés	Ruiz et al., Human Gene Therapy 2001
Nanoparticules ADN	voies nasales	12	Non	Correction partielle du potentiel nasal ADN CFTR détecté dans le traitement et quelques contrôles	Konstan et al., Human Gene Therapy 2004

2.1.2 Polymères cationiques

Les polymères cationiques de haut poids moléculaires forment des polyplexes plus stables que les polymères de faibles poids moléculaires avec des tailles et des formes variées selon leur composition (Bloomfield, 1996; Rinkenauer *et al.*, 2015). Il existe plusieurs types de polymères cationiques comme les poly-L-lysines, polyéthyléimines (PEI), poly(amidoamine)s, chitosan (Bono *et al.*, 2020), cyclodextrines cationiques, des polymères cationiques alkylés (Belmadi *et al.*, 2015).

A pH physiologique, les fonctions amines protonées permettent la complexation avec les acides nucléiques chargés négativement. En général, les polyplexes sont globalement cationiques. Par conséquent, comme pour les liposomes, le greffage de molécules hydrophiles comme le PEG diminue les charges de surface, permet de limiter la cytotoxicité et d'augmenter la stabilité des polyplexes en limitant les interactions électrostatiques avec la surface des cellules, les protéines sériques et en évitant l'opsonisation par les cellules du système réticuloendothélial (Crowley *et al.*, 2015)(Kichler, 2004; Crowley *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2019).

La polyéthylèneimine branchée (bPEI) a été utilisée pour la première fois en 1995 par l'équipe de Behr. La PEI branchée est composée d'unités $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$ (Boussif *et al.*, 1995) répétées 580 fois et a un poids moléculaire de 25 kDa (figure 22). Cette macromolécule organique est caractérisée par une forte densité de charge. La PEI existe aussi sous forme linéaire (figure 22). La forme linéaire de la PEI (IPEI) est un polymère composé d'environ 510 unités $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$ caractérisée par un poids moléculaire moyen de 22 kDa. Elle contient uniquement des amines secondaires (Goula *et al.*, 1998).

La PEI est largement utilisée car elle possède un haut niveau de transfection grâce à sa densité de charge (20% des groupements amines sont protonés en conditions physiologiques (Suh *et al.*, 1994; Tang et Szoka, 1997). L'état d'ionisation de ce polymère change selon le pH, conférant ainsi à la PEI un pouvoir endosomolytique, c'est-à-dire une capacité à déstabiliser les membranes pour favoriser l'échappement endosomal des complexes/acides nucléiques par un mécanisme « éponge à proton » (Boussif *et al.*, 1995; Di Gioia et Conese, 2009).

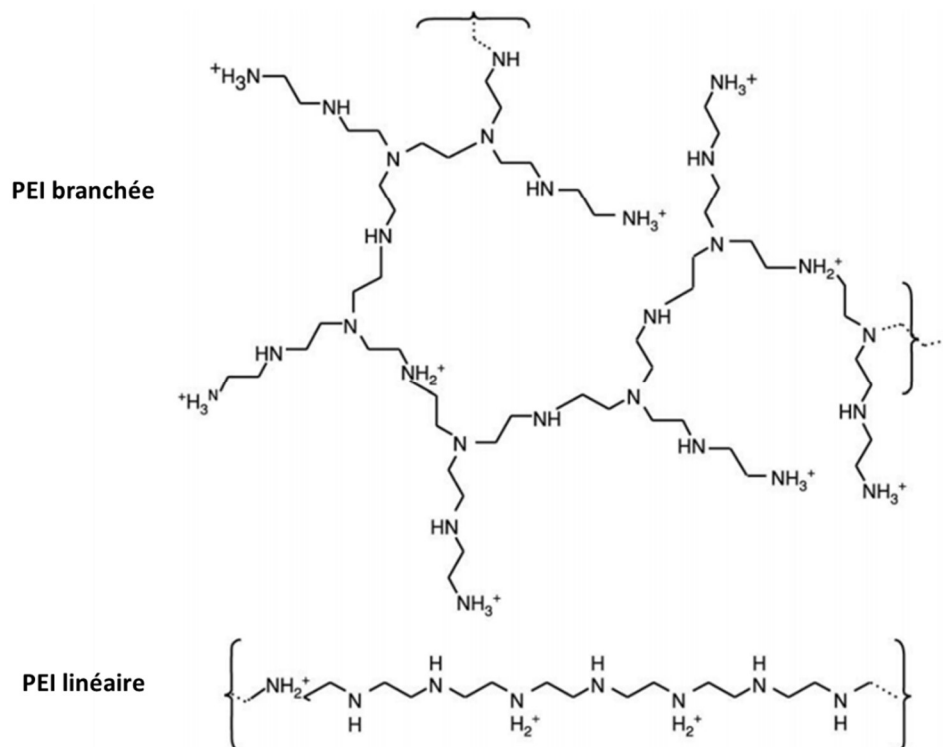


Figure 22 : Structure de la PEI linéaire et de la PEI branchée. Figure adaptée de (Demeneix et Behr, 2005).

L'efficacité de transfection de la IPEI dépend de sa masse molaire (le standard étant de 22KDa). A l'instar des poly-L-lysines ou des liposomes, l'excès de charges positives portées par les polyplexes à base de PEI tend à être cytotoxique. C'est

pourquoi, des associations avec des molécules neutres, comme du PEG ou des cyclodextrines (Ni *et al.*, 2019), sont établies. Le greffage de PEG évite également la dégradation enzymatique des complexes à base de PEI. Les complexes PEI les plus stables et les moins toxiques sont ceux formés de PEI associée à une fonction hydrophobe comme le salicylamide ou l'acide stéarique (Zhao *et al.*, 2015; Ni *et al.*, 2019). Les polymères cationiques peuvent être partiellement substitués avec une molécule hydrophobe, tels que le cholestérol ou la dexaméthasone, permettant de faciliter le passage de la membrane plasmique (Belmadi *et al.*, 2015).

Le chitosan est un polysaccharide naturel biodégradable de haut poids moléculaire (213 KDa) composé de D-glucosamine et de N-acetyl-D-glucosamine lié par une liaison $\beta(1,4)$ capable de condenser l'ADN (Leong *et al.*, 1998; Mao *et al.*, 2001). Le chitosan est obtenu après hydrolyse acide de la chitine. Lorsque le chitosan est modifié avec un groupement imidazole, une amélioration de l'échappement endosomal et une diminution de la toxicité ont été observées (Kim *et al.*, 2003).

Les cyclodextrines correspondent à des oligosaccharides cycliques biocompatibles qui possèdent 6, 7 ou 8 unités D(+)-glucose liées par des liaisons α -1,4 et appelés α , β ou γ -cyclodextrines. Ces molécules peuvent être transformées en entités cationiques par substitution avec des acides aminés cationiques (histidine ou lysine) ou des groupes éthylenimines pour former des complexes avec l'ADN appelés CDplexes (Bennevault-Celton *et al.*, 2011; Belmadi *et al.*, 2015).

2.1.3 Lipopolyplexes

Les lipopolyplexes sont réalisés à partir de polyplexes encapsulés dans des liposomes (Li *et al.*, 1998; Vangasseri *et al.*, 2005; Perche *et al.*, 2011). La combinaison des caractéristiques des polyplexes et des lipoplexes confère aux lipopolyplexes une meilleure stabilité colloïdale, une toxicité plus faible et meilleure efficacité de transfection (Chen *et al.*, 2016). Il a été montré, *in vivo*, que les lipopolyplexes ont une meilleure résistance aux nucléases et conduisent à une meilleure expression génique, en comparaison aux lipoplexes DOTAP/ADN. Les premiers lipopolyplexes ont été réalisés à partir d'un polyplexe à base de protamine ou de polylysine et d'un lipide cationique, le DOTAP, par Huang et son équipe (Gao et Huang, 1996; Li et Huang, 1997). Aujourd'hui il existe plusieurs formulations de lipopolyplexes qui dépendent de la voie d'administration choisie (Uchida *et al.*, 2020).

2.2 Trafic intracellulaire des vecteurs non viraux

2.2.1 Généralités

Les vecteurs synthétiques sont employés pour faciliter l'internalisation des acides nucléiques et les protéger contre les nucléases. Cependant, leurs applications cliniques sont limitées par leur faible efficacité de transfection, qui est bien inférieure à celle des vecteurs viraux. Il semblerait que cette faiblesse soit principalement liée à leurs déplacements intracellulaires. En effet, l'internalisation des polyplexes et des lipoplexes débute par un attachement à la membrane plasmique de manière électrostatique ou par la reconnaissance de récepteurs membranaires présents à la surface de la cellule. Puis, les complexes sont internalisés le plus souvent par un mécanisme d'endocytose. Par conséquent, ces complexes se retrouvent piégés dans les vésicules endosomales qu'ils

doivent quitter avant d'être entraînés vers la voie lysosomale de dégradation. Lorsque les complexes s'échappent des endosomes, ils doivent être capables de relâcher les ADN dans le cytosol ou de transiter jusqu'à la région périnucléaire. A proximité du noyau, des mécanismes pour franchir l'enveloppe nucléaire sont sollicités afin que les séquences ADN pénètrent dans le noyau.

2.2.2 Franchissement de la membrane plasmique

Il existe plusieurs voies d'internalisation qui dépendent des signaux activés à la surface cellulaire, de la taille du complexe, du type de polymère et du type cellulaire (Gonçalves *et al.*, 2004; Midoux *et al.*, 2008). Le mécanisme d'internalisation emprunté par les complexes qui est le plus détaillé est celui de l'endocytose. Cette voie est constitutivement active dans tous les types de cellules mammifères (Khalil *et al.*, 2006; Sahay *et al.*, 2010). Elle est caractérisée par la formation de vésicules appelées endosomes et peut être dépendante ou indépendante de la clathrine.

L'entrée dans une cellule débute par un attachement à la membrane plasmique par des interactions électrostatiques entre les charges positives des vecteurs et les charges négatives de la bicouche lipidique. Il existerait des interactions avec les glycoaminoglycanes (GAG) présents à la surface cellulaire associées à des co-récepteurs qui ont un rôle dans l'internalisation des particules (Perez Ruiz de Garibay, 2016). Lorsque le ligand se lie aux récepteurs de la surface cellulaire, les récepteurs se regroupent et un manteau de clathrine se forme. Ensuite, ces régions membranaires s'invaginent de manière à former des puits tapissés de clathrine. Un phénomène de constriction puis de fission est déclenché par la dynamine GTPase qui aboutit à

l'apparition de vésicules dont la taille peut atteindre 200 nm (McMahon et Boucrot, 2011). A la suite de la fission, les vésicules perdent leur manteau de clathrine et peuvent fusionner entre elles pour former un endosome précoce (Munsell *et al.*, 2016). Les endosomes précoces correspondent à des vésicules de transport et fusionnent avec les endosomes tardifs, lesquels fusionnent avec les liposomes. Au cours de ce processus, la lumière des vésicules s'acidifie passant d'un pH 7,2 en surface à un pH 6 dans les endosomes précoces, puis à pH 5,5-5 dans les endosomes tardifs, et finalement à pH 5-4,5 dans les lysosomes (figure 23).

L'endocytose à cavéole est un mécanisme actif dans beaucoup de types cellulaires et notamment dans les cellules musculaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Conner et Schmid, 2003). Ce mécanisme d'internalisation, dépendant de l'actine et de la dynamine, a lieu au niveau de rafts lipidiques, qui sont des structures riches en cholestérol (Damke *et al.*, 1994; Takei *et al.*, 1995). Des vésicules de 50 nm de diamètres, caractérisées par la présence de la protéine caveolin-1, se forment au niveau de la membrane plasmique (Parton et Simons, 2007) puis fusionnent soit avec des endosomes précoces dont le pH s'acidifie jusqu'au stade de lysosomes, soit avec des vésicules appelées cavéosomes dont le pH reste neutre et qui évitent la voie de dégradation (Pelkmans *et al.*, 2001; Parton et Simons, 2007). Les cavéosomes sont utilisés par certaines bactéries et certains virus pour être transporter de manière rétrograde à travers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (Harris *et al.*, 2002; Nichols, 2002; Ferrari *et al.*, 2003; Le et Nabi, 2003).

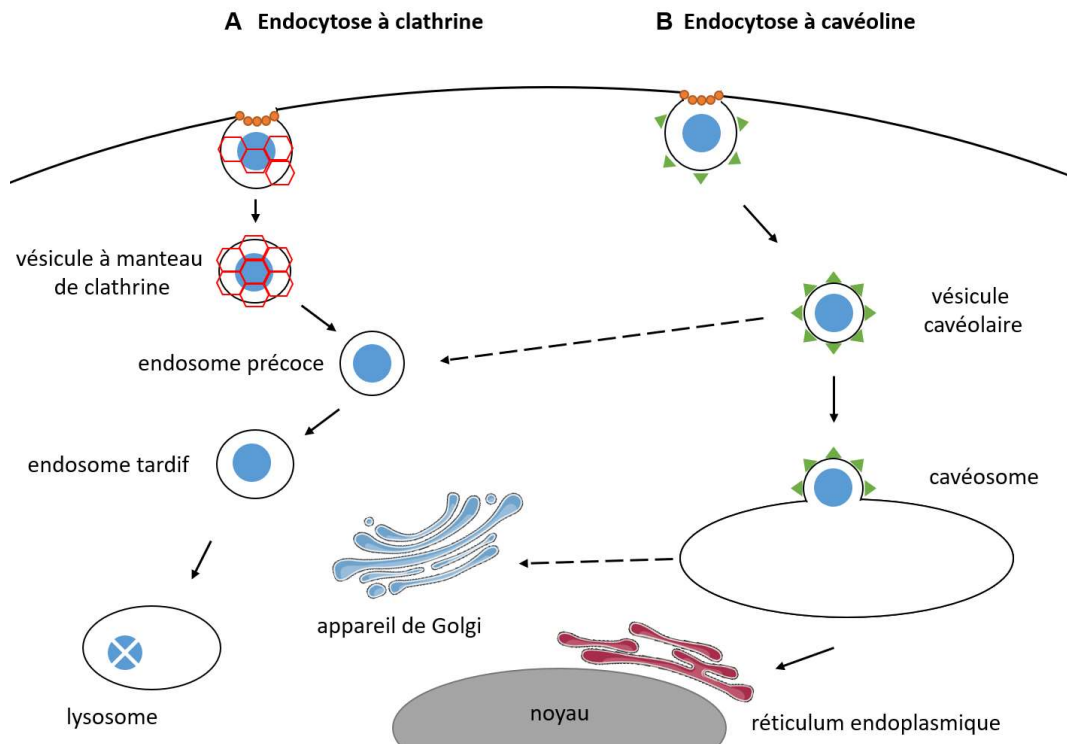


Figure 23 : Les voies d'internalisation d'endocytose à clathrine (A) et à cavéoline (B). Bleu : particule internalisée, rouge : clathrine, orange : dynamine, vert : cavéoline.

Les polyplexes cationiques se lient aux protéoglycanes chargés négativement à la surface cellulaire et déclenchent différents mécanismes d'internalisation selon leur structure chimique. Les polyplexes formés de PEI associée à l'acide folique entrent par endocytose à clathrine, comme les polyplexes à base de PEI associée à la transferrine. Cependant, certains polyplexes empruntent la voie d'endocytose à cavéole.

De la même manière que les polyplexes, les lipoplexes se lient à la membrane cellulaire par des interactions électrostatiques entre les charges positives du complexes et les charges négatives des protéines de la surface cellulaire, comme les héparanes sulfate (Khalil *et al.*, 2006). Les lipoplexes franchissent la membrane plasmique soit par

un phénomène de fusion membranaire car leur composition chimique est proche de celle des membranes soit par un mécanisme d'endocytose à clathrine (Hoestra *et al.*, 2007), comme la lipofectamine par exemple (Hama *et al.*, 2006).

2.2.3 Echappement endosomal

La libération des complexes ou des acides nucléiques dans le cytosol est une étape cruciale du transport intracellulaire pour le transfert de gènes car en absence d'échappement, les vecteurs et les acides nucléiques sont dégradés dans les lysosomes (Munsell *et al.*, 2016; Bus *et al.*, 2018; Ni *et al.*, 2019). L'efficacité de transfection est donc influencée par la capacité des vecteurs à favoriser l'échappement endosomal des acides nucléiques et à protéger les ADNs des nucléases cytosoliques. Le développement des vecteurs non-viraux s'appuie sur des mécanismes spécifiques des organismes pathogènes pour sortir des endosomes soit en fusionnant avec la membrane vésiculaire, soit en formant des pores (Marsh et Helenius, 1989) (Gruenberg et van der Goot, 2006) inspirés respectivement des virus enveloppés (comme le virus de la grippe) et des virus non-enveloppés (comme les adénovirus) (Hogle, 2002). La plupart des stratégies utilisées reposent sur le fait que la lumière de ces vésicules ait un pH compris entre 6.5 et 5.0.

La perforation membranaire, utilisée par les virus non-enveloppés (et les exotoxines bactériennes), provoque la perméabilisation et la déstabilisation des membranes endosomales grâce à des peptides fusogènes. Ces peptides sont composés d'acides aminés sensibles au pH (aspartique et glutamine). Cette caractéristique leur permet d'adopter une conformation en hélice α lorsque le pH diminue (Ni *et al.*, 2019).

Depuis que les structures en hélice α sont connues pour déstabiliser les membranes lipidiques, plusieurs équipes ont adapté cette stratégie d'échappement endosomal aux systèmes de délivrance non viraux en leur associant des dérivés de protéines ou de peptides d'origine virale, animale ou bactérienne.

Des études ont montré que le peptide HA2, dérivé du virus de la grippe, la protéine vp1, issue de la capsid du rhinovirus, ou des protéines provenant du VIH comme le peptide TAT (*trans-activating domain*) et la glycoprotéine gp41 ont des propriétés lytiques qui facilitent l'échappement endosomal (Munsell *et al.*, 2016). D'autres peptides et protéines ont été identifiés chez bactérie *Listeria monocytogenes*, comme la Listeriolysin O (LLO) ou dans le règne animal tels que la mélittine, dérivée du venin des abeilles, la pénétratine issue de la drosophile a été testées *in vitro* et *in vivo* ou encore le transportan (galanine et mastoparan issus d'un neuropeptide et du venin de guêpe) (Munsell *et al.*, 2016).

Des études ont montré que l'association du peptide fusogène dérivé de HA2 (GLFGAIAGFIENGWEGMIDG) à des poly-L-lysines (Wagner *et al.*, 1992; Midoux *et al.*, 1993) ou à des liposomes (Kichler *et al.*, 1997; Wagner, 1999; Zhang *et al.*, 2001) favoriserait l'échappement endosomal par fusion membranaire et perméabilisation membranaire et par conséquent l'efficacité de transfection (Munsell *et al.*, 2016).

Le potentiel fusogène de la mélittine carboxydiméthylmaléique modifiée (CDM) consiste à déstabiliser les membranes endosomales après avoir été clivée dans un environnement acide. Ainsi, la mélittine peut s'échapper des endosomes grâce à sa

structure hélicoïdale qui favorise la fusion et la perméabilisation membranaire (Tai et Gao, 2017). D'autres peptides fusogènes riches en acide glutamique permettant la déstabilisation des phospholipides membranaires à pH acide ont fait leur apparition, comme le peptide E5CA (GLFEAIAEFIEGGWEGLIEGCA) ou le peptide GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) par exemples (Subbarao et al., 1987; Midoux et al., 1995). En effet, à pH acide (5.5 à 5.0), la protonation des acides glutamiques de ces peptides entraîne l'apparition d'hélice α au sein de leur structure. Ce changement de conformation provoque la déstabilisation des membranes. Cependant, il a été montré, notamment pour le peptide E5, que ce pouvoir fusogène est perdu en présence de sérum ou lorsque les peptides sont greffés sur de la polylysine (Midoux et al., 1995).

Sur le même principe, des caractéristiques fusogènes ont été recherchées pour les lipides. C'est dans cette optique que les co-lipides comme le DOPE, le DOPC et le cholestérol ont été testés. Ces lipides sont capables de former des structures de phase H_{II} qui induisent des réarrangements moléculaires menant à la fusion avec la bicouche lipidique, à une température supérieure à 5-10°C. C'est pourquoi, la plupart des liposomes cationiques ont comme co-lipide la DOPE qui change de conformation (structure lamellaire à structure hexagonale) et favorise la fusion membranaire dans les endosomes.

Des bases faibles telles que la chloroquine, ont été utilisées pour induire une déstabilisation membranaire par un autre mécanisme appelé « effet éponge à proton » (Zenke et al., 1990; Midoux et al., 1993). L'accumulation de la chloroquine dans les

vésicules endosomales tamponne l'environnement acide dans le lysosome en piégeant les protons. Le pompage des protons provoque en contrepartie un gonflement osmotique des vésicules par la création d'un influx d'ions chlorures et d'eau. La libération des complexes dans le cytosol a lieu au moment de l'éclatement de la vésicule (figure 24).

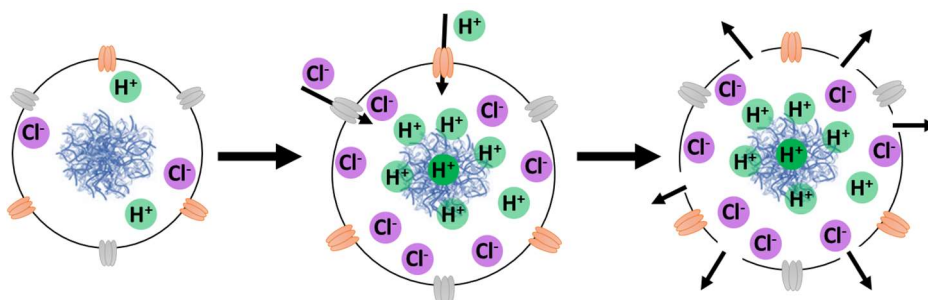


Figure 24 : Schéma du mécanisme d'éponge à protons. La protonation du polymère cationique (bleu) engendre un influx d'ions dans les vésicules endosomales. L'augmentation de la pression osmotique provoque le gonflement de la vésicule puis la rupture de sa membrane. Figure adaptée de (Pack *et al.*, 2005).

L'échappement endosomal des polymères ou des liposomes peut être amélioré par le greffage de molécules capables d'être protonées à pH 6.0, comme l'histidine, afin de favoriser un mécanisme d'éponge à protons. C'est le cas des poly-L-lysines qui sont des polymères cationiques à pH physiologiques dont l'efficacité de transfection est faible. Cependant, la substitution des poly-L-lysines avec des groupements histidines, caractérisés par un cycle imidazole et capables d'agir comme une base faible à pH 6.0, a montré que ce type de polymère se complexe à l'ADN et améliore l'efficacité de transfection d'un facteur 3 à 4,5 par rapport aux polylysines classiques dans les cellules HepG2 (Midoux et Monsigny, 1999).

Ce mécanisme d'éponge à protons concerne naturellement les vecteurs synthétiques cationiques avec un fort pouvoir tampon (Pack *et al.*, 2005; Munsell *et al.*, 2016). C'est-à-dire ceux qui possèdent des groupements amines secondaires et tertiaires dont le pKa est situé entre 5 et 7. Par exemple, la PEI possède des amines protonables, capables d'agir comme une base faible en milieu acide (Boussif *et al.*, 1995; Demeneix *et Behr*, 2005). Dans le but d'augmenter cette propriété de déstabilisation membranaire, des substitutions de la PEI avec des groupements histidines ont été réalisés (Bertrand *et al.*, 2011). Ces études ont montré que l'ajout de 16% d'histidine sur la IPEI diminue la cytotoxicité du polymère et augmente l'effet tampon par rapport à la IPEI. Cette insertion favorise et améliore l'efficacité de transfection d'un facteur 1000 dans les cellules HEK293T et d'un facteur 100 dans les cellules HeLa (Bertrand *et al.*, 2011).

Les peptides riches en acides aminés cationiques sont capables de se complexer aux acides nucléiques (Ni *et al.*, 2019). Par exemple, le peptide cRGD-[(H)KKKK]₆ est composé de résidus histidines, pour favoriser la délivrance cytosolique, d'un domaine oligolysine qui permet la liaison à l'ADN, et d'un signal de reconnaissance des tumeurs avec le peptide cyclo RGD (Aoki *et al.*, 2001). Le peptide amphiphile LAH4, riche en alanine et leucine, possède des lysines qui permettent de condenser l'ADN et des histidines qui favorisent l'échappement endosomal (Midoux *et al.*, 2009). Le peptide Tat, issu du VIH, est connu pour améliorer l'internalisation de beaucoup de molécules dont les acides nucléiques. Cependant, il est incapable de délivrer l'ADN dans le cytosol et les complexes qu'il forme sont instables car ce peptide possède peu de charges cationiques. Lorsque 10 histidines sont conjuguées de manière covalente au peptide Tat (Tat-10H), l'efficacité de transfection est améliorée d'environ 7 000 fois par rapport au contrôle sans

histidine (Lo et Wang, 2008). Il a également été montré que l'efficacité de transfection des peptides cationiques peut être améliorée lorsque les histidines sont regroupées en cluster. En effet, le peptide (KKKHHHHKKK)6-FGF-2 est capable de condenser l'ADN en particules stables d'environ 150 nm et son efficacité de transfection est 5 fois supérieure à celle du peptide (KHKHKHKHKK)6-FGF-2 (Canine et al., 2008).

En comparaison aux polymères, les peptides riches en lysine ou en histidine sont plus homogènes mais leur capacité de condensation est plus faible. De plus, leur petite taille limite leur stabilité (Midoux et al., 2009). Ils sont parfois associés à des fonctions hydrophobes pour augmenter la stabilité du polyplexe, comme la chaîne alkyl des lipides telle que la séquence MPG dérivée de la protéine gp41 du VIH (Ni et al., 2019).

Des lipides avec une tête polaire histidine ou imidazole sensibles à l'acidification des vésicules endosomales ont été développés (Mével et al., 2008; Midoux et al., 2009). C'est le cas du lipide lip100, composé de MM27 et de KLN25 (Mével et al., 2008; Billiet et al., 2012), et du lipide 1,2-di-palmitoyl-deoxyglycerol (4-(2,3-bis-palmitoyloxy-propyl)-1-methyl-1H-imidazole(DPim)). Il a été montré que l'efficacité de transfection des lipoplexes à base de Lip100 et DPIm/DOPE est au moins 5 fois supérieure à celle des lipoplexes à base de DOTMA/DOPE dans les cellules NIH 3T3, qui sont des cellules de fibroblastes d'embryons de souris, mais également dans les cellules HeLa, HEK293 et COS1 (Budker et al., 1996; Mével et al., 2008). Parmi les lipides ionisables, on retrouve le DOSPA qui porte des groupements amines secondaires qui ont un effet d'éponge à protons (Yue et al., 2011; Ni et al., 2019).

2.2.4 Migration cytosolique

Après l'échappement endosomal, l'état de complexation des acides nucléiques à leur vecteur (liposomes ou polymères cationiques) est une question qui n'est pas encore éclaircie. Si les ARNs doivent être relâchés dans le cytosol, les ADNs doivent atteindre le noyau. Or, des expériences de PCR et de microscopie ont montré que les liposomes permettent de délivrer 2 000 à 100 000 plasmides par cellule mais seulement 1 à 10% atteignent le noyau (Cohen *et al.*, 2009; Bai *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2019). Cela s'expliquerait par la présence de nucléases dans le cytosol (Lechardeur *et al.*, 1999b) et/ou par la viscosité de l'environnement qui restreindrait les mouvements des molécules d'ADN >2 kpb (Lukacs *et al.*, 2000b).

Peu de données, démontrant les mécanismes précis de migration des complexes polymères/ADN ou liposomes/ADN pour atteindre le noyau, ont été publiées. Cependant, des auteurs ont caractérisés deux phases de migration pour les lipoplexes et les polyplexes par imagerie cellulaire et notamment par le traçage de particule unique. La première catégorie correspond à des mouvements rectilignes et relativement rapides qui correspondraient à un transport vésiculaire des complexes (Ni *et al.*, 2019). Il a été rapporté que la vitesse dépend du type de vésicule. Effectivement, les vésicules issues de l'endocytose à clathrine ont une vitesse d'environ 0,7 $\mu\text{m/s}$ (King et Schroer, 2000) ce qui correspond à la vitesse relevée pour les polyplexes PEI dans les cellules HuH7 (Bausinger *et al.*, 2006) contrairement aux polyplexes PEG-PLL, connus pour emprunter la voie d'endocytose à cavéole, caractérisés par une vitesse d'environ 0,09 à 0,11 $\mu\text{m/s}$ (Kim *et al.*, 2012). Il a été montré que la rectitude de la trajectoire des complexes contenus

dans des vésicules est due au recrutement du cytosquelette, et notamment du réseau de microtubules (Ni *et al.*, 2019).

La seconde catégorie correspond à des mouvements browniens relativement lents caractéristiques du phénomène de diffusion de particule et concernerait les complexes sortis des vésicules intracellulaires.

2.2.5 Franchissement de l'enveloppe nucléaire

A proximité du noyau, l'ADN doit franchir l'enveloppe nucléaire qui est très sélective aux molécules >9nm. Les molécules <9nm diffusent librement à travers l'enveloppe nucléaire. Dans cette enveloppe nucléaire, les complexes nucléoprotéiques (NPC) forment des pores à travers l'enveloppe pour importer ou exporter les macromolécules identifiées par un signal d'entrée ou de sortie (Panté et Kann, 2002; Ni *et al.*, 2019). Il a été observé que les molécules d'ADN rentrent plus facilement dans le noyau après la mitose car au cours de ce processus de division cellulaire, l'enveloppe nucléaire se déstabilise et facilite ainsi l'internalisation des fragments d'ADN dans l'environnement proche. Ainsi l'efficacité de transfection chute fortement lorsque la transfection est réalisée avec des cellules qui ne se divisent pas (Kirchenbuechler *et al.*, 2016; Ni *et al.*, 2019).

Dans le contexte de la thérapie génique, la copie fonctionnelle du gène est complexée à un vecteur permettant de franchir les barrières extra- et intracellulaires afin d'atteindre le noyau de la cellule cible et éventuellement s'intégrer dans le génome. Les polymères et les liposomes cationiques se complexent aux acides nucléiques, facilitent

le franchissement de la membrane plasmique, l'échappement endosomal et favorisent la résistance des acides nucléiques face aux nucléases. Cependant, leurs applications cliniques sont limitées par leur faible efficacité de transfection, qui est bien inférieure à celle des vecteurs viraux. Il semblerait que cette faiblesse soit principalement liée à leurs déplacements intracellulaires limités.

2.3 Optimisation de l'ADN plasmidique favorise le transport intracellulaire

L'équipe dans laquelle j'ai effectué mon travail de thèse, cherche à optimiser des systèmes non viraux pour faciliter la délivrance d'acides nucléiques, en s'inspirant des mécanismes d'infection des virus (figure 25). Dans le cadre du transfert de gènes, les différents travaux ont conduit notamment à la préparation d'un polymère très efficace, la IPEI partiellement histidinylée aussi appelée PTG1, permettant de former des polyplexes qui protègent l'ADN de la dégradation par les DNases et qui facilite son internalisation dans les cellules et surtout l'échappement des endosomes par la présence de groupements histidines greffés sur la IPEI (Bertrand *et al.*, 2011). Cependant, l'efficacité de transfection de ce polymère reste encore inférieure à celle des vecteurs viraux. Cette moindre efficacité serait liée au trafic intracellulaire du plasmide après l'étape d'endocytose et de l'échappement endosomal. Pour ces étapes, les vecteurs polymères ou liposomes ne seraient pas essentiels pour le transport dans le cytosol et l'importation nucléaire du plasmide. L'efficacité de transfection pourraient être améliorée en équipant directement le plasmide de signaux spécifiques. Néanmoins, peu de données ont été obtenues sur l'état de complexation du plasmide à la sortie des endosomes et dans le cytosol. Est-il libre ou encore complexé à son vecteur ? Dans le cas où le plasmide ADN ne serait plus complexé, sa taille serait un facteur limitant sa mobilité et son transport

dans le noyau. Certains auteurs émettent l'hypothèse que les acides nucléiques contenus dans les vecteurs synthétiques seraient libérés dans le cytosol soit par le mécanisme de fusion membranaire des liposomes qui les projetterait dans le cytosol, soit par le désassemblage des polyplexes (Perez Ruiz de Garibay, 2016).

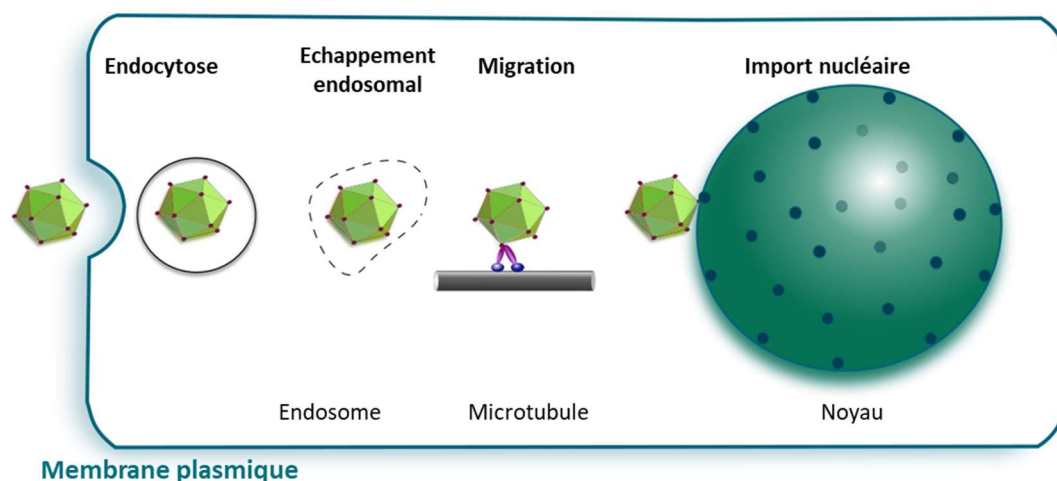


Figure 25 : Mécanisme d'infection d'un adénovirus. L'adénovirus franchit la membrane plasmique en déclenchant une voie d'endocytose puis s'échappe des endosomes en déstabilisant les membranes endosomales. En vue d'atteindre le noyau, le virus interagit avec le complexe moteur de la dynéine pour traverser le cytosol jusqu'au noyau pour y introduire son matériel génétique.

Des études ont montré que les fragments d'ADN de petites tailles <2000 bp diffusent dans le cytoplasme contrairement aux fragments plus grands que 2000 bp (Lukacs *et al.*, 2000a). Cela pourrait s'expliquer par le fait que beaucoup de protéines cytosoliques interagiraient de manière spécifique ou non avec les acides nucléiques. Il a également été mis en évidence que la demi-vie d'une molécule d'ADN est comprise entre 50 et 90 min dans le cytosol des cellules HeLa et Cos (Lechardeur *et al.*, 1999a). C'est pourquoi, certaines équipes dont celle où j'ai effectué ma thèse cherchent à accessoriser le plasmide de manière à améliorer son transport jusqu'au noyau et à éviter sa

dégradation. C'est ainsi que, plusieurs signaux moléculaires ont été identifiés dans l'équipe.

2.4 Migration cytosolique

L'efficacité de transfection peut être limitée par le nombre de copies plasmidiques arrivées jusqu'au noyau. Or, lorsque le plasmide ADN est nu dans le cytosol, sa demi-vie est estimée entre 50 et 90 minutes dans les cellules HeLa et Cos (Lechardeur *et al.*, 1999a) et environ 5 minutes dans les cellules musculaires (Bureau *et al.*, 2004). Cette courte durée de demi-vie dans le cytosol est probablement due à la dégradation des acides nucléiques par des nucléases. De plus, le cytosol est un environnement relativement visqueux dû à la présence de nombreuses protéines et du cytosquelette, et notamment du réseau d'actine (Dauty et Verkman, 2005) qui limite les déplacements des molécules d'ADN >2000pb et immobilise quasiment les mouvements des plus grandes molécules (Lukacs *et al.*, 2000a). Cependant, des études ont montré que des interactions avec des protéines karyophiliques (Wienhues *et al.*, 1987; Kaneda *et al.*, 1989), des protéines d'origine bactérienne (Ziemenowicz *et al.*, 1999) chargées positivement ou des peptides se fixant sur le réseau de microtubules permettent aux plasmides d'atteindre la région périnucléaire (Midoux *et al.*, 2017).

2.4.1 Microtubules

Les microtubules sont des structures tubulaires, dynamiques et polarisées. Il s'agit de structures essentielles aux cellules eucaryotes puisqu'elles interviennent dans l'organisation du cytosol (maintien de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique), l'architecture cellulaire, la ségrégation des chromosomes lors des divisions cellulaires, le

transport des vésicules et des organites, dans la migration cellulaires et dans les mouvements des cils et des flagelles (Minotti *et al.*, 1991; Midoux *et al.*, 2017).

Les microtubules sont composés de 13 protofilaments de tubuline joints latéralement de manière non-covalente (Evans *et al.*, 1985) pour former des structures tubulaires de 25 nm de diamètre et dont chaque micromètre est composé de 1650 hétérodimères (Cytoskeleton). La tubuline est un hétérodimère de deux protéines de 55 KDa appelées α et β tubuline (figure 26). Ces protéines sont codées séparément par des gènes dont la séquence est hautement conservée chez les eucaryotes. La polarisation des microtubules correspond à la polymérisation de la tubuline. *In vitro*, la tubuline peut se polymériser par les deux extrémités. Cependant, la vitesse de polymérisation n'est pas égale aux deux extrémités. L'extrémité « plus » polymérise plus vite que l'extrémité « moins » (Allen et Borisy, 1974). *In vivo*, l'extrémité « plus » est distale (périphérie cellule) du centre organisateur des microtubules les MTOCs où se trouve le pôle négatif (Cytoskeleton). Le pôle négatif des microtubules est composé uniquement de sous-unité α contrairement au pôle positif composé de sous-unité β .

Chaque protofilament correspond à une chaîne hélicoïdale de tubuline α et β . Les deux sous-unités sont capables de lier le GTP mais seul la sous-unité β hydrolyse le GTP en GDP + Pi (David-Pfeuty *et al.*, 1977; Spiegelman *et al.*, 1977; MacNeal et Purich, 1978). Des mécanismes de régulation sont mis en place pour établir une balance entre polymérisation et dépolymérisation selon le stade du cycle cellulaire. Les microtubules sont régulés par des protéines associées aux microtubules (MAPs, stabilisatrices comme la protéine tau pour la polymérisation ou la stathmine pour la dépolymérisation) et des protéines motrices (la dynéine et la kinésine).

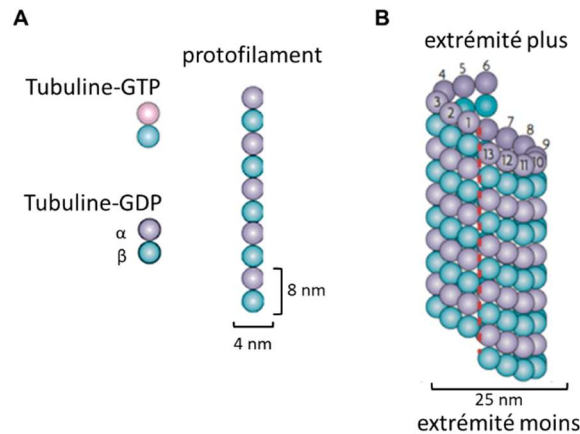


Figure 26 : Composition et structure des microtubules. La tubuline est un hétérodimère de deux protéines de 55Kda appelées α et β tubuline. Ces protéines sont codées séparément par des gènes dont la séquence est hautement conservée dans le règne des eucaryotes. D'abord la tubuline forme des protofilaments puis des microtubules composés de 13 protofilaments joints latéralement de manière non-covalente (Evans et al 1985). Les microtubules sont des structures ordonnées en fibres qui ont une polarité intrinsèque, (Cytoskeleton). La polarisation des microtubules est due à la polymérisation de la tubuline. *In vitro*, la tubuline peut se polymériser par les deux extrémités. Cependant, la vitesse de polymérisation n'est pas égale aux deux extrémités. L'extrémité « plus » polymérise plus vite que l'extrémité « moins » (Allen & Borisy 1974). *In vivo*, l'extrémité « plus » est distale (périphérie cellule) du centre organisateur des microtubules les MTOCs où se trouve le pôle négatif (Cytoskeleton).

La dynéine et la kynésine correspondent à deux familles de complexes protéiques moteurs. Ces complexes protéiques guident certaines vésicules et certains organites à travers le cytosol. La tête des complexes interagit avec les microtubules et leur queue avec les vésicules. La kinésine migre vers le pôle positif (*i.e.* vers la périphérie de la cellule) alors que la dynéine migre de manière rétrograde vers le pôle négatif (*i.e.* vers le noyau). Dans le contexte du transfert de gènes, la dynéine est particulièrement intéressante. Il existe plusieurs isoformes de dynéines, organisées sous formes de complexes macromoléculaires de chaînes lourdes, intermédiaires et légères. La dynéine 1 est l'isoforme majeur dans le cytoplasme des cellules eucaryotes (Midoux *et al.*, 2017). Tandis que l'isoforme 2 est limitée au transport des molécules dans les cils et les flagelles (Petrantoni *et al.*, 2020).

Le complexe dynéine 1 est localisée dans le cytoplasme de cellules au niveau des microtubules. Ce complexe joue un rôle dans le transport des éléments de l'appareil de Golgi, des lysosomes et dans le recyclage des endosomes (Höök et Vallee, 2006). Il s'agit d'un complexe de 1 à 2 MDa composé de 6 polypeptides différents tous présents en deux copies : une chaîne lourde (DHC ; DYNC1H1), deux chaînes intermédiaires (DIC ; DYNC1IC1 et 2), deux chaînes intermédiaires légères (DLIC ; DYNC1LI1 et 2) et trois chaînes légères (DLC) : Robl (DYNLRB1 et 2), LC8 (DYNLL1 et 2) et Tctex (DYNLT1 et 3) (figure 27).

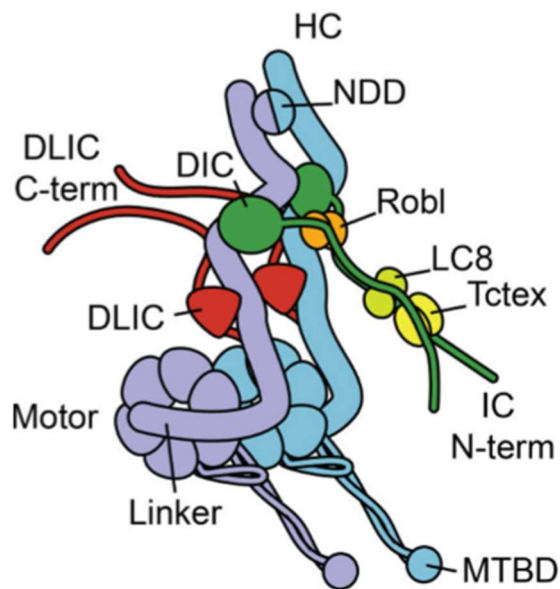


Figure 27 : Le complexe de la dynéine. Une chaîne lourde (DHC ; DYNC1H1) : 4634 acides aminés de long, C-ter = domaine moteur, N-ter = domaine contenant un domaine de dimérisation (1-200), région composée de 9 hélices (201-1420), domaine moteur composé d'un linker en hélice, un anneau de 6 domaines AAA+ suivi d'un domaine de liaison aux microtubules (MTBD) et un domaine C-ter. Deux isoformes de chaînes intermédiaire (DIC ; DYNC1IC1 et 2) contenant un domaine WD40 qui se lie aux hélices 4 et 5 de DHC, composé de 230 résidus en N-ter qui interagissent avec le dimère DLC. Deux isoformes de chaînes intermédiaires légères (DLIC ; DYNC1LI1 et 2) qui possèdent un domaine Ras-like qui se lie aux hélices 6 et 7 de DHC, DLIC est accroché à DHC en plus par ses hélices $\alpha 1$ et $\alpha 13$ au niveau des hélices 8 et 5, respectivement, de DHC, les deux DLIC ont un C-ter d'environ 130 acides aminés et forment 2 hélices α ($\alpha 14$ et $\alpha 15$), l'extrémité C-ter de DLIC interagit avec les adaptateurs mais aussi directement avec les cargos et deux isoformes de 3 familles de chaînes légères (DLC) : Robl (DYNLRB1 et 2), LC8 (DYNLL1 et 2) et Tctex (DYNLT1 et 3). Robl se lie à WD40 de DIC. Figure adaptée de (Reck-Peterson *et al.*, 2018).

La machinerie de transport impliquant la dynéine correspond plus précisément à un ensemble composé i) du complexe de la dynéine, ii) du complexe de la dynactine (Gill *et al.*, 1991; Schroer et Sheetz, 1991) et iii) des adaptateurs activateurs contenant des motifs superhélices (exemple BICD2) (Reck-Peterson *et al.*, 2018). Les virus, notamment les adénovirus, interagissent avec le complexe de la dynéine de manière directe ou indirecte (Leopold *et al.*, 2000; Bremner *et al.*, 2009). Les liaisons directes sont établies entre un domaine du complexe de la dynéine et les protéines de la capsid virale. Il a été montré par immunoprécipitation que les protéines de la capsid des adénovirus, appelées hexons, interagissent de manière directe avec la dynéine et notamment avec DLIC et DIC (Suomalainen *et al.*, 1999; Bremner *et al.*, 2009). Les liaisons indirectes se font par l'intermédiaire des endosomes. En effet, certains virus comme les AAV se font transporter à travers le cytosol à l'intérieur des endosomes. Des expériences de co-localisation ont mis en évidence ce phénomène qui dépendrait des glycoprotéines de l'enveloppe virale (Castle *et al.*, 2014). Cependant, les mécanismes ne sont toujours pas totalement éclaircis (Reck-Peterson *et al.*, 2018).

2.4.1.1 Dynéine et transfert de gènes

La densité du cytoplasme nécessite que les plasmides utilisent un moyen de déplacement actif pour atteindre le noyau (Munsell *et al.*, 2016). Afin de résoudre cette problématique, des stratégies ont été développées pour ajouter des fonctionnalités aux vecteurs synthétiques pour que les complexes migrent le long des microtubules. Par exemple, lorsque le peptide (KSSQDKSTQTTGD) issu de la protéine virale RPP-139-174 est greffé sur un complexe ADNp/stearoyl-CH₂R₄H₂C par un pont disulfure (Tanaka *et al.*, 2011), l'efficacité de transfection est améliorée d'un facteur 3. Par rapport au

complexe PEI/ADN, un gain équivalent à un facteur 10 a été rapporté lorsque des protéines virales issues des hexons adénoviraux sont greffées sur un polymère de type PEI de 800 kDa (Carlisle *et al.*, 2001). Il existerait d'autres protéines, telle que la protéine L2 issue de la capside d'un papillomavirus (Florin *et al.*, 2006) qui seraient susceptibles de faciliter le transport des transgènes jusqu'au noyau.

D'autres auteurs, privilégiant l'existence d'une dissociation du complexe vecteur-ADN dans le cytosol, ont développé des systèmes capables d'interagir d'une part avec l'ADN et d'une autre part avec les microtubules ou la dynéine. C'est le cas de la protéine hybride LD4 composée d'un domaine de liaison à l'ADN (domaine DNAb4 : WRRRGFGRRR) fusionné avec la partie N-terminale d'une des chaînes légères de la dynéine, la chaîne LC8. Bien que cette stratégie améliore d'un facteur 10 l'efficacité de transfection de la lipofectamine, aucune interaction avec les microtubules n'a été prouvée (Toledo *et al.*, 2012). D'autres auteurs ont associé la protéine Rp3, un membre de la famille des chaînes légères Tctex de la dynéine, à la protéine TCTEX-1 (King, 2000), mais aucune preuve d'interaction avec le réseau de microtubules n'a été fournie.

Des expériences *in vitro* et *in cellulo* ont montré que des plasmides possédant des éléments de séquences du facteur de transcription CREB avaient une vitesse de migration sur les microtubules comprise entre 150 et 380 nm/s contre 50 nm/s pour des plasmides qui ne possèdent pas ces éléments (King et Schroer, 2000; Mesika *et al.*, 2005; Salman *et al.*, 2005; Vaughan et Dean, 2006; Ondrej *et al.*, 2007). Des expériences *in vitro* ont mis en évidence la liaison entre les plasmides et les microtubules grâce au facteur de transcription CREB et au complexe de la dynéine (Badding *et al.*, 2012).

Notre équipe a montré l'intérêt de la protéine E3-14.7K et sa capacité d'interagir avec la protéine FIP-1 pour augmenter la migration cytosolique d'un plasmide et obtenir une meilleure transfection (Pigeon *et al.*, 2013).

2.4.1.2 E3-14.7K

E3-14.7K est une protéine multifonctionnelle retrouvée dans plusieurs sérotypes d'adénovirus (Horton *et al.*, 1991a). Elle est exprimée durant la phase précoce de l'infection. Sa taille varie entre 122 acides aminés chez l'Ad40 à 136 acides aminés chez l'Ad3. Cependant, la séquence est largement conservée entre les différents sous-groupes. Cette protéine joue un rôle dans l'inhibition de l'apoptose induite par le TNF α lors de l'infection virale. Elle protège la cellule infectée, indépendamment des autres protéines adénovirale, contre la lyse cytosolique et l'apoptose induite par le TNF α (Gooding *et al.*, 1988; Gooding *et al.*, 1990; Horton *et al.*, 1991a; Krajcsi *et al.*, 1996), Fas ligand (Chen, 1998) et le *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (Tollefson *et al.*, 2001). Cet effet a également été montré *in vivo* (Tufariello *et al.*, 1994; Pierce *et al.*, 2003). E3-14.7K inhiberait l'internalisation du récepteur au TNF α induite par le TNF- α mais n'agirait pas sur le contrôle du récepteur TNF- α (Horton *et al.*, 1991b; Chen *et al.*, 1998).

La protéine E3-14.7K est localisée dans le cytoplasme, plus précisément dans la région périnucléaire et parfois au niveau de la membrane plasmique ou dans le noyau (Li *et al.*, 1997; Li *et al.*, 1998). Cette protéine forme des complexes avec les protéines FIPs, et notamment la protéine FIP-1 (*Fourteen interacting protein 1*) dans le cytoplasme et en périphérie du noyau un membre de la super famille des GTPases (Li *et al.*, 1997). Bien

que le rôle de cette interaction ne soit pas éclairci, il a été montré que le complexe E3-14.7K/FIP-1 interagit avec les microtubules via la chaîne légère de la dynéine TCTEL1 *in cellulo* (Lukashok *et al.*, 2000). De plus, des expériences de BRET, menées au laboratoire, ont montré que cette interaction a lieu au niveau d'un motif d'environ 20 acides aminés présent dans la partie C-terminale de E3.14-7K.

2.4.1.3 FIP-1

La protéine FIP-1 joue un rôle d'adaptateur entre un composant de la chaîne légère de la dynéine, DYNLT1/TCTEL1/TCTEX1 (UniProtKB - P63172 (DYLT1_HUMAN)), et la protéine E3-14.7K (Lukashok *et al.*, 2000). FIP-1 est une petite GTPase connue sous le nom de RagA ou R Rag pour *Ras-related GTP-binding protein A*. Cependant, elle n'est pas décrite pour être directement impliqué dans la signalisation apoptotique (Li *et al.*, 1997). Son interaction avec TCTEL1 permet aux macromolécules de migrer le long des microtubules jusqu'au noyau de la cellule (Tai *et al.*, 1999; Mueller *et al.*, 2002). En 2000, Lukashok et son équipe ont montré *in vitro* que FIP-1 joue un rôle d'adaptateur entre E3-14.7K et TCTEL1 de manière indépendante de l'addition de TNF- α (Lukashok *et al.*, 2000).

Dans les cellules de mammifère, les interactions entre E3-14. K, FIP-1 et TCTEL1 non pas été trop documentées. Cependant, il a été observé que l'interaction entre FIP-1 et TCTEL1 par co-immunoprecipitation et immunomarquage dans des cellules HEK 293T (cellules embryonnaires humaines de rein) et dans les cellules A549 (cellules de carcinomes pulmonaires humains) (Lukashok *et al.*, 2000). Au sein de l'équipe, l'étude de l'interaction entre E3-14.7K et FIP-1 a permis de déterminer par des expériences de

BRET que la séquence peptidique contenant les acides aminés 79 à 98 (peptide P78-98 ou P4) de E3-14.7K est responsable de cette interaction. Puis, le peptide P4 (VVMVGEKPITITQHSVETEG) a été greffé aux plasmides ADN par un pont streptavidine-biotine (figure 28 A et B) dans le but d'évaluer son impact sur la migration intracellulaire des plasmides et sur leur efficacité de transfection. A l'aide de la microscopie confocale, les interactions entre le peptide P4 et les microtubules/FIP1 ont été mis en évidence (figure 28C). Des analyses par cytométrie en flux ont montré que la présence du peptide P4 améliore l'efficacité de transfection (figure 28D). Ces données soulignent l'intérêt du greffage du peptide P4 sur des plasmides ADN pour améliorer leur efficacité de transfection, via une migration le long des microtubules en direction du noyau grâce à l'interaction entre P4, FIP-1 et TCTEL1.

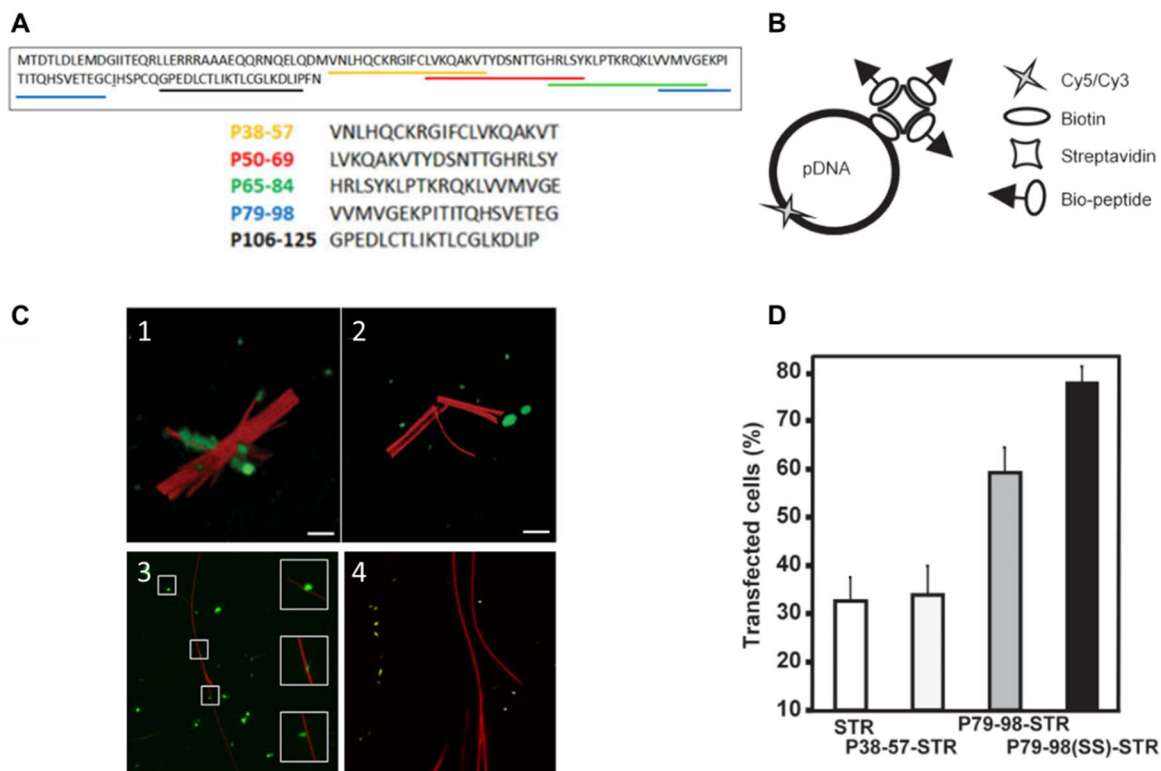


Figure 28 : Le peptide P79-98 favorise le transport des plasmides ADN le long des microtubules. (A) Séquence en acides aminés de la protéine adénovirale E3-14.7K et liste des peptides étudiés entre la position 38 et 125 de la protéine E3-14.7K. (B) Schéma de l'assemblage d'un plasmide biotinyllé, marqué à la cyanine 3/5, avec un peptide biotinyllé (ici, P79-98 ou P4) par un pont streptavidine. (C) Interaction du peptide P4 avec les microtubules isolés. Les microtubules isolés, marqués à la rhodamine (rouge), ont été polymérisés in vitro puis incubés avec des plasmides couplé avec le peptide P4 (n°1), avec la streptavidine (n°2) ou avec des Qdots-streptavidine (vert) conjugués avec le peptide P4 biotinyllé (bio-P79-98: VVMVGEKPITITQHSVETEG-Ttds-biotine; n°3) ou avec un peptide contrôle (bio-P38-57: VNLHQCKRGIFCLVKQAKVT-Ttds-biotine; n°4). Echelle de taille : 5µm. (D) Efficacité de transfection des plasmides eGFP conjugués soit à la streptavidine soit avec P79-98-streptavidine, au peptide P38-57-streptavidine ou au peptide P79-98(SS)-streptavidine. P79-98 = peptide P4 et P38-57 = peptide P1/contrôle négatif. Figures issues de (Pigeon Lucie, 2013) et (Midoux *et al.*, 2017).

2.4.2 Passage de l'enveloppe nucléaire

2.4.2.1 Généralités

Le passage de l'enveloppe nucléaire est un autre point clé du transfert de gènes, notamment en absence de division cellulaire. L'impact de l'enveloppe nucléaire dans la transfection a été mis en évidence par des expériences de micro-injection. Les résultats indiquent que l'expression des plasmides micro-injectés dans le cytoplasme n'était pas

détectée, contrairement aux plasmides injectés directement dans le noyau (Bai *et al.*, 2017).

Cependant, les virus à ADN ont acquis des mécanismes leur permettant de franchir l'enveloppe nucléaire et d'introduire leur génome dans le noyau en vue de leur réplication. L'enveloppe nucléaire est une double membrane qui maintient la forme et la taille du noyau. Il s'agit d'une barrière sélective dans laquelle se situent des complexes protéiques, appelés complexes des pores nucléaires NPC, qui empêchent le flux des grosses molécules et régulent le transport nucléocytoplasmique (Mettenleiter, 2016) (figure 29). En effet, il est connu que les petites molécules, notamment les protéines cytosoliques de taille inférieure à 8-9 nm (soit environ 40-60 kDa), franchissent l'enveloppe nucléaire par simple diffusion et les plus grandes molécules traversent cette enveloppe par des mécanismes de transport actif au niveau des pores nucléaires et par le recrutement de récepteurs solubles cytosoliques comme les karyophérines et les importines β qui reconnaissent les séquences de localisation nucléaire (NLS) présentes dans la séquence de ces protéines.

L'enveloppe nucléaire est composée de lamina, d'une double membrane (double bicouche phospholipidique ; une membrane interne (INM) et une externe (ONM) qui communique avec le RE) et des pores nucléaires (Martins *et al.*, 2020). Les pores nucléaires par lesquelles transitent les molécules sont composés de protéines appelées nucléoporines (Nups) (Terry et Wentz, 2009; Knockenhauer et Schwartz, 2016), formant des complexes tels que Nup107-160, Nup93-205, Nup214, Nup98, Nup62, Nup50, Nup153 et Tpr, et de trois protéines transmembranaires Ndc1, Pom121 et Gp210 qui les

maintiennent dans l'enveloppe nucléaire (D'Angelo et Hetzer, 2008; Martins *et al.*, 2020).

Il existe huit filaments cytosoliques qui émanent librement du cercle protéique présent dans la membrane externe et qui sont composés des protéines Nup358, Nup214 et Nup98. Les filaments présents du côté nucléaire, au niveau de la membrane interne, forment un panier composé entre autres des protéines Nup153, Nup50 et Tpr.

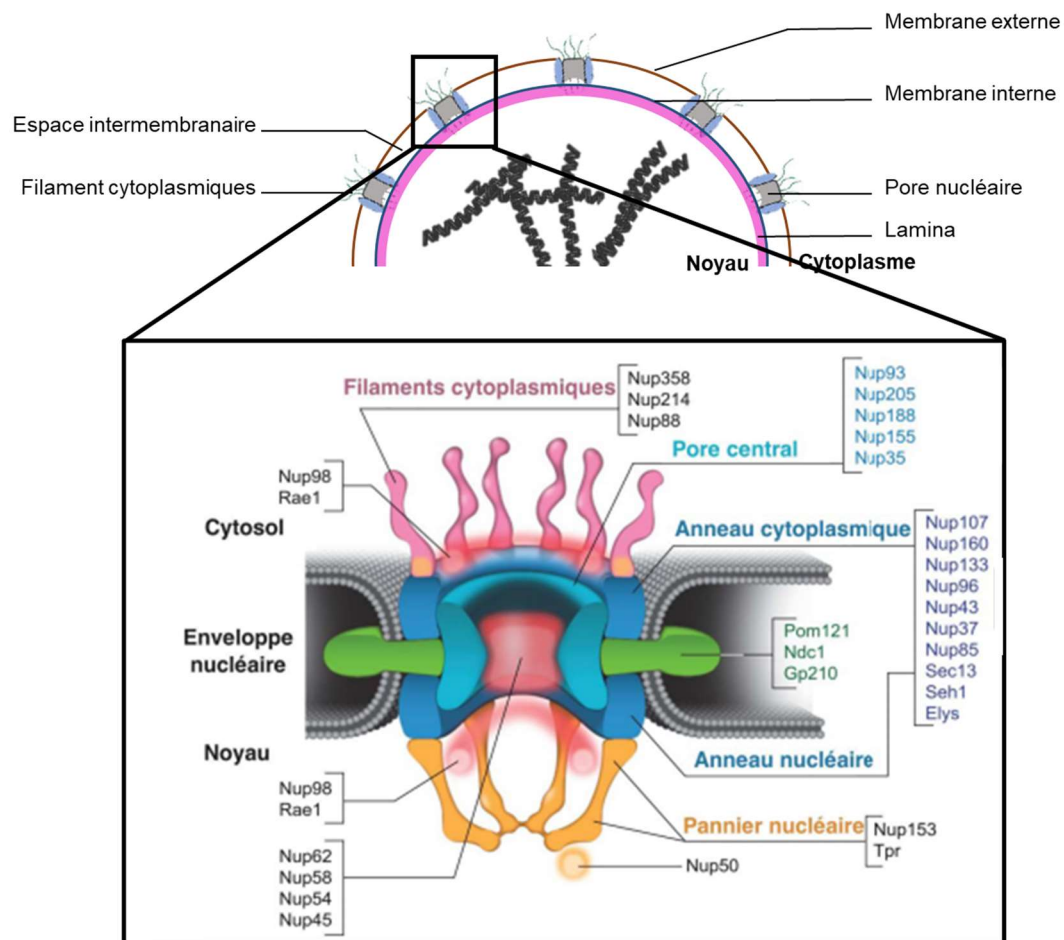


Figure 29 : Composition de l'enveloppe nucléaire. L'ADN contenu dans le noyau est isolé du cytoplasme grâce à l'enveloppe nucléaire imperméable, composée d'une membrane externe, une membrane interne. La lamina est impliquée dans la structure de l'enveloppe nucléaire. Les pores nucléaires permettent le transport sélectif des molécules à travers l'enveloppe. La structure et la composition moléculaire d'un pore nucléaire est représentée dans l'insert. Figure adaptée de (Ibarra et Hetzer, 2015).

Bien que les petits virus de la famille des *Parvovirus* franchissent l'enveloppe nucléaire directement, sans interagir avec les protéines du NPC et sans se désassembler, les autres familles de virus à ADN introduisent leur matériel génétique dans le noyau par un mécanisme composé de deux grandes étapes : l'amorçage et l'interaction avec les protéines des NPC suivi par le relargage de l'ADN dans le noyau (Greber et Fornerod, 2004). D'abord, les virus s'amorcent à la surface des NPC en interagissant avec les filaments cytoplasmiques de manière directe ou indirecte via les importines qui jouent un rôle d'adaptateur entre les protéines virales et les protéines Nups. Par exemple, les virus de la famille des *Hepadnaviruses*, comme l'Hépatite B, recrutent les importines grâce aux séquences NLS présentes dans les protéines de leur capsid avant d'être immobilisés dans le NPC. Au contraire, les protéines présentes dans les hexons des adénovirus interagissent directement avec les protéines Nups, notamment Nup214. Dans le cas des lentivirus, l'amorçage dépend de quelle protéine du complexe de préintégration (PIC) des lentivirus est reconnue et par qui. Par exemple, l'intégrase, présente dans le PIC des lentivirus, interagit avec Nup153. Cependant, les recrutements des importines α , β , l'importine-7 et la transportine-3 ont également été décrits.

Alors que les *Hepadnaviruses* délivrent leur ADN par un mécanisme d'injection, peu décrits, sans se désassembler, les adénovirus libèrent leur génome après le désassemblage de leur capsid. Le désassemblage de la capsid repose sur des interactions entre les protéines qui la composent et à la fois avec la kinésine-1 cytosolique et avec les protéines Nup du NPC. D'un côté la capsid est immobilisée dans le NPC par ses interactions avec les protéines Nups et d'un autre coté la capsid est étirée par la

force de traction de la protéine motrice, kinésine-1. Finalement, le désassemblage de la capside des adénovirus résulte des forces de tractions sur la capside et d'une déformation du NPC, ce qui aboutit à la libération de l'ADN dans le NPC, puis dans le noyau (Greber et Fornerod, 2004).

Des études concernant l'impact de l'enveloppe nucléaire sur la transfection ont montré que l'expression des plasmides transfectés est 10 fois plus élevée dans les cellules en division en comparaison aux cellules quiescentes (Fasbender *et al.*, 1997). Dans les cellules en division, l'ADN présent dans le cytosol serait introduit de manière passive dans le noyau lors du désassemblage/réassemblage de l'enveloppe nucléaire. En absence de division cellulaire, il a été montré par marquage fluorescent, par hybridation *in situ* ou à l'aide de PNA-fluorochrome, que les plasmides entrent dans le noyau par les pores nucléaires grâce à un transport actif (Dowty *et al.*, 1995; Dean, 1997; Wilson *et al.*, 1999).

Pour le transfert de plasmides dans le noyau, différentes stratégies ont été explorées en leur associant de manière covalente ou non des peptides dérivés de séquences NLS (PKKKRKV), des peptides dérivés des importines ou des ligands dérivés des récepteurs nucléaires hormonaux (Hébert, 2003; Forbes *et al.*, 2015). Le recrutement de protéines endogènes à la cellule a également été envisagé en insérant dans le plasmide des séquences nucléotidiques cibles de certains facteurs de transcription (Bai *et al.*, 2017). Ces séquences sont appelées DTS (*DNA nuclear targeting sequences*). Dean et ses collaborateurs ont identifié une séquence DTS de 72 bp présente dans l'origine de réplication et dans la région promotrice du SV40 qui est

impliquée dans l'import nucléaire des plasmides nus, en absence de division cellulaire (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999). Leurs travaux ont mené à la déduction du mécanisme d'import nucléaire par les facteurs de transcription qui implique une liaison des facteurs de transcription présents dans le cytosol avec les séquences DTS insérées dans le plasmide, puis à la reconnaissance de la séquence NLS des facteurs de transcription par les importines permettant le transport actif à travers les NPCs. Plus tard, des séquences tels que les éléments de réponse aux glucocorticoïdes (GRE) (Dames *et al.*, 2007) ou encore les motifs de reconnaissance au facteur de transcription NF-κB ont été identifiés comme séquences DTS (Mesika *et al.*, 2001; Breuzard *et al.*, 2008; van Gaal *et al.*, 2011) (tableau 19).

Tableau 19 : Exemples de séquences DTS

SV40	5'- GGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' 3'-CCACACCTTTCAGGGGTCCGAGGGGTCTCCGTCTTCATACGTTTCGTACGTAGAGTTAATCAGTCGTTGGT-5'
GRE	5'- GGTACATTTTGTCTAGAACAAAATGTACCGGTACATTTTGTCTGGTACATTTTGTCT-3' 3'-CCATGTAAACAAGATCTTGTTTACATGGCCATGTAAACAAGACCATGTAAACAAGA -5'
NFκB	5'- TGGGGACTTTCCGC-3' 3'-ACCCCTGAAAGGCG -5'
SMGA	Séquence de 176 bp du promoteur de l'actine gamma des muscles lisses (<i>Smooth Muscle Gamme Actine promoter</i>) caractérisée par une spécificité cellulaire (Vacik <i>et al.</i> , 1999)

Ainsi, des études de micro-injection et de FISH ont montré que les plasmides contenant la séquence complète ou partielle de l'enhancer du virus SV40 pénètrent mieux dans le noyau que les plasmides qui ne possèdent pas ces séquences (Dean, 1997; Dean *et al.*, 1999). L'enhancer du virus SV40 possède des motifs de reconnaissance pour 10 facteurs de transcription, dont AP1, AP2, AP3, NF-κB, Oct-1, TEF-I et TEF-II, qui sont exprimés de manière ubiquitaire dans les cellules de mammifères (voir eucaryotes) (Bai *et al.*, 2017).

Si certains facteurs de transcription peuvent être utilisés pour améliorer l'importation nucléaire d'un plasmide, alors le choix des facteurs de transcription spécifiques du type cellulaire ciblé permettrait de réguler l'entrée de l'ADN dans le noyau (Dean *et al.*, 1999). Cette hypothèse a été testée en utilisant un fragment de 176 bp provenant du promoteur SMGA spécifique des muscles lisses, reconnu exclusivement par les facteurs de transcriptions Nkx3.1/3.2 et SRF (*Serum Response Factor*) (Vacik *et al.*, 1999; Miller et Dean, 2008). Cette séquence de recrutement s'est montrée suffisante et essentielle au transport du plasmide dans le noyau (Vacik *et al.*, 1999; Miller et Dean, 2008). Les séquences DTS du SV40 ont permis d'améliorer de 40 à 200 fois l'expression ainsi que le nombre de copies du transgène dans le noyau après une électroporation chez le rat (Young *et al.*, 2003). Idem avec les DTS de SMGA spécifiques des muscles lisses (Young *et al.*, 2008). Il a été montré que des protéines différentes des facteurs de transcription sont capables de favoriser l'import nucléaire de plasmides contenant des séquences DTS comme les importines α/β , Ran, importine 7, RanBP1, RanBP2, des protéines chaperonnes (Hsc70), des histones (H2B), des protéines du cytosquelette, des protéines motrices ou encore des suppresseurs de tumeurs (NM23-H2) (Bai *et al.*, 2017) et pourraient être utiles à l'établissement de nouvelles stratégies.

2.4.2.2 NF- κ B et Séquences 3NF

Le recrutement de protéines endogènes capables de franchir l'enveloppe nucléaire est une stratégie capable d'améliorer l'importation nucléaire des ADN plasmidiques. Parmi ces protéines, le facteur de transcription NF- κ B a été utilisé car son expression est ubiquitaire et qu'il possède un domaine de liaison à l'ADN et un domaine NLS impliqué dans son transport vers le noyau (Mesika *et al.*, 2001). NF- κ B est un

complexe protéique formé à partir des protéines p50 et p65, associées en homodimères p50 ou p65 ou en hétérodimères. La translocation de NF- κ B a lieu en quelques minutes sous certaines conditions. Les dimères NF- κ B (UniProtKB - P19838 (NFKB1_HUMAN)) sont présents dans le cytosol où ils sont séquestrés par une sous-unité I κ B inhibitrice. Lors d'une stimulation des cellules par le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α* , UniProtKB - P01375), cette cytokine se fixe sur son récepteur à la surface de la cellule. Puis, une kinase active la phosphorylation du complexe I κ B. Cette phosphorylation initie le processus de dégradation d'I κ B et la libération des dimères NF- κ B qui transitent vers le noyau. A l'intérieur du noyau, les facteurs de transcription se lient avec une forte affinité ($K_D \sim 10^{-10}$ - 10^{-13} M) aux éléments de séquences κ B situés dans des régions promotrices ou *enhancer* pour activer la transcription des gènes (figure 30).

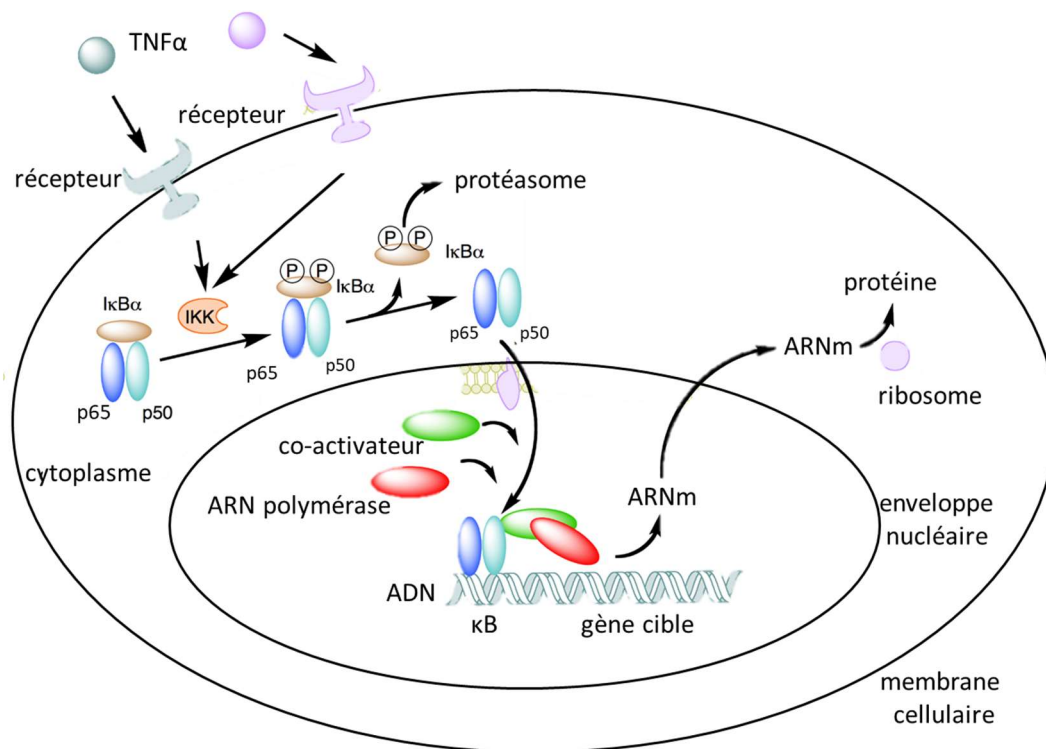


Figure 30 : Schéma de la voie de signalisation NF- κ B. La fixation du TNF α à son récepteur active une kinase responsable de la phosphorylation de la sous-unité I κ B α inhibitrice. Les dimères NF- κ B sont libérés et transitent vers le noyau tant dis que I κ B α est dégradée par le protéasome. Dans le noyau, les dimères se lient aux éléments de séquences κ B pour activer la transcription des gènes cibles.

Deux équipes ont tiré profit de l'affinité de NF- κ B pour ses éléments de réponse en construisant un plasmide possédant plusieurs motifs κ B successifs. Mesika *et al.* ont inséré cinq motifs κ B (5'-GGGGACTTTCC-3') répétés en tandem dans la séquence plasmidique et ont montré une amélioration de 35 fois de l'efficacité de transfection par rapport à un plasmide sans motif κ B dans des cellules stimulées au TNF- α et une augmentation de 2,6 à 5,8 fois, dans des cellules non stimulées (Mesika *et al.*, 2001). En 2005, Mesika *et al.* rapportent que la fixation de NF- κ B sur le plasmide favoriserait également une interaction avec les microtubules via les importines et la dynéine et donc une possible migration du plasmide sur les microtubules (Mesika *et al.*, 2005).

L'équipe où j'effectue ma thèse a développé une séquence originale appelée 3NF contenant 3 motifs κ B (5'-GGGAATTTCC-3') séparés par cinq nucléotides espaceurs qui favorisent la liaison simultanée de trois dimères NF- κ B sur le plasmide ADN. Ces nucléotides espaceurs ont pour but d'éviter les encombrements stériques des dimères entre eux (figure 31 A-C). Le nombre de copies de plasmides a été quantifié après avoir transfecté des plasmides contenant ou non les séquences 3NF, dans cellules HeLa ou C2C12 (Breuzard *et al.*, 2008). Bien que certains auteurs aient rapporté que l'utilisation d'un promoteur CMV, contenant également des motifs NF- κ B, masquerait les effets des DTS et devrait être remplacé par un promoteur faible pour éviter la saturation de la machinerie de transcription (van Gaal *et al.*, 2011), les résultats de la figure 31D indiquent qu'en présence de TNF- α , le nombre de copies plasmidiques est plus élevées lorsque les plasmides possèdent les séquences 3NF (en moyenne 1500 copies/noyau) en comparaison aux plasmides qui en sont dépourvus (en moyenne 250 copies/noyau)

(Breuzard *et al.*, 2008). Les séquences 3NF favorisent donc l'accumulation nucléaire des plasmides 3NF.

La suite de ces travaux a confirmé l'impact des séquences 3NF sur l'import nucléaire et l'expression génique. Il a également été montré que ces séquences 3NF permettent d'augmenter dans le temps l'expression du transgène par rapport aux plasmides sans séquence 3NF, injectés *in vivo* dans des souris (Gonçalves *et al.*, 2009).

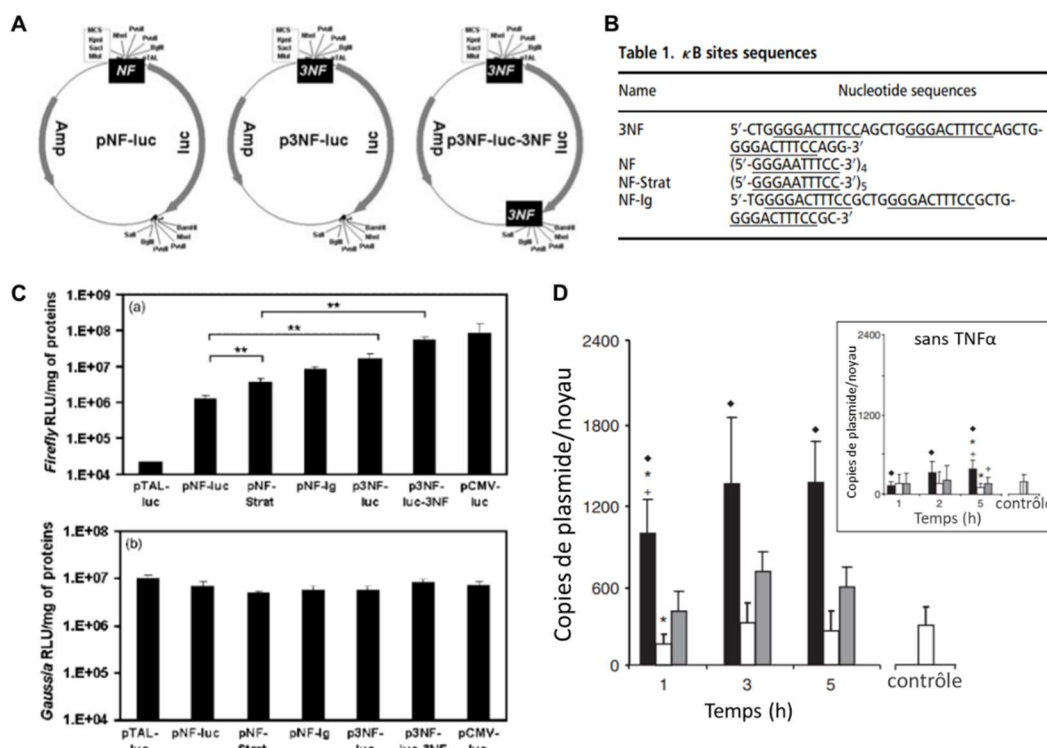


Figure 31 : Les séquences 3NF améliore la délivrance au noyau des plasmides et leur favorise leur expression. (A) Les plasmides contenant les séquences NF ou 3NF. (B) Les séquences des sites κ B. (C) Etude de bioluminescence comparative entre les plasmides contenant les différents motifs κ B. Le plasmide pCMV-Gluc codant la gaussia luciférase a été transfecté dans les cellules HeLa avec chaque plasmide (pTAL-luc, pNF-Luc, pNF-Strat, pNF-Ig, p3NF-luc, p3NF-luc-3NF et pCMV-luc). Les mesures de l'activité de la firefly let de la Gaussia luciférase sont représentées en (a) et (b), respectivement et sont exprimés en RLU/mg de protéines. ** $p < 0,01$. (D) Quantification du nombre de plasmides dans le noyau des cellules HeLa. Les cellules ont été stimulées au TNF α puis incubées avec les polyplexes PTG1/Cy3-p3NF-luc-3NF (noir), ou PTG1/fluor-pTAL-luc (blanc) ou PTG1/Cy3-pCMV-luc (gris). En contrôle, les cellules ont été incubées 5h en présence de polyplexes His-IPEU/fluor-pTAL-luc et His-IPEU/Cy3-pTAL-luc. Les résultats correspondent à la moyenne du nombre de plasmides comptabilisé dans 12 noyaux. Les différences statistiquement significatives les losanges noirs, les astérisques et les croix selon des tests de Student avec un $p < 0,01$. Figures issues de (Gonçalves *et al.*, 2009) et (Breuzard *et al.*, 2008).

L'optimisation de transfert de gènes, présentée dans mon projet, s'appuie sur l'utilisation de signaux moléculaires, qui sont le peptide P78-98 et la séquence 3NF impliqués respectivement dans la migration cytosolique le long des microtubules et dans l'importation nucléaire, dans les contextes pathologiques de la DMD et de la mucoviscidose. Cependant, afin de rendre cliniquement applicable la liaison entre le peptide P78-98 et l'ADNp, une méthode différente du pont streptavidine-biotine doit être choisie parmi les différentes stratégies de couplages de type covalentes ou non-covalentes entre un peptide et une molécule d'ADN double brin.

3 Chapitre III : Fonctionnalisation d'un plasmide ADN par un peptide

Mon projet s'inscrit dans la continuité des travaux réalisés par Lucie Pigeon (Pigeon *et al.*, 2013) qui ont mis en évidence que l'efficacité de transfection des polyplexes est améliorée lorsque la migration cytosolique des ADNp est facilitée par l'intermédiaire d'un peptide capable d'interagir avec des protéines motrices. Cependant, la liaison streptavidine-biotine employée dans cette preuve de concept mériterait d'être remplacée par une autre méthode de couplage afin de rendre ce système cliniquement applicable. Dans la littérature, les méthodes de couplage entre un peptide et une molécule d'ADN sont principalement utilisées en vue de greffer des peptides dérivés de la séquence signal de localisation nucléaire (NLS) du SV-40 large T ag (PKKKRKV) dans le but de favoriser l'importation nucléaire de molécules d'ADN.

3.1.1 Les liaisons non covalentes

3.1.1.1 Les interactions électrostatiques

La première stratégie de liaison non-covalente pour associer le peptide NLS du SV40 à un plasmide ADN repose sur des interactions électrostatiques entre les charges négatives portées par les groupements phosphates des molécules d'ADN et les charges positives du peptide NLS (Collas *et Aleström*, 1996; Collas *et al.*, 1996; Aronsohn *et Hughes*, 1998; Keller *et al.*, 2003). Grâce à ces propriétés intrinsèques des deux partenaires, il est possible d'associer ce peptide NLS à une séquence ADN soit sous forme de monomère soit sous forme oligomérique pour augmenter les charges positives (Ritter *et al.*, 2003). Le peptide NLS peut également être couplé à un polymère cationique comme la polylysine (Chan *et Jans*, 1999) ou à des peptides cationiques (Subramanian *et al.*, 1999) afin d'améliorer les interactions avec l'ADN. D'autres auteurs ont utilisé des

protéines karyophiliques ou des protéines virales contenant des séquences NLS pour interagir avec les plasmides ADN dans le but de favoriser leur import nucléaire (Wienhues *et al.*, 1987; Kaneda *et al.*, 1995; Ziemenowicz *et al.*, 1999).

Cette stratégie ne permet pas de contrôler le nombre de peptide NLS par molécule de plasmide, ni la localisation de ces peptides sur les plasmides.

3.1.1.2 Système streptavidine-biotine

Le système biotine streptavidine correspond à la stratégie utilisée dans les travaux concernant le peptide P4 (Pigeon *et al.*, 2013). Cette méthode permet la liaison d'un peptide biotinylé sur un fragment d'ADN biotinylé via un pont streptavidine. La réaction de biotinylation est réalisée à l'aide du réactif « Mirus *LabelIT* biotine » qui se lie de manière covalente à l'ADN au niveau de l'azote 7 des guanines. La liaison entre la biotine et la streptavidine a une haute affinité (10^{-15} mol/L). De cette manière le peptide est conjugué à l'ADN plasmidique de manière quasi-covalente. Cependant, ce type de liaison est limité par le fait que les guanines sont modifiées de manière aléatoire (Slattum *et al.*, 2003). De ce fait, une ou plusieurs guanines localisées dans la séquence codante d'intérêt pourraient être modifiées, ce qui engendrerait l'extinction de l'expression du transgène.

3.1.1.3 Triple hélice

3.1.1.3.1 Triple hélice avec des TFO-PNA

Cette stratégie, qui permet de contrôler le nombre de peptide et une localisation spécifique dans le plasmide, repose sur la formation d'une triple hélice entre un conjugué oligonucléotide-peptide et la molécule ADN. Dans ce cas, on utilise un oligonucléotide

capable de former une triple hélice (*Triple helix Forming Oligonucleotide*, TFO) avec une séquence oligopurine•olipyrimidine spécifique insérée dans la séquence du plasmide.

Cette stratégie a été utilisée pour associer le peptide NLS avec un plasmide en utilisant un peptide couplé à un TFO composé de PNA (*Peptide Nucleic Acid*) (Branden *et al.*, 1999). L'efficacité de transfection du plasmide-NLS est améliorée d'un facteur 8, par rapport à la transfection du plasmide nu, en utilisant la PEI 25 kDa (Branden *et al.*, 1999). Dans ce cas, il a été montré que le plasmide-NLS franchit l'enveloppe nucléaire grâce au recrutement des karyophérines α/β (Branden *et al.*, 1999). Les PNAs possèdent un squelette peptidique sur lequel viennent se fixer les bases purines et pyrimidines (figure 32 A). Ils ne possèdent donc ni de groupements phosphates, ni de charges négatives. Les PNA neutres ont une forte affinité et spécificité pour les acides nucléiques complémentaires pour former des duplex ou des triplex, une forte stabilité et une bonne résistance aux nucléases et protéases.

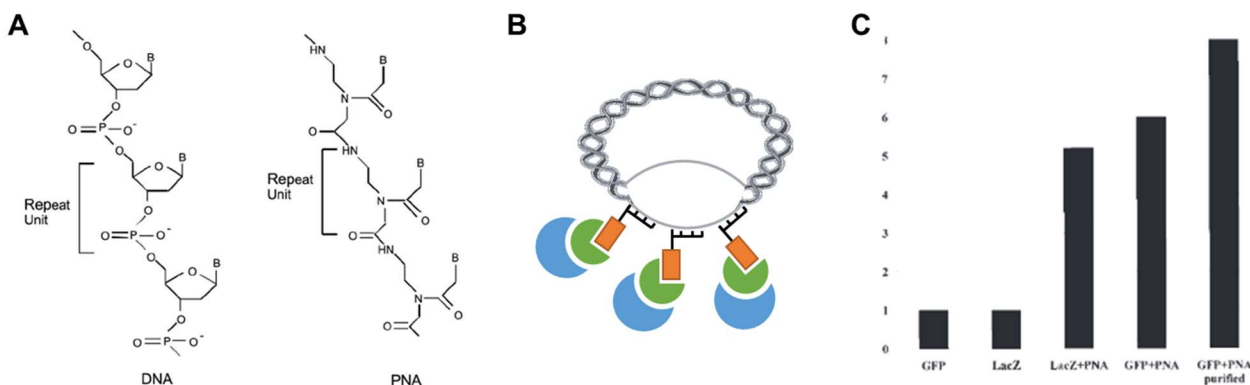


Figure 32 : Conjugaison d'un peptide NLS à un plasmide ADN selon la stratégie de triple hélice de Branden *et al.* (A) Comparaison des oligonucléotides natifs versus des oligonucléotides composés de PNA. (B) Schéma de la stratégie de conjugaison d'un peptide NLS à un plasmide ADN par une triple hélice utilisant des TFO à base de PNA. Orange : peptide NLS, vert/bleu: karyophérines α/β . (C) Facteur d'amélioration de l'efficacité de transfection des plasmides GFP et LacZ, en présence ou non de PNA-NLS purifiés ou non.(Branden *et al.*, 1999).

3.1.1.3.2 Padlock oligonucléotide

Dans cette stratégie du padlock (Roulon, 2002), le peptide NLS terminé par une cystéine est conjugué dans la boucle simple brin d'un premier oligonucléotide, portant une fonction amine par l'intermédiaire d'un agent de liaison, le Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC). Une triple hélice est formée au préalable avec un second oligonucléotide possédant la séquence adéquate. Les deux oligonucléotides qui possèdent une séquence complémentaire sont ensuite assemblés par l'action de la ligase T4 (figure 33). Malheureusement, cette construction ne semble pas améliorer l'efficacité de transfection par rapport à un plasmide sans NLS (Roulon, 2002).

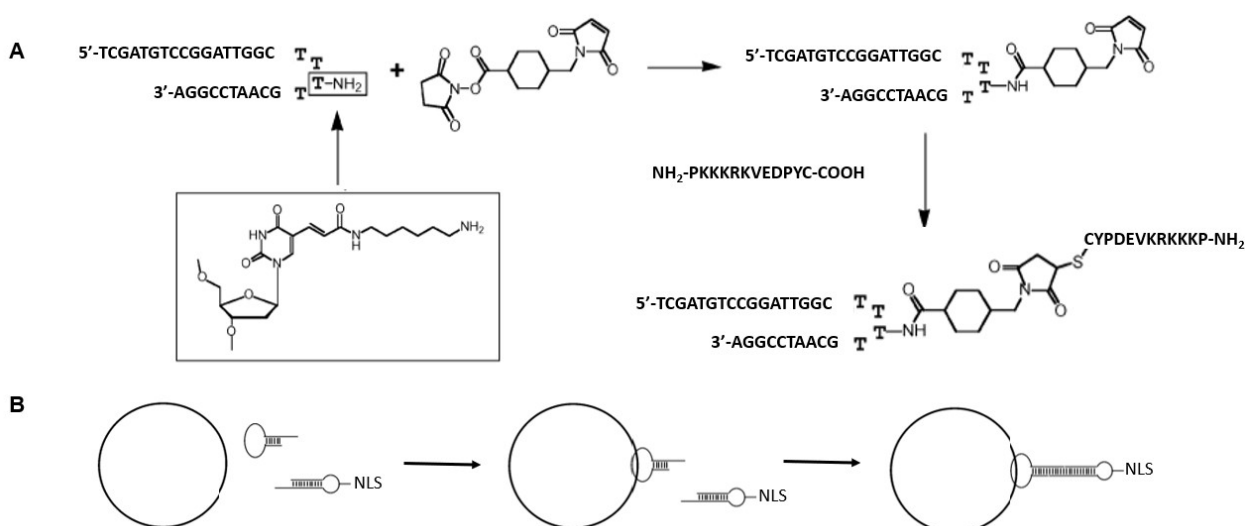


Figure 33 : Etapes de construction dans la stratégie padlock. (A) Schéma de la réaction de conjugaison de m'oligonucléotide-peptide NLS. L'oligonucléotide est incubé en présence du peptide NLS et de of the Oligonucleotide-Peptide Conjugate. SMCC [N-succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)-cyclohexane-1-carboxylate ester] (= SMCC) pendant 2H à température ambiante. (B) Stratégie de couplage d'un peptide NLS à un plasmide. L'oligonucléotide se lie à une séquence oligopurine•oligopyrimidine. Une étape de chauffage est nécessaire pour ouvrir l'oligonucléotide et l'enrouler autour de l'ADN double-brin. Puis l'oligonucléotide est refermé avec l'oligonucléotide en épingle à cheveux préalablement conjugué au peptide NLS. Figure adaptée de (Roulon, 2002).

3.1.2 Les liaisons covalentes

L'association d'un peptide à un plasmide ADN peut se faire par des couplages chimiques, par la photoactivation ou par une ligation.

La première catégorie de liaisons covalentes correspond au couplage du peptide à une molécule chimique capable de réagir avec les nucléotides. Ces méthodes chimiques associent un peptide à un plasmide ADN de manière covalente mais également de manière aléatoire. Une première méthode consiste à coupler le peptide porteur d'un groupement thiol, au groupe maléimide de la molécule de N-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzyl)-6-maleimidylhexanamide (TFPAM-6) (figure 34 A). La liaison entre cette molécule et l'ADN est réalisée après une exposition aux UV via le groupe azido (Ciolina *et al.*, 1999). Une autre méthode est basée sur une réaction d'alkylation en position N3 de l'adénine entre l'ADN et une molécule de cyclopropapyrroindole (CPI) couplé au peptide NLS (Sebestyen *et al.*, 1998) ou un couplage diazo entre la guanine et un azido-PEG couplé au peptide NLS (Nagasaki *et al.*, 2003).

De la même manière que les stratégies précédentes, les limites de cette stratégie concernent l'inhibition du transgène lorsqu'un excès de peptide entraîne sa fixation dans la séquence codante. De plus l'utilisation d'UV peut engendrer des dommages à l'ADN comme la dimérisation des thymines et donc inhiber l'expression du transgène.

La photoactivation a été utilisée pour stabiliser une triple hélice par la création de liaison covalente entre un groupement chimique, le psoralen, et les bases. Pour ce faire, l'oligonucléotide porte une molécule de psoralen à l'extrémité 5' et un groupement thiol

en 3'. Ce groupement thiol réagit avec le groupement maléimide porté par le peptide pour former un oligonucléotide-peptide. Ensuite, celui-ci est mis en présence du plasmide ADN et après une irradiation aux UV, l'oligonucléotide-peptide est lié de manière covalente au plasmide (Neves *et al.*, 1999).

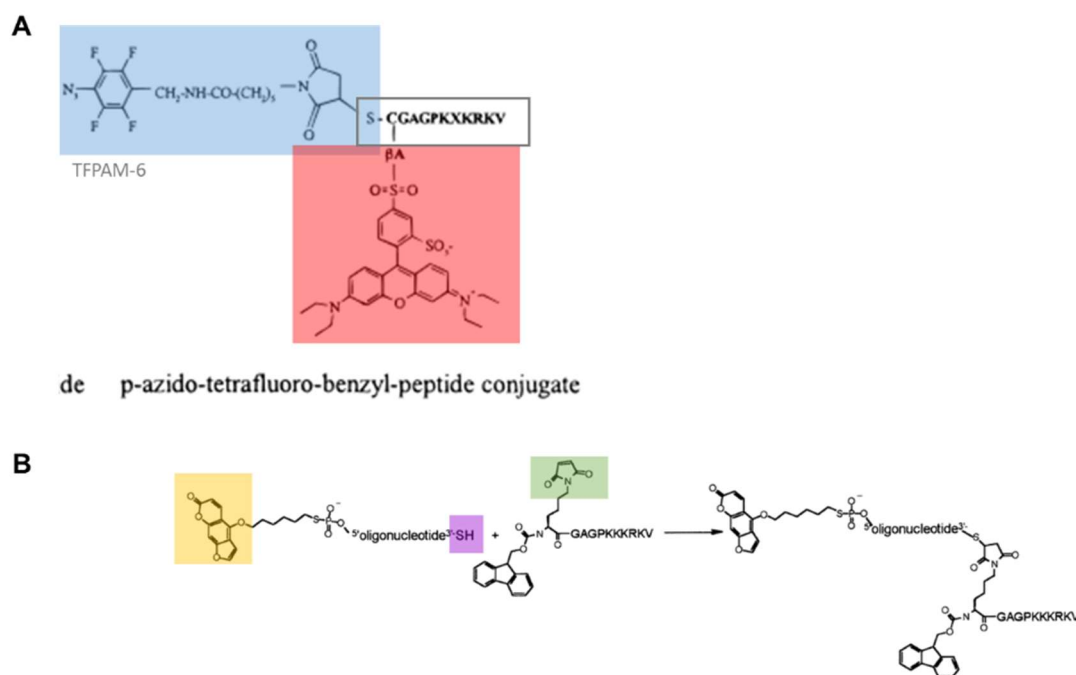


Figure 34 : Stratégies de couplage chimique entre un peptide NLS et une molécule d'ADN. (A) Couplage chimique via le TFPAM-6. Le peptide (encadré noir), marqué à la rhodamine (en rouge) est incubé en présence d'une quantité équimolaire de N-(4-azido-2,3,5,6-tetrafluorobenzyl)-6-maleimidylhexanamide = TFPAM-6 (bleu) à température ambiante, pendant 2H pour obtenir un peptide p-azido-tetrafluoro-benzyl. Ensuite, les peptides sont incubés avec les plasmides ADN sous une lampe UV pendant 15 minutes pour former les liaisons covalentes entre le peptide et l'ADN. Figure adaptée de (Ciolina *et al.*, 1999). (B) Couplage chimique avec une molécule de psoralen d'un oligonucléotide-peptide à un plasmide ADN contenant une séquence oligopurine•oligopyrimidine. L'oligonucléotide Pso-GA₁₉-SH est incubé en présence du peptide FmocK(N-maleoyl)GAGPKKKRKV- NH₂ à température ambiante pendant 2 heures. Puis, le plasmide est incubé en présence du conjugué oligonucléotide-peptide NLS sur la nuit à 37°C. Le mélange est ensuite placé sur la glace et illuminé pendant 15 minutes aux UVs. La molécule de psoralen (jaune) permet de lier de manière covalente, le troisième brin à la triple hélice. La liaison se crée entre le furane ou le pyrone du psoralen et la double liaison 5-6 d'une des thymine de l'ADN. Violet : groupement thiol, vert : groupement maléimide. Figure adaptée de (Neves *et al.*, 1999).

Dans une autre méthode, comme pour le padlock, la première étape consiste à coupler un oligonucléotide au peptide NLS. Les conjugués sont purifiés à l'aide d'un gel PAGE. En parallèle, le plasmide est digéré par des enzymes de restriction qui doivent

également être éliminées à la fin de la digestion. Les fragments obtenus par la digestion enzymatique sont centrifugés dans un gradient de sucrose de 15-30%. Avant la ligation de l'oligonucléotide-peptide avec le plasmide ADN linéarisé, la forme d'épingle à cheveux est obtenue par chauffage et refroidissement. L'excès d'oligonucléotide-peptide est éliminé par centrifugation (Zanta *et al.*, 1999) (figure 35).

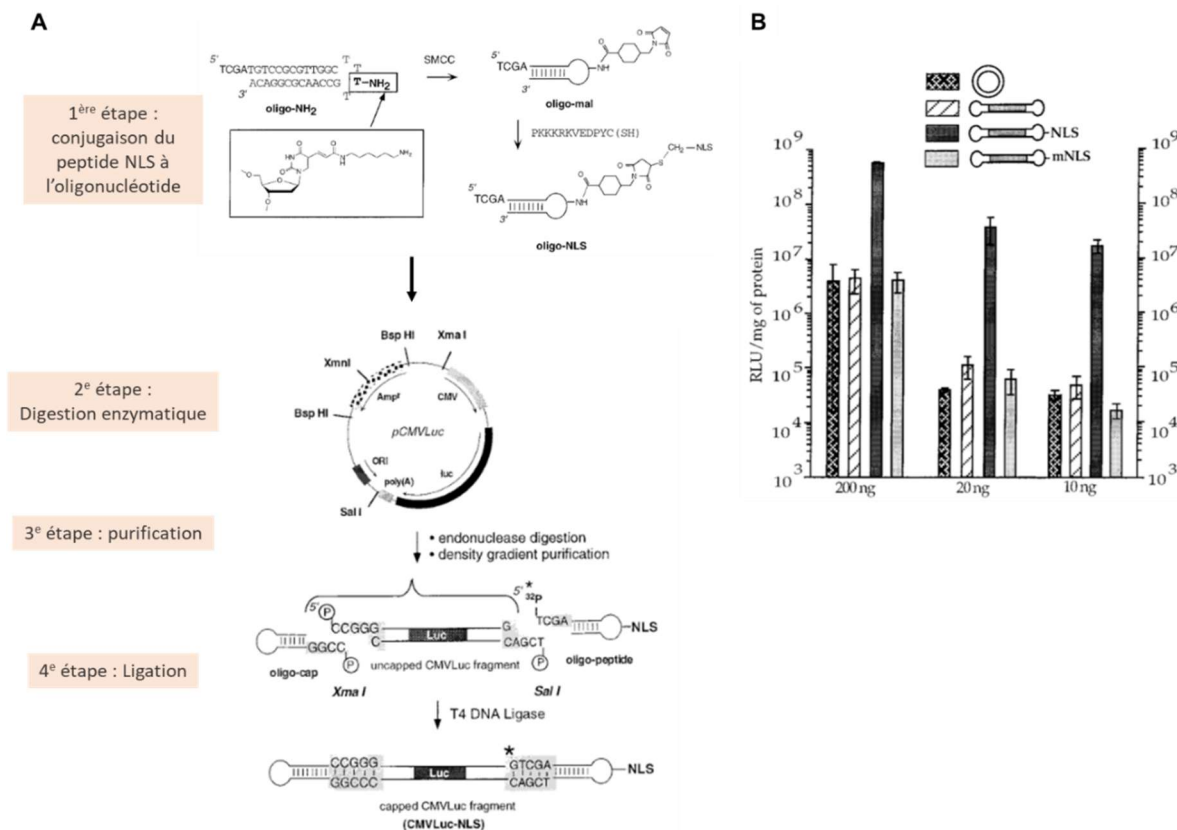


Figure 35 : Stratégies de couplage entre un oligonucléotide-peptide NLS par la stratégie de ligation à un ADN double brin linéarisé. (A) Etape de construction pour la stratégie de couplage de (Zanta *et al.*, 1999) pour obtenir un conjugué oligonucléotide peptide (oligo-NLS). La première consiste en une étape de conjugaison de l'oligonucléotide avec le peptide NLS. Un oligonucléotide en épingle à cheveux contenant un groupement aminoalkyl dans la boucle T4 (oligo-NH₂) réagit avec le SMCC pour donner un oligonucléotide avec un groupement maléimide (oligo-Mal), réactif aux groupements thiol et donc avec la partie C-terminale du peptide NLS. La deuxième étape consiste à réaliser une digestion enzymatique du plasmide ADN par des enzymes de restriction. Les fragments digérés sont ensuite purifiés lors de la troisième étape. Finalement, lors de la quatrième étape, des oligonucléotides en épingles à cheveux, porteurs ou non du peptide NLS, sont rattachés au plasmide par l'action de la T4 ligase. (B) Mesure de l'activité de la luciférase en fonction du peptide NLS et de la quantité d'ADN. Les résultats ont été obtenus après transfection de cellules HeLa avec des ADN complexés avec ExGen500 PEI, en présence de 10% de sérum (Zanta *et al.*, 1999).

Cette méthode a montré que la ligation du peptide NLS à un plasmide ADN améliore l'expression du transgène entre 10 à 1000 fois (Zanta *et al.*, 1999) (figure 36). Cependant, le développement pharmaceutique de cette méthode est limité par sa difficulté de production à grande échelle.

Il existe donc plusieurs possibilités pour coupler un peptide à un ADN plasmidique (tableau 20). Dans le contexte de la thérapie génique, le choix le plus judicieux est une méthode qui permettrait d'obtenir une liaison qui soit non-immunogène, résistante aux nucléases et aux protéases, contrôlable en nombre de peptides fixés et en localisation pour ne pas perturber la transcription de l'ADNc et facile à produire en grande quantité pour une finalité pharmaceutique. Notre choix s'est donc porté sur la stratégie de triple hélice car elle permet une fixation du peptide à l'ADN de manière séquence spécifique et relativement forte ($\sim 10^{-8}$ mol/L) (Roy, 1993; Vasquez *et al.*, 1995). Les triples hélices se forment même si le plasmide est en conformation super-enroulée. La triple hélice augmente la résistance aux nucléases des triplex et n'empêche pas la transcription. En vue d'équiper un plasmide ADN avec un oligonucléotide-peptide, le contrôle du nombre et de la position des triples hélices sur leur cible est un avantage.

Tableau 20 : Comparaison des différentes stratégies de couplage d'un peptide sur une molécule d'ADN.

Type de liaison	Non-covalente				Covalente		
Stratégies	Interactions électrostatiques	Triple hélice	Padlock	Biotine-Streptavidine	Couplage chimique	Photo-activation	Ligation
Contrôle de la localisation	-	+++	+++	-	-	-	+++
Contrôle du nombre	-	+++	+++	++	-	-	+++
Immunogénicité	+	-	-	++	-	/	-
Résistance aux nucléases	++	+++	+++	++	/	/	/
Production à grande échelle	+++	+++	++	+++	++	++	-
Efficacité de transfection	x 3 à x 60	x 8	x 1	x 3 à x 5	x 2	x 2	x 100
Limites	Aléatoire	Optimisation	Complexité	Immunogène	Aléatoire	Risque mutagenèse	Complexité

3.2 Formation de triple hélice

3.2.1 Généralités

G. Felsenfeld observe en 1957 des structures ADN à trois brins. Ses travaux ont montré qu'une chaîne polyriboadénylique et deux chaînes polyribouridyliques forment une molécule d'ADN triple brin en présence de Mg(II) (Felsenfeld *et al.*, 1957). Cette découverte ouvre alors de nombreux horizons pour le domaine de la biologie moléculaire et des biotechnologies. Plus tard, il a été montré qu'un ADN en double hélice contenant une séquence homopurine•homopyrimidine peut lier un troisième brin composé uniquement de pyrimidines ou de purines. Le troisième brin interagit avec la double hélice d'ADN au niveau du grand sillon où des groupements accepteurs et donateurs d'hydrogène sont présents. De cette manière, des liaisons hydrogènes de type Hoogsteen différentes de celles décrites par Watson et Crick se forment (Hoogsteen, 1959). Selon la séquence cible et l'oligonucléotide employé, les triplex se forment de manière parallèle ou antiparallèle (figure 36).

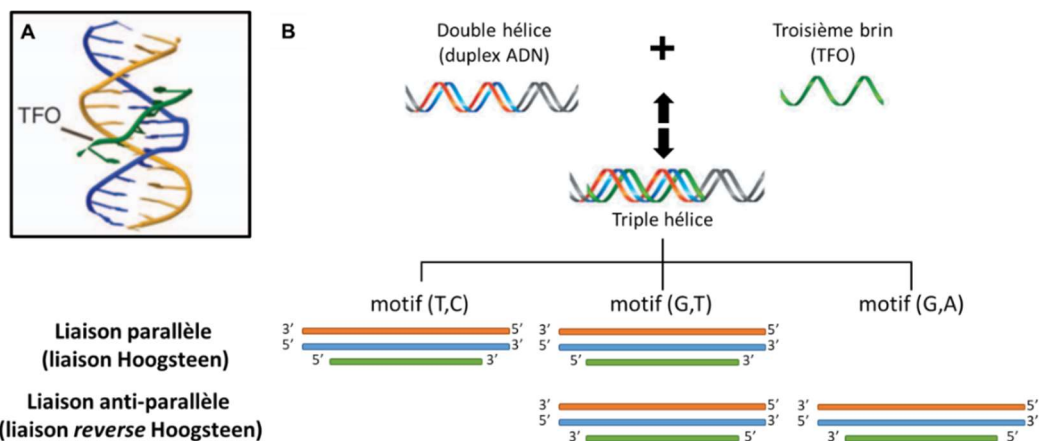


Figure 36 : Orientations des oligonucléotides formant des triples hélices en fonction de leurs motifs. (A) Structure d'une triple hélice dérivée d'une structure RMN provenant de la base de donnée protéique (PDB-id: 1BWG). (B) Les trois motifs triple hélice de base sont (T,C), (G,A) et (G,T). Les motifs (T,C) se lient de manière parallèle tandis que les motifs (G,A) se lient de manière anti-parallèle à l'ADN double brin. Les motifs (G,T) peuvent se lier dans les deux orientations. Bleu : brin oligopurine, orange et jaune : brin oligopyrimidine, vert : oligonucléotide formant une triple hélice (TFO). Figure adaptée de (Duca *et al.*, 2008) et (Buske *et al.*, 2011).

Les conditions physiologiques sont importantes pour que ces oligonucléotides forment des triplex stables. Le premier obstacle à la formation du triplex concerne l'effet de répulsion de charges entre l'ADN double brin cible et le troisième brin ADN, tous chargés négativement. A pH physiologique, les TFO à motif pyrimidique sont relativement instables puisque les cytosines doivent être protonées mais que leur pKa est égal à 4,5. Bien que l'addition de 10 mM de Mg^{2+} permette de neutraliser les charges négatives, les concentrations utilisées pour former des triples hélices stables ne correspondent pas aux conditions physiologiques. Concernant la stabilité de la triple hélice, il a été observé que le troisième brin changeait de conformation pour s'insérer dans le duplex ADN provoquant ainsi une distorsion au sein de l'ADN double brin. Cette distorsion rendrait la structure triple brin instable. La structure des TFO limite la formation des triples hélices. En effet, les TFO riches en guanines présentent l'inconvénient de former des structures en tétrades (*G tetrads*) lorsque la concentration en K^+ est physiologique. L'apparition de ces structures secondaires inhibe donc la formation des triples hélices. L'accessibilité de la cible est également un paramètre à prendre en compte notamment lorsque les mécanismes biologiques tels que la transcription, par exemple, sont visés. L'hybridation des TFO peut être inhibée par la présence des nucléosomes (Seidman et Glazer, 2003). Par conséquent, un TFO est efficace quand il est capable de former un triplex stable en condition physiologique afin d'agir sur les mécanismes biologiques ciblant l'ADN et résistant aux nucléases.

D'après la stratégie anti-gène développé par le professeur Claude Hélène et ses collaborateurs, les oligonucléotides formant des triples hélices (TFO : *triple helix forming oligonucleotide*) sont capables de cibler l'ADN de manière séquence spécifique et

d'interférer avec différents processus biologiques comme la réplication, la transcription, la recombinaison et la réparation de l'ADN (Giovannangeli et Hélène, 1997). De ce fait, de nombreuses applications basées sur les triplex d'ADN ont été développées, particulièrement pour le clivage de sites spécifiques, la mutagenèse dirigée (Vasquez et al., 2000), la modulation de l'expression génique (modulation de la transcription, inhibition de la réplication) (Giovannangeli et al., 1996; Vasquez et Wilson, 1998), la translocation de protéines (ou de drogues) au niveau de l'ADN ou la modulation de leur liaison (Levy et al., 2005), le marquage de duplexe ADN (Roulon et al., 2002) ou encore dans les méthodes de purification d'ADN (Ji et Smith, 1993). Grâce à leur capacité de ciblage séquence spécifique, les TFO sont des outils attractifs dans les domaines thérapeutiques et technologiques (Duca et al., 2008). C'est pourquoi, la capacité des TFO à former des structures en triples hélices a été améliorée grâce à des modifications chimiques des nucléotides. L'optimisation des TFO est illustrée ci-après par des exemples de modifications apportées soit au niveau de la base azotée (C ou T en général), soit au niveau du sucre ou de la liaison phosphodiester.

3.2.2 Modifications de la base

Il a été montré que la 5-methylcytosine, caractérisée par la substitution de l'hydrogène en C5 par un groupement méthyle, augmente la fourchette de pH dans laquelle la triple hélice est stable (Lee et al., 1984). Ceci s'expliquerait par l'apparition d'un phénomène d'hydrophobicité qui chasserait les molécules d'eau situées dans le sillon de l'ADN et/ou par l'augmentation du pKa au sein du triplex (Provsic et Dervan, 1989).

3.2.3 Modifications du sucre

Des analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) ont montré qu'au sein des ADNs triples brins, le troisième brin a une conformation semblable à celle d'un ARN. C'est-à-dire que le sucre est en conformation C3'-endo au lieu d'une conformation C2'-endo qui est généralement observée pour les ADN simple brin (Rajagopal et Feigon, 1989) (figure 37). De plus, il a été montré que la triple hélice est plus stable lorsque le troisième brin est un acide ribonucléique plutôt qu'un acide désoxyribonucléique (Roberts et Crothers, 1992). Basés sur ces travaux, Shimizu et ses collaborateurs ont montré qu'un TFO composé d'ARN 2'-O-méthyl (2'-OMe RNA) se lie plus efficacement et plus solidement à un duplex ADN qu'un troisième brin composé uniquement d'ADN. Ils ont également montré que cet ARN 2'-O-méthyl a une conformation C3'-endo et que le groupement méthyl augmente la rigidité du triplex (Shimizu *et al.*, 1992). Cette méthylation du groupement OH stabiliserait la conformation C3'-endo du sucre en engendrant une faible distorsion du duplex cible et favorisant ainsi la stabilité du triplex final. Cette modification confère aux TFO une meilleure résistance aux nucléases.

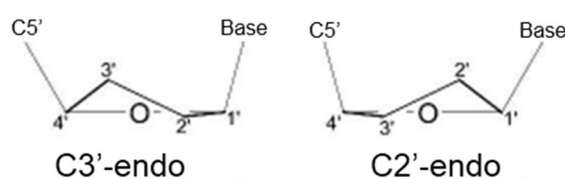


Figure 37 : Conformation des C3'-endo et C2'-endo des sucres des nucléotides. Figure adaptée de (Julien *et al.*, 2008).

La présence d'un ribose 2'-O-aminoethyl (2'-AE) sur un résidu augmente la cinétique d'hybridation en réduisant la répulsion de charge du duplex sur le troisième brin. Le groupement amine de la chaîne latérale forme un pont avec l'oxygène du phosphate du duplex et stabilise ainsi la structure triple brin (Seidman *et al.*, 2005).

En vue d'améliorer les systèmes d'ARN antisens, d'autres auteurs ont développé des analogues d'oligonucléotides capables d'outrepasser les limites des systèmes déjà existant telles que l'activité *in cellulo*, le temps de demi-vie et surtout la spécificité de séquence. Ces oligonucléotides sont synthétisés à partir de ribonucléosides modifiés par une sous-unité morpholine, reliés entre eux par des groupements carbamates (Stirchak *et al.*, 1989; Summerton et Weller, 1997).

Puisque ces oligonucléotides morpholino ont montré une bonne activité antisens et une bonne spécificité de séquence, Lacroix *et al.*, ont tiré profit de ces analogues d'acides nucléiques en les incorporant dans des TFO afin de former de triples hélices stables en conditions physiologiques. Ils sont alors les premiers à réaliser une triple hélice avec un troisième brin oligonucléotidique non chargé composé de pyrimidine en conditions physiologiques (Lacroix *et al.*, 2000).

L'optimisation des TFOs a mené au développement des LNA (*locked nucleic acids*) qui sont caractérisés par un pont méthylène entre l'hydroxyle en position 2 et l'atome de carbone en position 4 du sucre. De cette manière, le ribose est bloqué de manière covalente en position C3'-endo (Koshkin *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). Cette

conformation augmente la sensibilité et la spécificité du TFO (un nucléotide de mismatch).

La dernière génération de TFO utilise des BNA^{NC} (*Bridged Nucleic Acid*) (Rahman *et al.*, 2008) qui sont caractérisés par une liaison N-O entre le carbone 2' et 4' du ribose. Cette conformation augmente l'inflexibilité du sucre et lui confère un gain d'affinité avec le duplex cible (propriétés d'hybridation). Cette caractéristique augmente la résistance aux nucléases par rapport aux LNAs. Les TFOs complètement modifiés avec des BNA forment des triples hélices stables à pH neutre (Duca *et al.*, 2008). De plus, les oligonucléotides composés de BNA^{NC} sont reconnus pour avoir une meilleure résistance aux nucléases, une meilleure spécificité et être moins toxiques que les LNAs. Ils ont également une stabilité thermique élevée et une bonne solubilité dans l'eau (Soler-Bistué *et al.*, 2019). Par conséquent, ce type d'oligonucléotide a été employé dans diverses applications comme l'inhibition de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Lopez *et al.*, 2015), le ciblage d'ARN défectueux dans le contexte de la dystrophie myotonique de type 1 (Manning *et al.*, 2017), l'inhibition de gène dans des cellules de mammifères (Yamamoto *et al.*, 2012) ou encore pour le diagnostic avec le développement de sondes fluorescentes (Shivarov *et al.*, 2014) et même dans des systèmes CRISPR pour améliorer la spécificité de la Cas9 (Cromwell *et al.*, 2018).

3.2.4 Modifications des liaisons phosphodiesters

La synthèse d'oligonucléotide dont le squelette phosphodiester est modifié permet de palier au problème de stabilité en augmentant la résistance des oligonucléotides face aux nucléases. La modification du squelette phosphodiester des oligonucléotides confère une meilleure stabilité aux oligonucléotides en augmentant leur résistance face aux nucléases. C'est le cas des oligonucléotides phosphorothioates (PS) et des *peptide nucleic acids* (PNA). Les oligonucléotides phosphorothioates sont caractérisés par le remplacement d'un atome d'oxygène par un atome de soufre au niveau du groupement phosphate qui leur accorde une meilleure résistance aux nucléases en comparaison aux oligonucléotides phosphodiesters (Stein et Cohen, 1988; Ghosh *et al.*, 1993; Hacia *et al.*, 1994). Il a été rapporté que l'affinité des oligonucléotides PS, composés de pyrimidines, diminue en fonction du nombre de liaisons PS. Cependant, l'affinité des oligonucléotides PS composés de purines est supérieure à celle des oligonucléotides PS composés de pyrimidines et à celle des oligonucléotides natifs (Lacoste *et al.*, 1997).

Les PNAs sont des molécules de synthèse, analogues des acides nucléiques, dans lesquelles le squelette phosphodiester a été remplacé par une chaîne pseudo-peptidique sur laquelle viennent se fixer les bases puriques et pyrimidiques. En effet, le squelette est composé de répétition N-(2-aminoéthyl)-glycine reliées par une liaison peptidique et les bases purines et pyrimidines sont attachées au squelette par des liaisons méthyl-carbonyl. Par conséquent, les PNA ne sont pas chargés et s'apparient aux séquences d'acides nucléiques avec une forte affinité et une forte spécificité (diminution de l'effet de répulsion électrostatique entre le duplex et le troisième brin). Ces

caractéristiques confèrent aux TFO-PNA une excellente résistance aux protéases et aux nucléases.

En vue d'améliorer l'efficacité de transfection d'un transgène thérapeutique, nous avons décidé de greffer un peptide signal sur un plasmide ADN en employant un ou plusieurs oligonucléotides capables de former des triples hélices avec un site oligopurine•oligopyrimidine inséré dans le plasmide mais en dehors des séquences codantes. Nos travaux portent sur la caractérisation de la formation d'un ADNp-TFO-peptide composé d'un plasmide de taille variable (5kb à >20 kb) et d'un oligonucléotide comportant des BNAs et conjugué à un peptide par « chimie click ». Les caractéristiques des BNA apportent à l'oligonucléotide certains avantages comme une meilleure reconnaissance de la séquence cible, une meilleure stabilité et une meilleure résistance aux endo et exonucléases que les autres types de nucléotides.

4 Chapitre IV : Matériel et méthodes

4.1 Cellules

4.1.1 Lignée HeLa

Les cellules HeLa (ATCC CCL 2.1) sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Gibco, Renfrewshire, U.K.) contenant 10% de sérum de veau décomplémenté (à 56°C pendant 30 minutes) (FBS, Gibco), 1% de L-glutamine (Glutamax, Gibco), 1% d'acides aminés non-essentiels (M7145, Sigma, Saint Louis, USA), 100 U/ml de pénicilline et 50 unités/ml de streptomycine (pénicilline-streptomycine, Eurobio, France) à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% CO₂ et 95% d'air.

4.1.2 Lignée CFBE

Les cellules CFBE, données par Dieter Gruenert, San Francisco, CA, USA, sontensemencées dans des flasques T75 préalablement incubées pendant 15-20 min à 37°C avec 10 ml d'une solution contenant 10 mg de BSA et 3 mg de collagène de type 1 (MP Biomedicals, USA) pour 100 ml de Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Gibco, Renfrewshire, U.K.) (Goncalves *et al.*, 2017). Avant l'ensemencement des cellules, ce milieu BSA/collagène/MEM est retiré. Les cellules CFBE sont cultivées dans du milieu de culture « Minimum Essential Medium » (MEM, Gibco, Renfrewshire, U.K.) avec 10% de sérum de veau non-décomplété (FBS, Gibco), 1% de L-glutamine (Glutamax, Gibco), 0,4% d'antibiotique (pénicilline-streptomycine, Eurobio, France) à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% CO₂ et 95% d'air.

4.1.3 Lignée C2C12 et cellules mdx

Les cellules C2C12 et H2kmdx (CRL1772 ; ATCC) sont cultivées dans du milieu de culture Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM – high glucose, Gibco, Renfrewshire, U.K.) avec 10% de sérum de veau décomplémenté (FBS, Gibco), 1% de L-glutamine (Glutamax, Gibco), 1% d'antibiotique (penicilline-streptomycine, Eurobio, France) à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% CO₂.

4.1.4 Lignées HeLa-eGFP-tub, HeLa-MRFP-Tub, HeLa-FIP1eGFP

Les cellules HeLa-eGFP-Tub, HeLa-MRFP-Tub et HeLa-FIP1-eGFP sont des cellules qui expriment de façon stable la tubuline-eGFP, la tubuline-MRFP et la protéine FIP1-eGFP, respectivement. Ces cellules ont été établies au laboratoire après transfection de cellules HeLa avec des plasmides codant respectivement les protéines de fusion tubuline-eGFP, tubuline-MRFP et FIP1-eGFP, placées sous la dépendance du promoteur CMV ainsi qu'un gène de résistance à l'antibiotique G418. Ces cellules sont cultivées dans du milieu de culture DMEM (Gibco, Renfrewshire, U.K.) contenant 10% de sérum de veau décomplémenté (FBS, Gibco), 1% de L-glutamine (Glutamax, Gibco), 1% d'antibiotique (penicilline-streptomycine, Eurobio, France), 400 µg/ml de G418 (Sigma, Saint Louis, USA) dans le but de maintenir la pression de sélection des clones, à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% CO₂ et 95% d'air.

4.1.5 Passage des cellules

Les cellules sont passées deux fois par semaine par un décollement avec un mélange PBS/trypsine (Sigma, Saint Louis, USA). Après 5 minutes d'incubation à 37°C,

la trypsine est inactivée par le sérum en ajoutant un volume de milieu complet. Les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 3 min puis le culot est repris dans du milieu complet et les cellules sontensemencées à $2 \cdot 10^6$ cellules/ml dans un T75 ou à $8 \cdot 10^5$ dans un T25. Les cellules sont testées pour les mycoplasmes avec le kit Mycoalert™ (Lonza).

4.1.6 Transfection avec PTG1

24h avant la transfection, les cellules sontensemencées à $1 \cdot 10^5$ cellules/puits dans 500 µl de milieu de culture complet dans une plaque 24 puits. Pour la transfection, nous avons utilisé le polymère PTGI qui correspond à de la polyéthylèimine linéaire histidinylée (Bertrand *et al.*, 2011). Les polyplexes sont préparés comme suit : 6 µl de polymère PTG1 à 1 µg/µl dilué au ½ avec de l'HEPES 10 mM, pH 7,4 est ajoutée goutte à goutte, en vortexant, à une solution contenant 1 µg de plasmide ADN dilué dans 13 µl d'HEPES 10 mM pH 7,4. Le mélange est laissé au repos pendant 30 minutes à température ambiante afin que les polyplexes se forment puis le volume est ajusté à 500 µl avec du milieu de culture sans sérum (MEM ou DMEM-high glucose). Le milieu de culture des cellules est éliminé et remplacé par 500 µl de polyplexes. Après 4h d'incubation à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% CO₂ et 95% air, le milieu de transfection est éliminé et remplacé par 500 µl de milieu complet dans chaque puits.

4.1.7 Mesure de l'efficacité de transfection

- **Préparation des lysats cellulaires :**

48h après la transfection, les cellules sont lavées avec du PBS 1X. Puis, 133,4 μ l de tampon de lyse composé de CCLR 1X (Promega, Madison, USA), complété à 8 mM $MgCl_2$, sont ajoutés dans chaque puits. Les cellules sont décollées par grattage avec un *rubber policeman*, transférées dans des tubes eppendorf de 1,5 ml puis vortexées pendant 10 secondes dans la solution de lyse. Ensuite, les échantillons sont centrifugés à 12 000 g pendant 15 secondes et placés sur la glace. 20 μ l de chaque échantillon sont mélangés avec 6 μ l d'ATP à 2 mM. La mesure de l'activité de la luciférase est effectuée avec le luminomètre LUMAT LB 9507 (Berthold, Wilbach, Allemagne) après injection de 150 μ l de *Bottle* luciférine diluée 6 fois dans l'eau (1 mM final). L'activité de la luciférase est exprimée en RLU (*Relative Light Units*) par mg de protéine après un dosage protéique réalisé avec le dosage colorimétrique BCA (Interchim, Montluçon, France) qui permet de normaliser les échantillons.

En présence d'ATP, de Mg^{2+} et d' O_2 , la luciférase transforme la luciférine en une molécule d'oxyluciférine et un photon. Cette réaction produit également de l'AMP, du PPi et du CO_2 (figure 38).

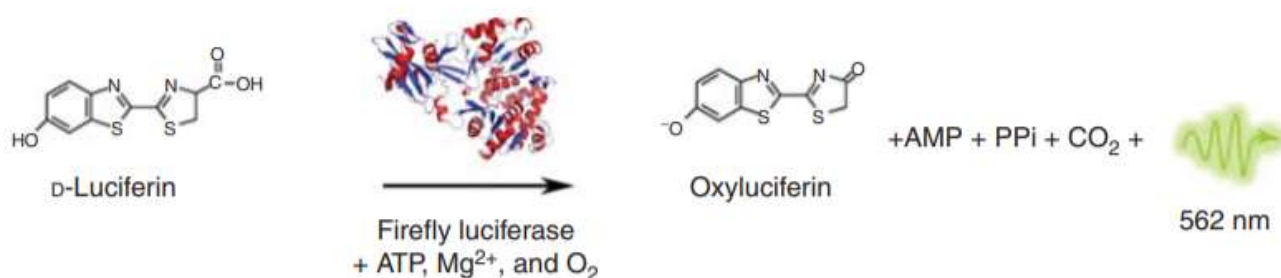


Figure 38 : Réaction de l'activité de la luciférase.

- **Dosage BCA :**

Le dosage protéique repose sur l'établissement d'une gamme étalon composée de BSA diluée dans le réactif CCLR à 0,1X, allant de 0 µg/µL à 1 µg/µl. Sur la même plaque 96 puits, 0,5 µl de chaque échantillon sont déposés en triplicata. 10 µl de tampon CCLR 0,1X sont ajoutés à chaque échantillon puis 300 µl du mélange BCA-A/BCA-B (Interchim, Montluçon, France) sont rajoutés. La plaque est incubée 45 minutes à 37°C. La quantité de protéine est mesurée à 562 nm avec le spectrophotomètre (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Ce dosage protéique permet de normaliser les valeurs obtenues en bioluminescence par rapport à la quantité de protéines présentes dans les échantillons. Ce dosage est un test colorimétrique qui repose sur la réduction de Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines dans un milieu alcalin (figure 39). L'acide bicinchoninique chélate les ions Cu^+ avec une haute spécificité pour former un complexe soluble violet. La réaction est mesurée par absorbance à 562 nm du complexe Cu^+ . L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration en protéine dans une fourchette comprise entre 20 – 2000 µg/ml (d'après la fiche technique Interchim, France). La concentration en protéine est calculée à partir d'une courbe étalon obtenue avec une gamme de protéine (BSA, *bovine serum albumin*).

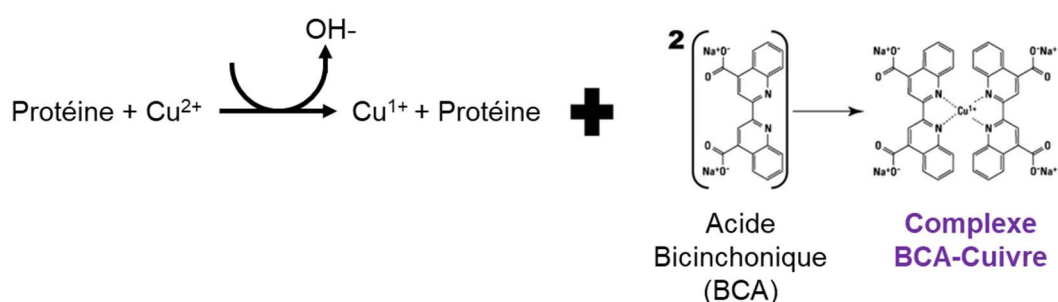


Figure 39 : Réaction colorimétrique du test d'acide bicinchoninique de dosage des protéines. La première étape correspond à la chélation du cuivre par les protéines dans un environnement alcalin qui forme un complexe avec des liaisons peptidiques. La seconde étape est la réduction de l'acide bicinchoninique, responsable du changement de couleur.

4.2 Les plasmides

4.2.1 Construction du plasmide pTG11033-6TH

- **Amplification et digestion de la séquence 6TH**

La séquence 6TH est amplifiée à partir de 10 ng du plasmide pUC57-6xgenegrip (GenScript) et du mix KAPA HiFi HotStart Ready (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) en présence de 0,3 μ M d'amorce sens (5'-GAAGCAGCCGGC CTTGGGCTGGCGTAATAGC-3'), 0,3 μ M d'amorce antisens (5'-AGTGACACCGGTACT CACTATAGGGCGAATTG- 3') et 5% DMSO. La réaction de PCR est programmée selon une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C, 35 cycles d'amplification (dénaturation : 98°C, 20 secondes ; hybridation : 69,5°C, 15 secondes ; élongation : 72°C, 1 minute) et une étape d'élongation finale de 5 minutes à 72°C. 1 μ g de produits PCR est digéré en présence de tampon CutSmart à 1X final (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre), 20 unités d'enzyme AgeI (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) et 30 unités de NaeI (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) dans un volume ajusté à 50 μ l avec de l'eau. Après 4h d'incubation à 37°C, les enzymes de restriction sont inactivées pendant 20 minutes à 65°C. Les fragments sont purifiés avec du phénol/chloroforme à pH 7,7-8,3 (Sigma, Saint Louis, USA) puis précipités dans 0,1 volume de NaCl 5M additionné de 2 volumes d'éthanol absolu froid (stocké à -20°C). Après 16h d'incubation à -20°C, le mélange est centrifugé à 20000 g pendant 15 minutes. L'ADN culoté est lavé avec 500 μ l d'éthanol 70%, centrifugé à 20000 g pendant 15 minutes. Le culot d'ADN est séché à température ambiante pendant 10 minutes puis repris dans de l'eau. En parallèle, 2 μ g du plasmide destinataire pTG11033 (9 514 bp, Transgene S.A., Strasbourg, France) sont digérés en présence de tampon CutSmart à

1X final (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre), 20 unités de Agel (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) et 30 unités de NaeI (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre), 10 unités de Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) dans un volume ajusté à 50 µl avec de l'eau. Après 4h d'incubation à 37°C, les plasmides sont purifiés à l'aide du kit Macherey-Nagel « gel and PCR clean up » (Düren, Allemagne), dosage au Nanodrop (NanoDrop One, Thermo Scientific).

- **Ligation**

L'étape de ligation est réalisée selon la réaction décrite dans le tableau ci-dessous et incubée 5 minutes à température ambiante :

	Contrôle	Ratio 1/3 *	Ratio 1/6 *	Ration 1/10 *
25 ng pTG11033 digéré par NaeI/Agel	0,6 µl	0,6 µl	0,6 µl	0,6 µl
Insert 6xTH digérés par NaeI/Agel	0 µl	1,83 µl	3,29 µl	5,48 µl
Tampon Quick Ligase (New England Biolabs, Angleterre)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Quick Ligase (New England Biolabs, Angleterre)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Eau	3,9 µl	2,07 µl	0,61 µl	0
Volume total	10	10	10	11,93

* ratio 1/3, 1/6 et 1/10 correspondent à 1 quantité d'ADN pour 3, 6 et 10 quantités d'ADN

50 µl de bactéries Neb5α (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) sont transformés avec 2 µl de ligation puis incubés pendant 30 minutes sur la glace. Les échantillons subissent un choc thermique à 42°C pendant 30 secondes avant d'être replacés sur la glace pendant 2 minutes. 200 µl de SOC (B9020S, New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) sont ajoutés à chaque échantillon. Après une heure d'incubation à

37°C, sous agitation à 220 rpm, les bactéries sont étalées sur des boîtes LB + kanamycine et placées à 37°C sur la nuit.

Les boîtes de culture sont énumérées et les résultats obtenus sont décrits dans le tableau suivant :

Boîte LB kanamycine	Nombre de colonies
Contrôle	42
Ratio 1/3	68
Ratio 1/6	62
Ratio 1/10	> 200

10 mini-cultures sont réalisées à partir de 10 colonies piquées au hasard parmi les plus petites de la boîte LB-Kanamycine 1/10 puisensemencées dans 2 ml de LB + 2 µl de Kanamycine et placées à 37°C sous agitation (220 rpm) pendant la nuit.

Les cultures bactériennes sont centrifugées à 3300 g, pendant 5 minutes. Les culots sont repris dans 300 µl de tampon RES (Machery-Nagel, Düren, Allemagne), puis 300 µl de tampon NEU (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) sont ajoutés. La mixture est mélangée par retournement et incubée sur la glace pendant 5 minutes. Les échantillons sont centrifugés à 14500 g pendant 10 minutes et les surnageants sont transférés dans des nouveaux tubes. L'ADN est ensuite précipité avec 0,6 volume d'isopropanol, centrifugé à 14500 g pendant 10 minutes, lavés à l'éthanol 70% et centrifugés à 14500 g pendant 5 minutes. Les culots sont séchés, resuspendus dans 30 µl d'eau « DNase free et RNase free » puis l'absorbance est mesurée à 260 nm avec un Nanodrop (NanoDrop One, Thermo Scientific). Une digestion enzymatique est réalisée pour éliminer les clones faux positifs. Pour cela 1 µg de chaque échantillon est mélangé avec le tampon CutSmart (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre), 20 unités de AgeI-HF (New England Biolabs,

Ipswich, Angleterre), 30 unités de NaeI (New England Biolabs, Ipswich, Angleterre) dans un volume réactionnel de 20 µl.

4.2.2 Amplification et purification de plasmide

Lorsque les clones bactériens sont corrects, ils sont amplifiés par une pré-culture bactérienne de 2 ml (milieu LB + kanamycine) pendant une nuit à 37°C, sous agitation 220 rpm. Puis 500 µl de cette pré-culture sontensemencés dans 500 ml de milieu de culture LB + kanamycine pendant 1 nuit à 37°C, sous agitation 220 rpm. Les bactéries sont culotées par une centrifugation à 6 000 g pendant 20 minutes. Puis les plasmides sont purifiés à l'aide du kit Maxiprep (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) selon les recommandations du fournisseur. Leur quantité est estimée par la mesure de l'absorbance à 260 nm avec le Nanodrop (NanoDrop One, Thermo Scientific. Le Nanodrop permet également de tester la pureté des échantillons à l'aide des ratios 260/280 et 260/230 qui permettent d'évaluer d'éventuelles contaminations par des protéines ou par des produits de purifications (phénols, sels etc...), respectivement. Finalement, une digestion enzymatique est réalisée pour vérifier la conformité des plasmides obtenus.

4.2.3 Peptides et oligonucléotides

Les oligonucléotides avec des BNA marqués par un + (5'-C+TC+TC+TC+TC+TC+TC-3' ou 5'-C+TC+TC+TC+TC+TC+TC-[S-S]-3'), avec des phosphodiesteres (5'-CTCTCTCTCTCTC-3'), des phosphorotioates marqués par une * (5'-*C*T*C*T*C*T*C*T*C*T*C*T*C-3') ont été synthétisés par Biosynthesis (USA) et les

PMO (5'-CTCTCTCTCTCTC-3') ont été synthétisés chez Gene Tools (USA). Ils possèdent tous à leur extrémité 3' un groupement dibenzocyclooctyne (DBCO).

Les oligonucléotides fluorescents BNA (Biosynthesis, USA) et PMO (Gene Tools, USA) possèdent le 6-FAM à leur extrémité 3'. Le 6-FAM correspond à une molécule de fluorécéine caractérisée par une longueur d'onde d'excitation maximale aux alentours de 498 nm et une longueur d'ondes d'émission maximale aux alentours de 517 nm.

Les peptides P4 (H-VVMVGEKPITITQHSVETEG-Lys(N₃)-NH₂) et P1 (VNLHQCKRGIFCLVKQAKVT-Lys(N₃)-NH₂) ont été synthétisés par JPT Innovative Peptide Solutions (Berlin, Allemagne) et possèdent à leur extrémité C-terminale un groupement azide.

Le peptide P4 biotinylé (H-VVMVGEKPITITQHSVETEG-Ttds--Lys(biotin)-NH₂) provient également de JPT Innovative Peptide Solution (Allemagne).

4.2.4 Formation des triples hélices

Les oligonucléotides-FAM en quantités variable (de 0 μ M à 1 μ M) sont incubés en présence de plasmides sans ou avec 1 ou 6 séquences TH dans un tampon phosphate (10mM, pH = 5,8). La réaction est réalisée sur la nuit, si aucune indication n'est précisée. La formation des triples hélices est évaluée après une électrophorèse verticale en gel d'agarose 2%. La migration est réalisée à 100 V pendant 20 min puis les oligonucléotides fluorescents sont révélés à l'aide du scanner Typhoon FLA 9500 (GE HealthcareLife Sciences, Uppsala, Suède). La quantification du taux d'oligonucléotides-FAM libres et

fixés sur les plasmides est réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Les plasmides sont révélés à l'aide d'une exposition aux UV (Gel Doc™ XR+, Bio-Rad Laboratories, USA) après une incubation sur la nuit du gel d'agarose dans un bain de SybR Green (Sigma, Saint-louis, USA) à température ambiante et à l'abri de la lumière.

4.3 Caractérisation des complexes ADN/Polymères

Une solution avec 30 µl de polymère PTG1 à 1 µg/µl diluée avec 30 µl d'HEPES 10 mM, pH 7,4 est ajoutée goutte à goutte, en vortexant, à une solution contenant 5 µg de plasmide ADN dilué dans 45 µl d'HEPES 10 mM pH 7,4. Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante. Les complexes sont dilués 50 fois dans de l'HEPES 10 mM pH 7,4 puis caractérisés en utilisant l'appareil Nano Particle Analyzer SZ-100 (Horiba Scientific).

4.4 Microscopie confocale

4.4.1 Immunomarquages de la protéine CFTR

1.10⁶ cellules sontensemencées sur une lamelle en verre déposée au fond des puits d'une plaque de 4 puits. Puis, 48h après la transfection avec les complexes PTG1/ADNp-CFTR+/-6TH, les cellules sont lavées 3 fois avec 500 µl de PBS 1X puis fixées et perméabilisées avec du méthanol 90% froid, pendant 30 minutes à -20°C. Les cellules sont lavées 3 fois avec 500 µl PBS/BSA 0,5%/puits. Après l'élimination du dernier lavage, 200 µl d'anticorps primaires (anticorps monoclonal de souris anti-CFTR ; sc58615, lot D1515, Santacruz) dilués au 1/50^{ème} dans PBS/BSA 1% sont déposés sur

les cellules et placés à température ambiante pendant 1 heure. Les cellules sont lavées 3 fois avec 500 µl de PBS/BSA 0,5%/puits. Puis, 200 µl d'anticorps secondaires (anticorps de lapin Alexa fluor 488 anti-immunoglobulines G de souris, A11059, Lot 1832425, Thermofisher Scientific) dilués au 1/200^{ème} dans PBS/BSA 1% sont incubés avec les cellules à température ambiante pendant 45 minutes. Après 3 lavages avec du PBS 1X, les lamelles sont montées sur les lames d'observation avec une goutte de milieu de montage (Vectashield, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) et scellées avec du vernis. Les lames sont stockées à 4°C et à l'abri de la lumière. Les images ont été réalisées à l'aide du microscope confocal Zeiss LSM 510 équipé d'un objectif x63 à immersion.

4.4.2 Immunomarquages de la protéine Dystrophine

Pour l'immunomarquage des cellules transfectées avec les complexes PTG1/ADNp-Dys+/-6TH, le même protocole a été suivi à la différence des anticorps primaires (anticorps primaires de lapin anti-dystrophine ab15277; Abcam) et anticorps secondaires (immunoglobulines de chèvre Alexa fluor 488 anti-IgG de lapin ; A10034, Thermofisher).

4.5 Interactions microtubules isolés Qdot-P4

4.5.1 Quantum dots

Les quantum dots sont des sondes fluorescentes nanométriques constituées de cristaux en matériaux semiconducteur (CdSe). Ils sont recouverts d'une coque semi-conductrice en ZnS améliorant les propriétés optiques des particules. La couleur émise par les quantum dots est dépendante de la taille des particules. Le contrôle de la taille

lors de leur production permet d'assurer des spectres d'émission très pointus. Les quantum dots sont caractérisés par leurs propriétés optiques de brillance et de photorésistance. Les quantum dots (Q10141MP, Invitrogen, USA) utilisés dans ce projet possèdent une couche supplémentaire de polymère qui permet le couplage de 5 à 10 molécules de streptavidine par quantum dot. Ces Qdots conjugués à la streptavidine ont une taille comprise entre 15-20 nm (figure 40) et sont caractérisés par un spectre d'émission dont le pic maximum est à 525 nm (figure 40).

La préparation des Qdots-streptavidine/P4 commence par une étape de centrifugation de la solution stock de Qdots 525 ITK™ à 1 μ M (Q10141MP, Invitrogen, USA) à 5000 g pendant 3 minutes. Puis, 3 μ l de la solution sont mélangés à 1 μ l de PBS 10X, 3 μ l d'eau et 3 μ l (0,3 μ g) d'une solution de peptide biotine-P4 à 0,1 μ g/ μ l. Les complexes Qdots-streptavidine + P4 sont incubés pendant 1 h à température ambiante avant les observations microscopiques.

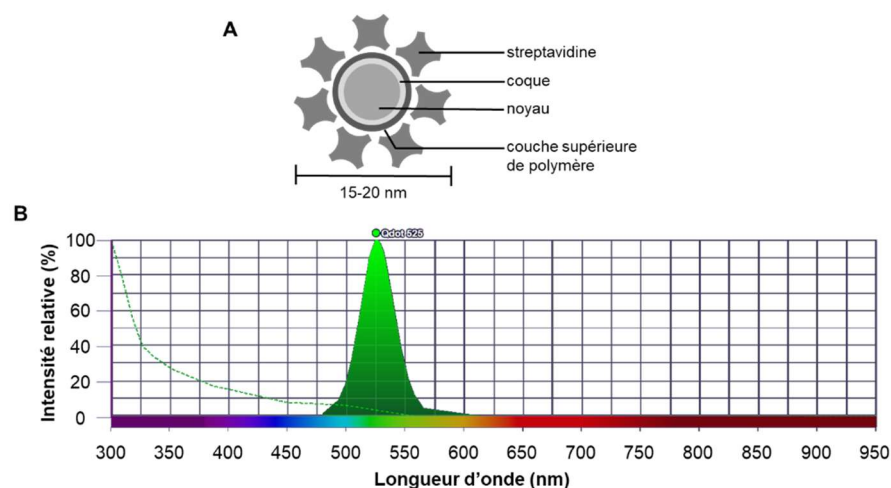


Figure 40 : Caractéristiques des Qdots® 525 conjugués à la streptavidine. A : Structure globale d'un Qdot conjugué à des molécules de streptavidine avec les différents éléments structuraux qui composent le Qdots. B : Spectre d'excitation (pointillés) et d'émission (vert plein) des Qdots 525 streptavidine.

4.5.2 Microtubules isolés

Avant de commencer la préparation, le tampon G-PEM 4,5% glycérol (composé de Microtubule Cushion Buffer 60% glycérol, General Tubulin Buffer et de GTP à 1 mM) (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA) et le tube de X-rhodamine tubuline (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA) sont placés sur la glace pendant 5 minutes. La tubuline (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA.) est suspendue dans 4 µl de G-PEM 4,5% glycérol, centrifugée à 4°C à 14 000 g pendant 10 min puis aliquotée à 0,5 µl/tube.

- **Préparation des microtubules isolés**

Un aliquot de 0,5 µl de tubuline/G-PEM 4,5% est incubé à 37°C pendant 20 minutes sur un bloc chauffant. En parallèle, 1 µl de taxol à 2 mM est mélangé à 19 µl de G-PEM + 4,5% glycérol et gardé à température ambiante. 0,15 µl de taxol à 100 µM sont ajoutés à la réaction de polymérisation de la tubuline et incubés à 37°C pendant 5 minutes afin de stabiliser les microtubules. Pour les observations microscopiques, les 0,5 µl de microtubules sont dilués dans 80 µl de tampon G-PEM contenant 30% glycérol, 1 mM de GTP et 20 µM de taxol, préchauffé à 37°C.

- **Préparation d'extraits cytosoliques**

Les extraits cytosoliques sont préparés à partir d'une flasque T75 contenant 1.10^7 cellules HeLa. Les cellules sont lavées 3 fois pendant 2 min avec 2 ml de PBS froid complété avec 0,2% BSA puis lavées 3 fois pendant 2 min avec 2 ml de PBS 1X froid. Après ces lavages, les cellules sont récupérées en grattant la flasque en présence d'1 ml de PBS 1X puis transférées dans un tube falcon de 14 ml. Les cellules sont centrifugées à 400 g pendant 5 min, à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules sont reprises dans

3 ml de tampon d'homogénéisation (250 mM sucrose, 3 mM imidazole, 0,1% de gélatine, pH 7.4) puis centrifugées à 400 g, 5 min, à 4°C. Le surnageant est éliminé et les cellules sont reprises dans 1 ml de tampon d'homogénéisation auquel sont ajoutés 10 µl (dilution au 1/100^e) de cocktail inhibiteur de protéases (1 µg/ml d'antipaine, 1 µg/ml de pepstatine, 1 µg/ml de leupeptine, 15 µg/ml de benzamidine) (Sigma, Saint Louis, USA). Les cellules sont lysées en les passant 5 fois dans une seringue jetable avec une aiguille de 22G, puis centrifugées à 800 g, 5 min, 4°C. 400 µl sont prélevés à la surface du mélange et 45 µl d'ATP y sont ajoutés (concentration finale = 100 mM). Les extraits cytosoliques sont conservés sur la glace, puis réchauffés à 37°C au moment de l'observation pour éviter la dépolymérisation des microtubules.

Une fois que les échantillons sont préparés, 1 ou 2 µl d'échantillon (extrait cytosolique + microtubules + Qdots) sont déposés sur une lame de microscope placée sur une plaque chauffante à 40°C pendant 30 secondes à 1 minute. Ensuite, une lamelle est placée sur l'échantillon à observer avant que le dépôt soit totalement sec. Finalement, les acquisitions ont été réalisées avec le microscope confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging) équipé d'un objectif x63 à immersion dans l'huile.

4.5.3 Co-Immunoprécipitation

Les lysats de cellules HeLa-FIP1-C1eGFP sont préparés à partir d'une flasque T75 d'environ 10⁷ cellules. Les cellules sont lavées avec 3 ml de PBS 1X et décollées avec 5 ml de Trypsine à 37°C pendant 5 minutes. Les cellules sont transférées dans un tube de 15 ml et 5 ml de milieu complet sont ajoutés pour neutraliser l'action de la trypsine, puis centrifugées à 400 g pendant 3 min. Les culots cellulaires sont lavés avec

du PBS 1X et centrifugées à 400 g pendant 3 min. Les cellules sont lysées avec 1 ml d'un tampon acétate de sodium 50 mM à pH = 6, contenant 0.5% Triton X-100, en vortexant à température ambiante pendant 10 minutes. Le lysat est clarifié par une centrifugation à 800 g pendant 10 minutes à 4°C.

100 µl de lysat contenant la protéine FIP1-C1eGFP sont incubés dans un tube à hémolyse en verre avec 50 µg du complexe streptavidine-biotine-P4 en présence d'1 µl d'ATP à 1 M (5 mM final) complété à 200 µl avec du tampon HBSS 1X. Après une incubation sur la nuit à 4°C, 200 µl de tampon HBSS 2X et 20 µg de billes (soit 20 µl de billes + 80 µl de tampon HBSS 10% BSA) sont ajoutés au mélange.

Le surnageant est transféré dans un nouveau tube à hémolyse en verre et sont ajoutés 20 µg de billes agarose couplées à des anticorps monoclonaux de souris anti-eGFP (SC-9996AC, Santa Cruz) dans 80 µl HBSS 10% BSA.

Après une nuit d'incubation à 4°C, les billes d'agarose sont centrifugées à 800 g pendant 30 secondes et lavées 3 fois avec 500 µl HBSS 1X à pH 8.2.

Ensuite, une électrophorèse SDS-PAGE est réalisée afin de mettre en évidence les interactions entre le peptide P4 et la protéine FIP1-C1eGFP cytosoliques en déposant 20 µl d'échantillon dans du Tampon Laemmli 2X (LBS 2X) préalablement chauffé à 95°C pendant 5 minutes ou stockés à -20°C.

- **Co-immunoprécipitation en présence de plasmide ADN**

Afin de vérifier la présence de l'ADN plasmidique associé au peptide P4, l'ADN doit être purifié. Pour cela, les billes sont lavées 3 fois avec 500 µl HBSS 1X, pH 8.2, puis incubées 1 heure à 65°C en présence de 100 µl de tampon HBSS 1X contenant 0,1% de

SDS et 30 µg de protéinase K (Invitrogen, USA). 200 µl de tampon HBSS 1X sont ajoutés pour obtenir un volume suffisant avant de réaliser les lavages au phénol/chloroforme. L'ADN immunoprécipité est lavé 3 fois dans un volume de phénol/chloroforme, vortexé pendant 1 minute et centrifugé à 20000 g pendant 1 minute à 4°C. La phase aqueuse est récupérée après chaque lavage. Après le dernier lavage, pour précipiter l'ADN, le volume est ajusté à 500 µl avec de l'eau avant d'ajouter 0,1 volume de NaCl 5 M et 2 volumes d'éthanol absolu froid. Le mélange est incubé sur la nuit à -80°C, centrifugé à 20000 g pendant 20 min et lavé à l'éthanol 70% avant d'être séché et repris dans de l'eau. Les échantillons d'ADN immunoprécipités sont dosés en prenant l'absorbance à 260 nm au Nanodrop (NanoDrop One, Thermo Scientific).

Afin de vérifier que les ADN précipités correspondent au plasmide de départ une réaction de PCR est réalisée selon les conditions suivantes :

Composant	25 µl réaction	50 µl réaction	Concentration finale
5X OneTaq Standard tampon de réaction	5 µl	10 µl	1X
10 mM dNTPs (#N0447)	0,5 µl	1 µl	200 µM
10 µM amorce Luc sens	0,5 µl	1 µl	0.2 µM
10 µM amorce Luc antisens	0,5 µl	1 µl	0.2 µM
OneTaq Hot Start ADN Polymerase	0,125 µl	0.25 µl	1,25 unités/50 µl PCR
Matrice ADN	variable	variable	< 1 000 ng
Eau	Jusqu'à 25 µl	Jusqu'à 50 µl	

L'amplification des plasmides sont réalisées avec le thermocycleur (4484073, Thermofisher) selon le protocole suivant : Dénaturation initiale (94°C 30 seconds), 30 cycles : (94°C, 15-30 seconds ; 45–68°C, 15-60 seconds ; 68°C 1 minute per kb), Extension finale (68°C, 5 minutes).

5 Chapitre V : Partie expérimentale

5.1 Construction de plasmide de différentes tailles

L'objectif de mon projet de thèse concerne l'optimisation du transfert non-viral de gènes et plus particulièrement le développement d'une stratégie de fixation d'un peptide signal sur un plasmide ADN pour augmenter la migration du plasmide sur les microtubules dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne et de la mucoviscidose. Il a été montré que le peptide P4, associé à un plasmide ADN par un pont streptavidine-biotine, tend à faciliter la migration du plasmide le long des microtubules et à améliorer l'efficacité de transfection. Mes recherches avaient pour but de remplacer le système biotine-streptavidine par une liaison du peptide P4 en un site spécifique dans le plasmide afin de rendre la conjugaison du peptide P4 sur l'ADN cliniquement applicable. Nous avons choisi un système d'ancrage ciblé du peptide sur le plasmide par l'intermédiaire d'un oligonucléotide formant une triple hélice (TFO) au niveau d'un site oligopurine•oligopyrimidine inséré dans le plasmide (figure 41).

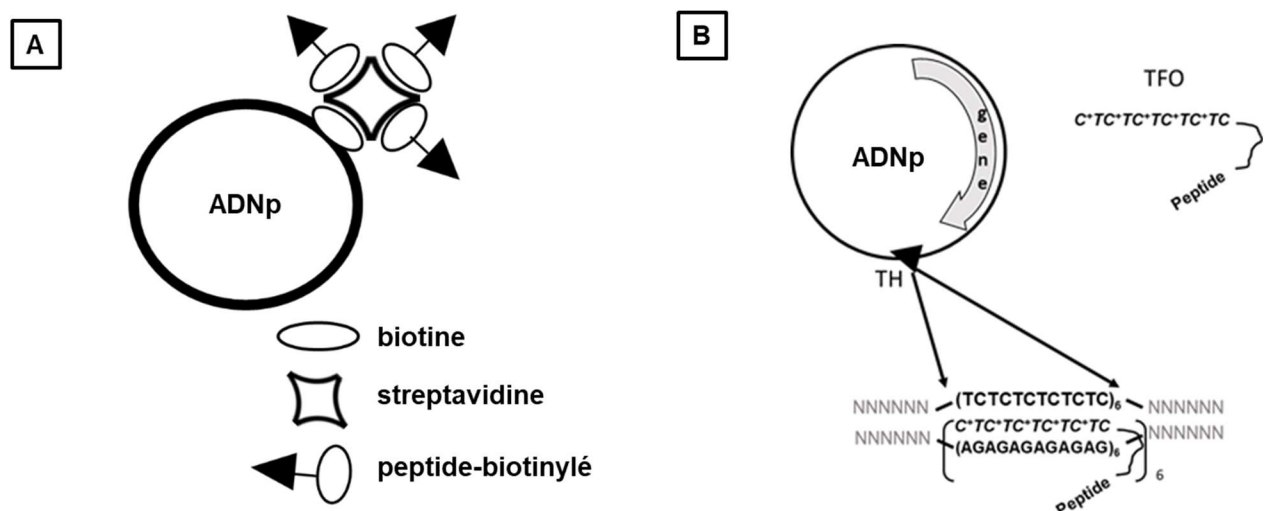


Figure 41 : Les stratégies de conjugaison du peptide P4 sur un plasmide ADN. (A) Le peptide P79-98 biotinylé est lié à un plasmide ADN biotinylé via un pont streptavidine (Pigeon et al., 2013). (B) Le peptide P4 à un ADNp via un TFO-BNA capable de former une triple hélice avec un plasmide ADN contenant des séquences oligopurines*oligopyrimidines (site TH).

Nous avons utilisé pour cela des plasmides de tailles variables (5kb, 10kb et 20kb) codant le gène luciférase ou le gène luciférase et un gène médicament (Dystrophine ou CFTR) et contenant un ou six sites composés de 6 séquences (AGAGAGAGAGAG•TCTCTCTCTCTC) répétées en tandem, notées TH, dans lesquelles peuvent s'insérer 6 brins complémentaires (CTCTCTCTCTCTC) en formant une triple hélice (figure 41) (Zelphati *et al.*, 1999). Le TFO utilisé dans ce projet correspond à la séquence (CTCTCTCTCTCTC) dans laquelle les cytosines sont remplacées par des cytosines contenant un pont 2'-O-4'-aminoéthylène en position 2' et 4' du ribose. Ces structures nucléotidiques sont appelées BNA, pour « *Bridged Nucleic Acids* ». Ces analogues de nucléotides confèrent une meilleure complémentarité des bases azotées avec une séquence composée de nucléotides phosphodiester et forment des liaisons plus stables et plus fortes que celles observées dans une triple hélice utilisant des oligonucléotides phosphodiester, des *Peptide Nucleic Acids* (PNA) ou encore des *locked nucleic acid oligonucléotides* (LNA) (Hertoghs *et al.*, 2003) (figure 42).

Les BNA nucléotides favorisent la complémentarité de séquence avec les ARN et les ADN, augmentent la spécificité, la stabilité thermique des duplexes et des triplexes et confèrent une meilleure résistance aux exo- et endonucléases. Par conséquent, notre but a été de maîtriser les conditions de liaison du peptide sur l'ADN, la formation de la triple hélice et du nombre de peptide capable d'être fixé selon la taille du plasmide.

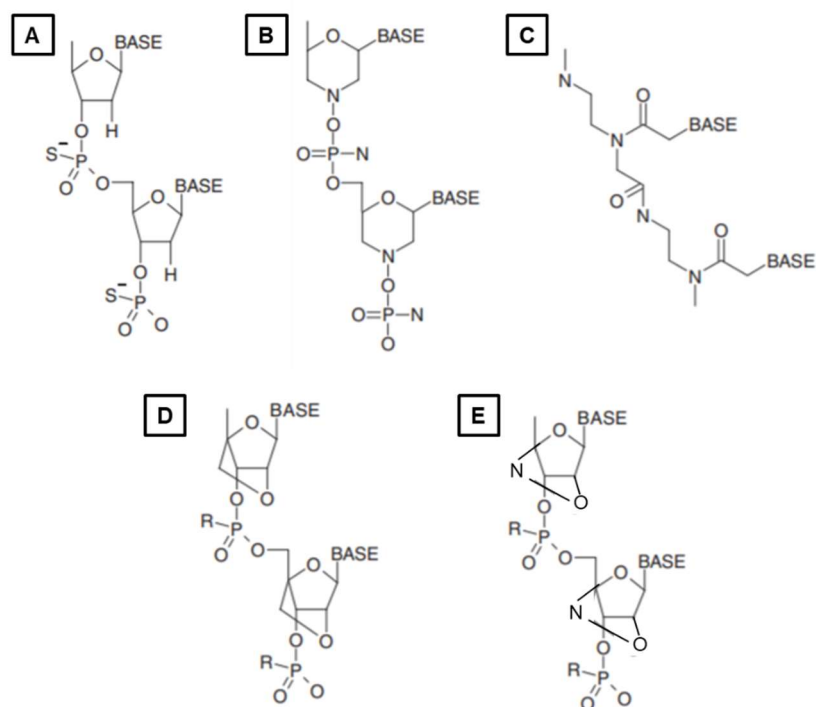


Figure 42 : Exemple des principaux types d'analogues de nucléotides retrouvés dans les TFO. (A) phosphorothioates, (B) phosphoroamidates morpholino, (C) *Peptide nucleic acids* (PNA), (D) *Locked nucleic acids* (LNA) et (E) *Bridged nucleic acids* (BNA).

La première étape de ce projet correspond à la vérification de l'expression des transgènes portés par les différents plasmides par des tests de bioluminescence et par immunofluorescence. Ensuite, les conditions de conjugaison du peptide avec le TFO ont été étudiées ainsi que les paramètres de formation des triples hélices entre le TFO et les plasmides ADN. Puis, la robustesse et la stabilité de la triple hélice sur la résistance thermique, la stabilité de cette liaison et la formation des polyplexes ont été évaluées. Finalement, des expériences *in vivo* ont été menées en collaboration avec l'UBO de Brest en injectant les plasmides dans les membres postérieurs de souris Swiss, par une injection hydrodynamique.

La figure 43 résume les constructions plasmidiques réalisées pour ce projet. Les différents plasmides ont été réalisés par Delphine MAZE et les étapes de leur construction sont décrites dans l'annexe 1. Les plasmides finaux codent pour la séquence complète de la dystrophine (DYS) ou de CFTR sous la dépendance d'un promoteur tissu-spécifique et possèdent six sites TH (TCTCTCTCTC• AGAGAGAGAGAG), soit théoriquement 36 sites capables de former une triple hélice avec le TFO complémentaire de séquence C+TC+TC+TC+TC+TC+T. Deux versions de chaque plasmide ont été construites l'une avec des séquences 3NF comme signal pour l'importation nucléaire et l'autre sans (figure 43). La séquence du gène de la luciférase est également insérée dans la séquence plasmidique et placée sous la dépendance du promoteur CMV.

Le gène de la luciférase permet d'évaluer plus simplement et rapidement par bioluminescence l'efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* par rapport à un immunomarquage pratiqué pour détecter l'expression de la protéine dystrophine ou CFTR dans les tissus lors d'un premier criblage. Le fait que le gène de la luciférase et le gène médicament (dystrophine ou CFTR) soient insérés dans le même plasmide sous la dépendance de leur propre promoteur devrait permettre la corrélation entre les données de bioluminescence et l'expression du gène médicament.

Le gène de la dystrophine est placé sous la dépendance du promoteur spc5.12, spécifique des cellules des muscles squelettiques (Li *et al.*, 1999) et le gène codant la protéine CFTR est placé sous la dépendance du promoteur hCEF1-CFTR (*human CMV-Elongation Factor 1 α*) spécifique des tissus pulmonaires (Pringle *et al.*, 2012).

Une séquence 3NF est insérée en amont de chaque promoteur, une autre en aval des transgènes (Luc, DYS ou CFTR). La construction de ces différents plasmides est détaillée dans l'annexe 1. Des plasmides supplémentaires codant pour le gène de la luciférase ont également été utilisés dans cette étude. Il s'agit des plasmides pGeneGrip (5,063 kb), pTG11033 (9,514 kb) et pTG1133-6TH (10 kb). Ces plasmides sont plus petits que les plasmides codant les gènes médicaments et contiennent une seule séquence TH, soit six sites de formation de triples hélices. Seul le plasmide pTG11033 ne possède pas de séquence TH. Ces plasmides sont utilisés pour évaluer, par bioluminescence, l'impact du nombre de peptide P4 par molécule de plasmide sur l'efficacité de transfection en fonction de la taille des plasmides.

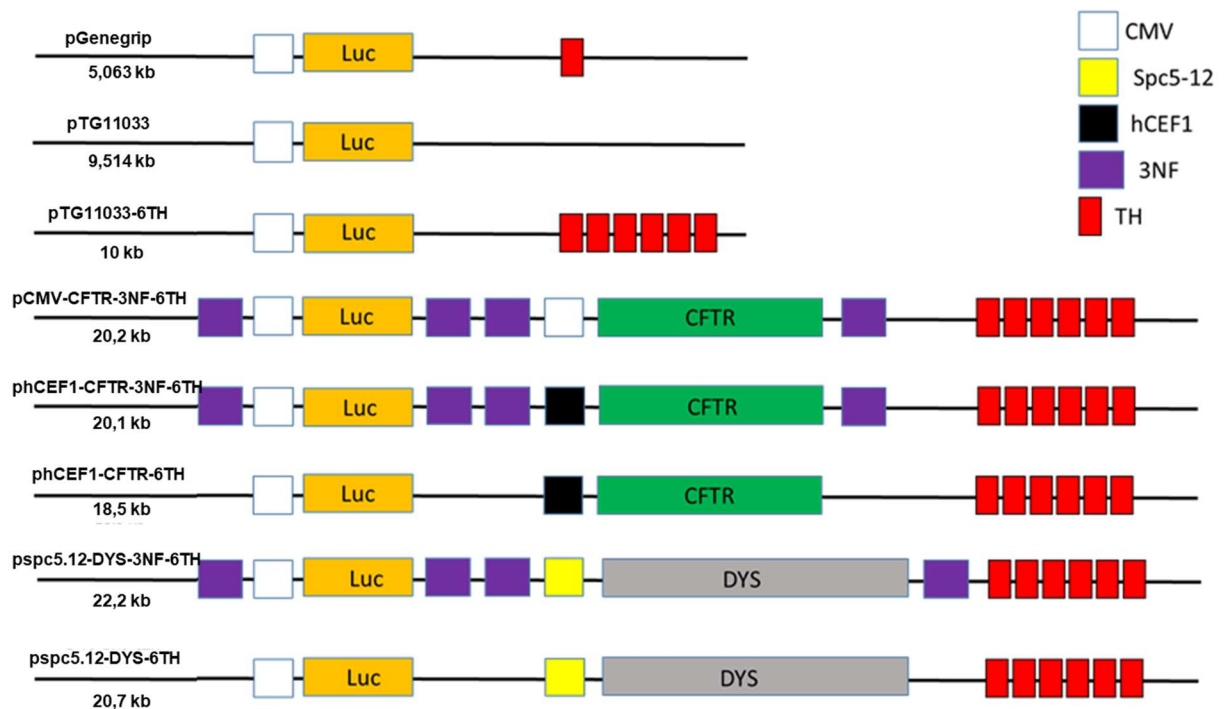


Figure 43 : Schéma des plasmides utilisés dans le projet. Le plasmide pGenegrip (5,063 kb) contient le gène codant la luciférase (Luc, orange) sous la dépendance d'un promoteur CMV (blanc) et une séquence oligopurines•oligopyrimidines (TH, rouge). Le plasmide pTG11033 (9,514 kb) contient le gène Luc sous la dépendance d'un promoteur CMV. Le plasmide pTG11033-6TH (10 kb) contient Luc sous la dépendance d'un promoteur CMV et 6 séquences oligopurines•oligopyrimidines. Le plasmide pCMV-CFTR-3NF-6TH (20,2 kb) contient le gène codant la protéine CFTR (vert) sous la dépendance d'un promoteur CMV, le gène Luc sous la dépendance d'un promoteur CMV, quatre séquences 3NF (violet) et 6TH. Le plasmide phCEF1-CFTR-3NF-6TH (20,1 kb) contient le gène CFTR (vert) sous la dépendance d'un promoteur hCEF1 spécifique des tissus pulmonaires (hCEF1, noir), le gène Luc sous la dépendance d'un promoteur CMV, quatre séquences 3NF et 6TH. Le plasmide phCEF1-CFTR-6TH (18,5 kb) contient CFTR, Luc, 6TH mais pas de séquence 3NF. Le plasmide pspc5.12-DYS-3NF-6TH (22,2 kb) contient le gène codant la dystrophine (DYS, gris) sous la dépendance du promoteur spc5.12 spécifique des tissus musculaire (Spc5.12, jaune) et le gène Luc sous la dépendance d'un promoteur CMV, quatre séquences 3NF et six séquences oligopurines•oligopyrimidine. Le plasmide pspc5.12-DYS-6TH (20,7 kb) contient DYS, Luc, six séquences TH mais pas de séquences 3NF.

5.1.1 Fonctionnalité des ADNp : expression du gène codant la luciférase par bioluminescence

Après la construction des différents plasmides, l'expression du gène de la luciférase, présent dans chaque plasmide sous la dépendance du promoteur CMV, a été évaluée par des tests de bioluminescence dans différents types cellulaires comme les cellules HeLa, qui sont des cellules épithéliales de carcinomes ovariens humains, les cellules C2C12 provenant de muscles squelettiques murins et les cellules CFBE qui sont des cellules épithéliales de bronches d'origine humaine et porteuses de la mutation $\Delta F508$ dans le gène CFTR. 48H après la transfection des différents plasmides complexés au polymère PTG1, l'activité de la luciférase a bien été détectée dans les différents types cellulaires testés (figure 44). Globalement, le niveau de l'activité de la luciférase dans les cellules HeLa et CFBE est plus élevé que dans les cellules C2C12. Ces différences sont probablement dues au degré de transfectabilité propre à chaque type cellulaire. Ces résultats indiquent que l'ensemble des plasmides construits pour ce projet de thèse expriment fortement la luciférase dans les cellules de mammifères.

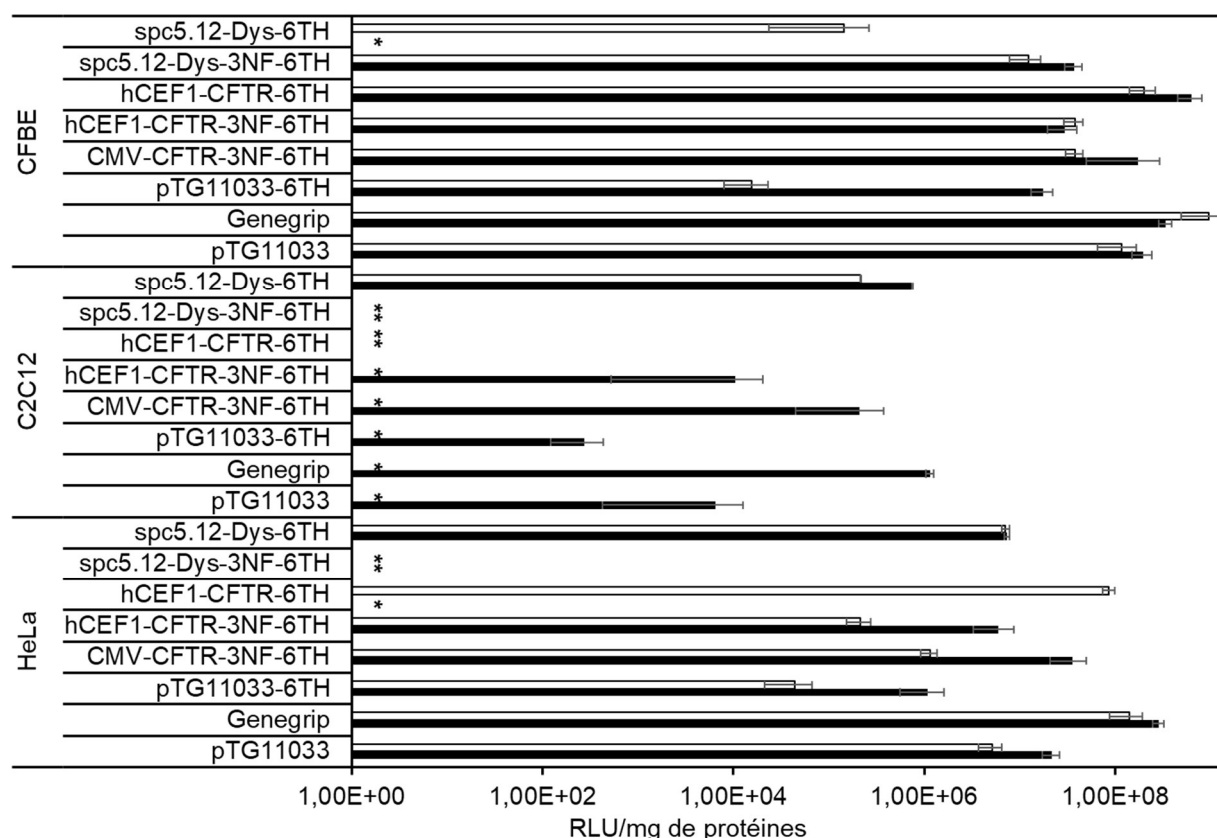


Figure 44 : Efficacité de transfection des différents ADNp dans les cellules HeLa, CFBE et C2C12. Les cellules HeLa, C2C12 et CFBE sont transfectées avec 0,5 (histogramme blanc) ou 1 µg (histogramme noir) de pTG11033, pGenegrip, pTG11033-6TH, CMV-CFTR-3NF-6TH, hCEF1-CFTR-3NF-6TH, hCEF1-CFTR-wo3NF-6TH, pspc5.12-Dys-3NF-6TH complexés avec PTG1PTG1. L'activité de la luciférase dans le lysat cellulaire est mesurée 48h après la transfection et exprimée en unités relatives de lumière (RLU) par mg de protéines. Les conditions qui n'ont pas été testées en transfection sont indiquées par des astérisques (*). Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées +/- SD (n=3).

5.1.2 Fonctionnalité des ADNp : immunomarquage des protéines CFTR et

Dystrophine et spécificité des promoteurs

La fonctionnalité des plasmides codant la dystrophine a été étudiée dans les cellules H2Kmdx. Ces cellules, qui ne possèdent pas de dystrophine endogène, ont été transfectées avec le plasmide pspc5.12-DYS-3NF-6TH. L'immunomarquage montre un fort taux d'expression de la protéine dystrophine (figure 45 B). En comparaison aux cellules H2Kmdx transfectées avec le plasmide pCMV-Dys-3NF, codant la dystrophine

sous le contrôle d'un promoteur CMV, le niveau de dystrophine semble inférieur à celui observé dans les cellules transfectées avec le gène de la dystrophine sous la dépendance du promoteur spc5.12 spécifique des tissus de muscles squelettiques (Figure 45 A et B). Ces résultats sont en accord avec ceux publiés par Li *et al.* (Li *et al.*, 1999). La spécificité du promoteur pour les tissus musculaires a été évaluée en utilisant des cellules HepG2 (lignée cellulaire de carcinomes hépatiques) dans lesquelles le promoteur spc5.12 ne fonctionne pas. L'absence de marquage dystrophine dans les cellules HepG2 transfectées avec le plasmide spc5.12-Dys-3NF-6TH codant la dystrophine sous le contrôle du promoteur spécifique spc5.12 montre la spécificité du promoteur spc5.12 pour les tissus musculaires (figure 45 D-F). Des images similaires ont été obtenues avec le plasmide pspc5.12-DYS-6TH.

La fonctionnalité des plasmides CFTR a été évaluée dans les cellules CFBE. L'immunomarquage révèle un fort taux d'expression de la protéine CFTR dans les cellules CFBE, 48h après la transfection, en comparaison aux cellules non transfectées (figure 45 G-I). La spécificité de promoteur hCEF1 pour les tissus pulmonaires a été vérifiée en transfectant les cellules C2C12. En comparaison des cellules CFBE, l'absence de marquage CFTR dans les cellules C2C12 transfectées avec le plasmide phCEF1-CFTR-3NF-6TH codant la protéine CFTR sous le contrôle du promoteur spécifique hCEF1 montre la spécificité de ce promoteur pour les tissus pulmonaires (figure 45 J et K). Comme le montre l'expression du CFTR dans les cellules C2C12 avec le plasmide CMV-CFTR-3NF, l'absence d'expression de CFTR dans les cellules C2C12 transfectées

avec le plasmide phCEF1-CFTR-3NF-6TH n'est pas due à une non-fonctionnalité du plasmide.

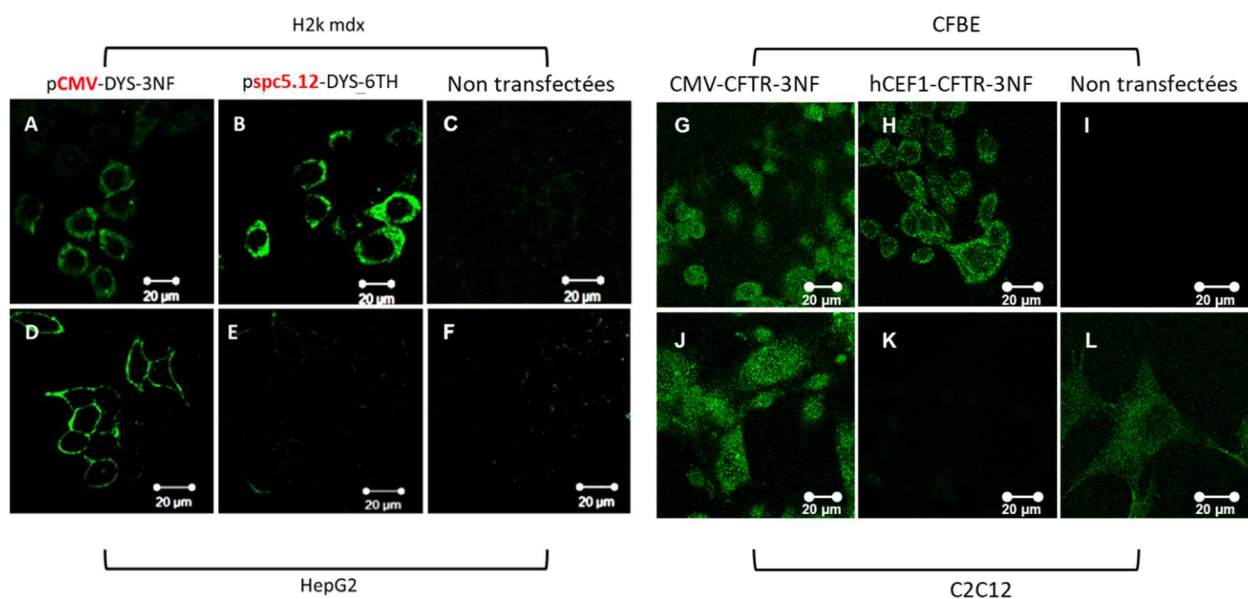


Figure 45 : Immunomarquage et spécificité tissulaire des promoteurs spc5.12 et hCEF1. Les cellules H2kmdx sont transfectées avec PTG1 complexé avec 1 µg (A) p3NF-CMV-DYS, (B) pspc5-12-DYS-6TH ou (C) non transfectées et les cellules HepG2 sont transfectées avec PTG1 complexé avec 1 µg (D) p3NF-CMV-DYS, (E) pspc5-12-DYS-6TH ou (F) non transfectées. L'immunomarquage est réalisé avec des anticorps primaires anti-dystrophine (ab15277 ; Invivogen) et des anticorps secondaires Alexa fluor 488 de chèvre anti-IgG de lapin (A10034, Thermofisher). Les cellules CFBE sont transfectées avec PTG1 complexé avec 1 µg (G) pCMV-CFTR-3NF, (H) phCEF1-CFTR-3NF-6TH ou (I) non transfectées et les cellules C2C12 sont transfectées avec PTG1 complexé avec 1 µg (J) pCMV-CFTR-3NF, (K) phCEF1-CFTR-3NF-6TH ou (L) non transfectées. L'immunomarquage de la protéine CFTR est réalisé avec des anticorps primaires anti-CFTR (sc58615, SantaCruz) de souris et des anticorps secondaires Alexa fluor 488 de lapin anti-IgG de souris (A11059, Thermofisher). Les analyses microscopiques (Confocal laser scanning microscopy (CLSM)) sont réalisées avec le microscope Zeiss Axiovert 200 M associé au Zeiss LSM 510 scanning device.

L'ensemble de ces résultats indique que les différents plasmides construits pour ce projet permettent de faire exprimer la luciférase, la dystrophine ou le CFTR selon les cellules avec une spécificité des promoteurs tissus spécifiques.

5.2 Caractérisation des étapes de construction des ADNp-TH-peptide

La suite du projet se concentre sur la maîtrise des conditions de liaison du peptide P4 sur les plasmides ADN. Les différentes étapes sont la conjugaison du peptide sur les TFO puis l'évaluation du nombre de TFO-peptide par molécule d'ADN, la spécificité, la cinétique de formation des triples hélices ainsi que la stabilité de la liaison.

5.2.1 Conjugaison entre peptide et TFO

La réaction de conjugaison entre l'oligonucléotide (TFO) capable de former des triples hélices et le peptide (P4 ou P1) se réalise spontanément en milieux aqueux entre le groupement azide présent à l'extrémité C-terminale du peptide P4 et la fonction dibenzycyclooctyne, DBCO, présente à l'extrémité 5' du TFO (C+TC+TC+TC+TC+TC, Biosynthesis, Lexis, TX, USA) (figure 46 **Figure 46**). Cette réaction de « chimie click » est quantitative, indépendante de la présence de cuivre et ne génère pas de produits secondaires nécessitant une étape de purification.



Figure 46 : Schéma de la conjugaison entre le TFO et le peptide P4

Pour caractériser cette conjugaison, une étude cinétique a été réalisée afin de déterminer le temps nécessaire pour que tous les oligonucléotides soient conjugués au peptide. Pour cela, les oligonucléotides TFO(BNA)-DBCO (Lexis, TX, USA, C+TC+TC+TC+TC+TC-DBCO) sont incubés à différents temps en présence d'une quantité fixe de fluorochrome FAM-azide (0,3 µg, soit 1 équivalent molaire de TFO-DBCO). La comparaison des profils de migration entre les oligonucléotides-FAM et les molécules FAM-azide indique que tous les oligonucléotides sont conjugués au fluorochrome FAM-azide après une nuit d'incubation (figure 47Figure 47).

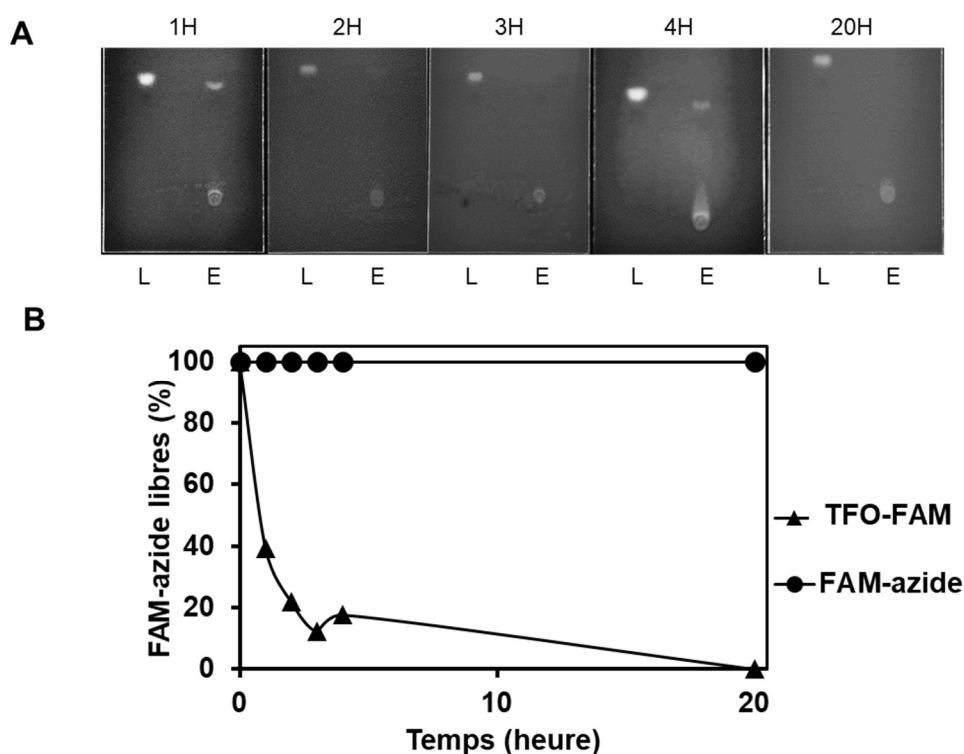


Figure 47 : Etude cinétique de la conjugaison entre l'oligonucléotide-DBCO et un fluorochrome FAM-azide. Le BNA-DBCO est incubé à différents temps en présence d'une quantité fixe de FAM-azide (0,3 µg) (A) Migration des échantillons sur des couches minces de silice révélés aux UVs. L : FAM-azide libre ; E : oligonucléotide-DBCO en présence de FAM-azide. (B) Graphique représentant le pourcentage de FAM-azide libre calculé à partir des intensités de fluorescence des tâches en fonction du temps).

Cette expérience détermine le temps d'incubation nécessaire pour que les molécules de FAM-azide à un équivalent molaire se fixent complètement aux oligonucléotides. Cependant, dans ces conditions, des oligonucléotides-DBCO peuvent rester libres/non couplés. Par conséquent, nous avons incubés les oligonucléotides TFO-DBCO (Lexis, TX, USA, C+TC+TC+TC+TC+TC-DBCO) en présence d'une quantité croissante du peptide-azide (P4 : VVMVGEKPITITQHSVETEGK(N₃)-NH₂ ou P1 : VNLHQCKRGIFCLV KQAKVTTK(N₃)-NH₂), sur la nuit, à température ambiante. Ensuite, 0.3 µg d'un dérivé azide de la fluorescéine-azide (FAM), sont ajoutés au milieu réactionnel et incubés pendant une nuit supplémentaire. L'ajout du FAM-azide permet de visualiser les oligonucléotides n'ayant pas réagi avec le peptide. Pour suivre la réaction de couplage, nous avons utilisé la chromatographie sur couche mince de silice (Polygram SIL G/UV₂₅₄, Macherey Nagel, Düren, Allemagne).

Après dépôt du mélange réactionnel, la migration a lieu dans un bécher fermé contenant un mélange de solvant (16 ml méthanol additionnés de 2 ml d'eau ; 8/1 ; vol:vol) permettant de séparer le FAM-azide libre, qui migre, du FAM-azide fixé sur l'oligonucléotides qui ne migre pas. Après séchage, la couche mince est observée aux UVs (Gel DocTM XR+, Bio-Rad Laboratories, USA). Le taux de FAM-azide libre ou conjugué aux oligonucléotides est estimé à l'aide d'ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA). Les résultats indiquent qu'il est nécessaire de se situer à un rapport molaire peptide-azide/TFO-DBCO de 5 (figure 48).

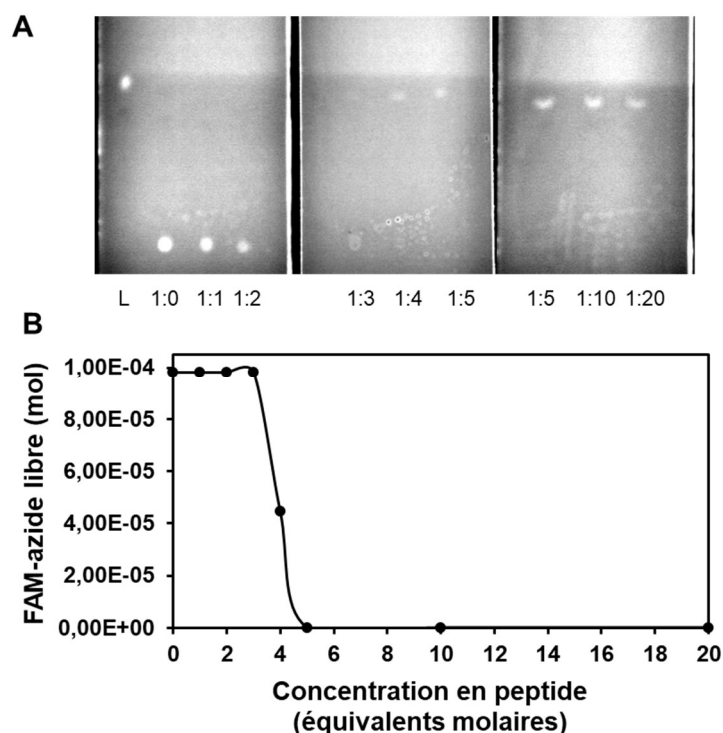


Figure 48 : Etude de saturation entre l'oligonucléotide-DBCO et un peptide-azide. (A) Révélation des couches minces de silice aux UV, après migration des échantillons contenant une quantité fixe d'oligonucléotide-DBCO (1) incubé en présence d'une quantité croissante en équivalents molaire de peptide-azide (0,1, 2, 3, 4, 5, 10 et 20). Ensuite, 0,3 µg de fluorescéine-azide sont ajoutés au milieu réactionnel et incubés pendant une nuit supplémentaire. L : FAM-azide libre. (B) Graphique représentant les intensités de fluorescence des FAM-azide libre en fonction de la concentration en peptide.

5.2.2 Hybridation des TFO-FAM aux plasmides ADN

Dans le but de caractériser la formation des triples hélices, l'hybridation du troisième brin complémentaire responsable de la triple hélice est évaluée à l'aide d'un TFO fluorescent, le TFO-FAM (6-FAM-C+TC+TC+TC+TC+TC). Ce TFO est mis en présence de plasmides possédant ou non la séquence spécifique oligopurine•oligopyrimidine. Après une nuit d'incubation à 4°C, l'analyse de l'hybridation est réalisée par une électrophorèse sur un gel contenant 2% d'agarose selon la méthode employée par Hertoghs en 2003 (Hertoghs et al., 2003). La révélation des TFO-FAM est

effectué par fluorescence en utilisant le scanner Typhoon 9500 qui permet de discriminer les oligonucléotides hybridés et les oligonucléotides libres.

La figure 49 illustre les résultats obtenus après la migration du mélange TFO-FAM/ADNp. L'excitation de la molécule FAM à 488 nm par les lasers du scanner Typhoon FLA 9500 met en évidence deux niveaux de migration. Ces résultats indiquent qu'une partie des TFO-FAM est retardée par l'hybridation avec le plasmide pGenegrip contenant des séquences oligopurine•oligopyrimidine tandis que l'autre partie reste libre et migre plus rapidement. Pour 1,5 µg de plasmide, le taux de triple hélice augmente en fonction de la concentration en TFO-FAM et sature en présence d'environ ~0.4 µM (figure 49). Quand la même expérience est réalisée avec le plasmide pEGFP qui ne contient pas de séquence TH, il n'y a pas de bande correspondante aux oligonucléotides hybridés sur le plasmide ADN (figure 49). Donc, il n'y a pas d'interaction entre le TFO-FAM et le plasmide pEGFP. Ces résultats concernant la spécificité de séquence sont en accord avec ceux utilisant des LNA publiés par K. Hertoghs ([Hertoghs et al., 2003](#)).

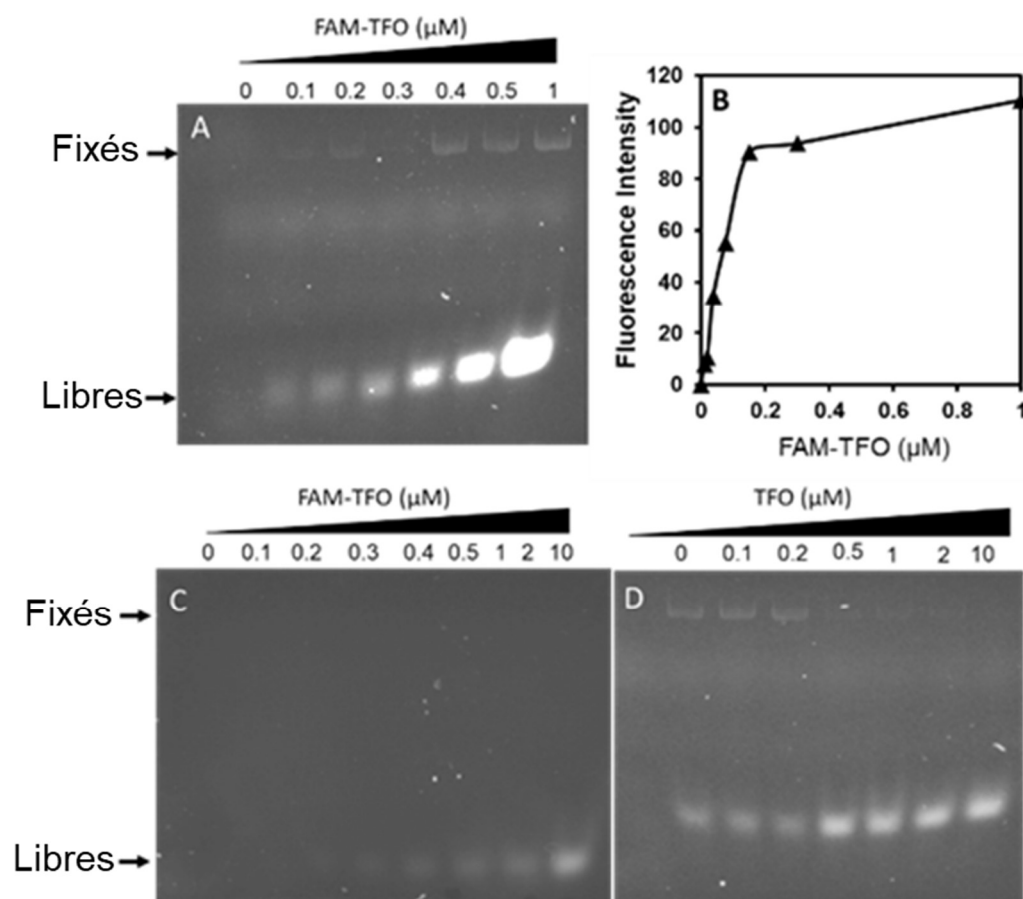


Figure 49 : Formation de triples hélices entre les TFO-FAM et 1 μM de (A) pGeneGrip (contenant des sites polypurine-polypyrimidine) ou (C) pEGFP (sans site polypurine-polypyrimidine) en fonction de la concentration en TFO-FAM. L'hybridation est mesurée à l'aide d'un gel d'agarose à 2% contenant ou non du SybR Green et visualisée à l'aide d'une lampe UV. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence des TFO-FAM fixés en fonction de la concentration en TFO-FAM à l'aide d'imageJ (D) Spécificité d'hybridation : la triple hélice est formée en présence de 1 μM pGeneGrip et 0,2 μM TFO-FAM en présence de TFO non marqués en quantité variable.

Ces expériences sont répétées avec des plasmides de taille différentes afin de déterminer le nombre de TFO-FAM hybridés par molécules d'ADN en fonction de la concentration en TFO-FAM et du nombre de sites TH. La quantification du nombre de TFO-FAM hybridés est réalisée après électrophorèse en gel d'agarose à partir des mesures des intensités de fluorescence des oligonucléotides-FAM libres, afin d'éviter les biais au niveau de l'intensité de fluorescence qui pourraient être dus au couplage des

TFO-FAM sur les ADNp. Les intensités de fluorescence sont relevées à l'aide du logiciel ImageJ, puis la quantité d'oligonucléotides libres est déterminée de manière proportionnelle à la condition contrôle du TFO-FAM seul ou en présence d'un plasmide sans site TH. Ensuite, le rapport entre le nombre de moles de TFO-FAM et le nombre de moles de plasmide ADN permet de déterminer le nombre de TFO-FAM hybridés par molécule de plasmide dans les conditions de l'expérience. Finalement, le nombre maximal de triple hélice capable de se former selon les conditions de l'expérience est déterminé par une courbe en double inverse qui confronte le nombre inverse de TFO-FAM hybridés en fonction de l'inverse de la concentration en TFO-FAM présents dans le milieu réactionnel.

D'après ces calculs, les résultats, répertoriés dans le tableau 21, indiquent que 6 TFO-FAM peuvent se fixer par molécule de plasmide pGenegrip, contenant un site TH. Cette valeur correspond au nombre maximal de TFO capables de s'hybrider dans le site TH du plasmide pGenegrip (tableau 21). Pour les plasmides de 10 et 20 kb contenant 6 sites TH capables de former 36 triples hélices, le nombre maximal de triples hélices formées est estimé à 19 et 18 TFO-FAM, respectivement (tableau 21). Ceci s'expliquerait par la présence des six répétitions de sites TH successives qui pourraient être à l'origine de structures secondaires (triple hélices intramoléculaires) tant dis qu'un seul site TH ne serait pas suffisant pour former ce genre de structures (Buske *et al.*, 2011).

Tableau 21 : Nombre de triple hélice en fonction de la taille du plasmide et du nombre de sites TH

ADNp (en kbp)	Nombre de sites TH	Nombre moyen de TFO-FAM fixés	Ecart type
5	1	6	2
10	6	19	4
20	6	18	8

5.2.3 Hybridation des TFO-P4 aux plasmides ADN

Afin d'évaluer l'impact de l'encombrement stérique du peptide P4 sur la formation de la triple hélice, les plasmides possédant les sites TH sont incubés en présence d'1 μM TFO-FAM et d'une quantité croissante de TFO-DBCO ou de TFO-peptide (0 à 10 μM). Les intensités de fluorescence relevées à l'aide du logiciel ImageJ indiquent que le pourcentage de TFO-FAM liés aux ADNp diminue de la même façon en fonction de la concentration en TFO-DBCO ou TFO-P4 (figure 50 A). La disparition des oligonucléotides fluorescents en présence de TFO-DBCO, ou de TFO-peptide, signifie qu'il existe une compétition entre les deux entités. Les intensités de fluorescence en présence de TFO-P4 sont proches de celles relevées en absence de peptide. La superposition des courbes indique que la présence du peptide n'interfère pas avec l'hybridation du TFO-P4 sur le plasmide ADN. La même expérience de compétition a été réalisée avec le plasmide pGenegrip (5 kb ; 1 site TH) et avec le plasmide pDYS-3NF-6TH (22,2 kb et 6 sites TH) (figure 50 B). La superposition des courbes pGenegrip et pDys-3NF-6TH indique que les triples hélices se forment de la même manière quel que soit le nombre de sites TH.

De plus, ces résultats appuient la caractéristique de spécificité de ce type de liaison par la formation d'une triple hélice au niveau d'une séquence oligopurine•oligopyrimidine.

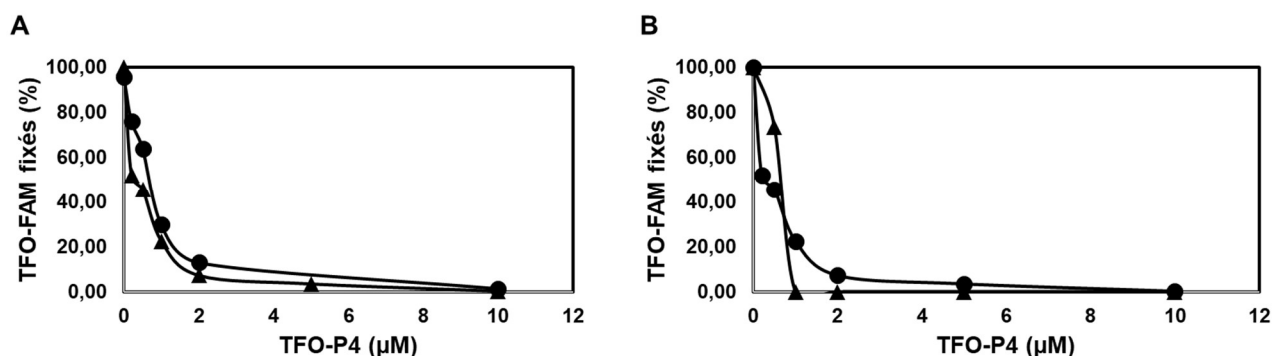


Figure 50 : La formation des triples hélices entre le TFO-P4 et le plasmide pGeneGrip ou pspc5-12-DYS-3NF-6TH. (A) La triple hélice est formée sur la nuit en présence d'1 μg pGeneGrip and 1 μM FAM-TFO en présence d'une concentration variable de (▲) TFO-P4 ou de TFO-DBCO (●). (B) La triple hélice est formée sur la nuit en présence d'1 μg de pspc5.12-Dys-3NF contenant 36 sites TH (▲) ou de plasmide pGeneGrip contenant 6 sites TH (●) et 1 μM TFO-FAM en présence d'une concentration croissante de TFO-P4. L'hybridation est mesurée par électrophorèse sur gel d'agarose 2% et visualisée aux UV. Les intensités de fluorescence sont quantifiées par ImageJ.

Une étude cinétique montre que la formation de la triple hélice est complète après quatre heures d'incubation du pGeneGrip en présence de TFO-FAM (Figure 51). La figure 51 montre également que les intensités de fluorescence mesurées pour le plasmide pGeneGrip sont plus élevées que celles obtenues pour le plasmide phCEF1-CFTR-6TH. Ceci s'explique par la différence en nombre de plasmide contenu dans 1 μg de plasmide à 5 kb ($3 \cdot 10^{-13}$ mol) et 1 μg de plasmide à 18,5 kb ($8 \cdot 10^{-14}$ mol). Il y a donc environ 4 fois plus de plasmide pGeneGrip que de plasmide phCEF1-CFTR-6TH. On sait aussi que le plasmide pGeneGrip peut fixer 6 TFO grâce à son site TH et que le plasmide phCEF1-CFTR peut fixer 18 TFO sur l'ensemble de ses 6 sites TH (soit 3 sites TH complets). Donc le plasmide pGeneGrip fixe environ $1,8 \cdot 10^{-12}$ mol de TFO contre environ $1,4 \cdot 10^{-12}$ pour le plasmide phCEF1-CFTR-6TH. C'est pourquoi les intensités de fluorescence relevées pour le plasmide phCEF1-CFTR-6TH, qui possède 6 sites TH, sont plus faibles que celles pour le plasmide pGeneGrip (figure 51).

L'ensemble de ces résultats montrent que la stratégie adoptée pour fixer le peptide P4 sur un plasmide de manière spécifique et contrôlée est bonne.

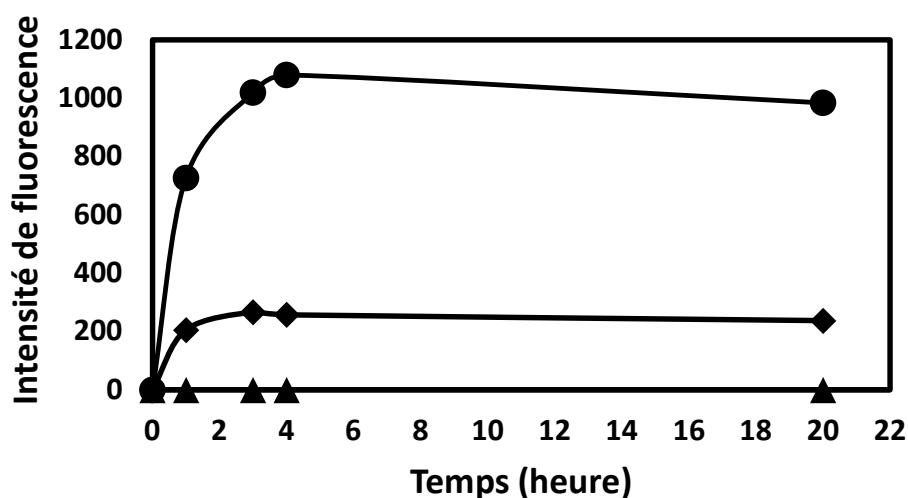


Figure 51 : Cinétique de formation de la triple hélice. 1 μ M TFO-FAM est mélangé avec 1 μ g (●) pGeneGrip (contenant 1 site TH) ou (▲) pTG11033 (sans site TH) ou (◆) phCEF1-CFTR-6TH (contenant 6 sites TH). L'hybridation est mesurée en fonction du temps par électrophorèse sur un gel d'agarose et visualisée avec une lampe UV. Les intensités de fluorescence sont quantifiées à l'aide d'ImageJ.

5.3 Efficacité de transfection des plasmides nus ou complexés associés au peptide P4 par une triple hélice

Dans cette partie, les travaux se focalisent sur l'efficacité de transfection des différentes constructions moléculaires (ADNp-TFO-peptide) et sur l'impact du peptide P4 lorsqu'il est associé à un plasmide par une triple hélice. Pour cela, des tests de bioluminescence *in vitro* et *in vivo* ont été réalisés. Dans un premier temps, les différentes constructions ADNp-TFO-peptide sont complexées au polymère PTG1 afin d'assurer la transfection de différentes lignées cellulaires. Dans un second temps, l'efficacité de transfection des ADN-TFO-peptide est évaluée *in vitro* en utilisant des vecteurs synthétiques et en utilisant la technique d'électroporation. L'efficacité *in vivo* est

déterminée après une injection hydrodynamique des plasmides nus via la veine saphène dans les membres postérieurs de souris Swiss.

5.3.1 Efficacité de transfection des plasmides associés au peptide P4 et complexés à un vecteur synthétique

5.3.1.1 Caractérisation des complexes

La taille et la charge des complexes ont été caractérisées afin d'évaluer l'impact de la triple hélice sur l'état de complexation entre les plasmides ADN de 5, 10 et 20 kb et le polymère cationique utilisé, ici le PTG1. Les résultats obtenus par DLS indiquent que les polyplexes formés entre le PTG1 et les différents plasmides en absence de TFO montrent que celle-ci augmente de 62 nm entre un ADNp de 5kB et un ADNp de 10 kb. On remarque que la taille des polyplexes ne varie plus avec la taille des plasmides : 10 kb = 187,3 +/- 17 nm, 15 kb = 185,2 +/- 38 nm, 20 kb = 165,4 +/- 4,7 nm. Après la formation de la triple hélice, on observe que la taille des polyplexes avec le pGenegrip de 5 kb augmente de 39,2 % (173 nm) par rapport aux polyplexes sans triple hélice. En revanche, il n'y a pas d'effet sur la taille des polyplexes faits avec un plasmide de 20 kb après la formation des triples hélices. (PTG1/phCEF1-CFTR-3NF-6TH à 165 nm contre PTG1/phCEF1-CFTR-3NF-6TH-TFO à 179 nm) (figure 52 A). Les mesures du potentiel ζ des différents polyplexes avec un plasmide ADN de 5 kb et un plasmide ADN de 20 kb indiquent que l'ajout de TFO chargés négativement (TFO-BNA) diminue drastiquement la charge des complexes (figure 52 B). La diminution du potentiel ζ observée entre les polyplexes PTG1/ADNp-TFO et PTG1/ADNp est liée à l'ajout des TFO et donc à l'augmentation de la quantité d'acide nucléique dans les complexes.

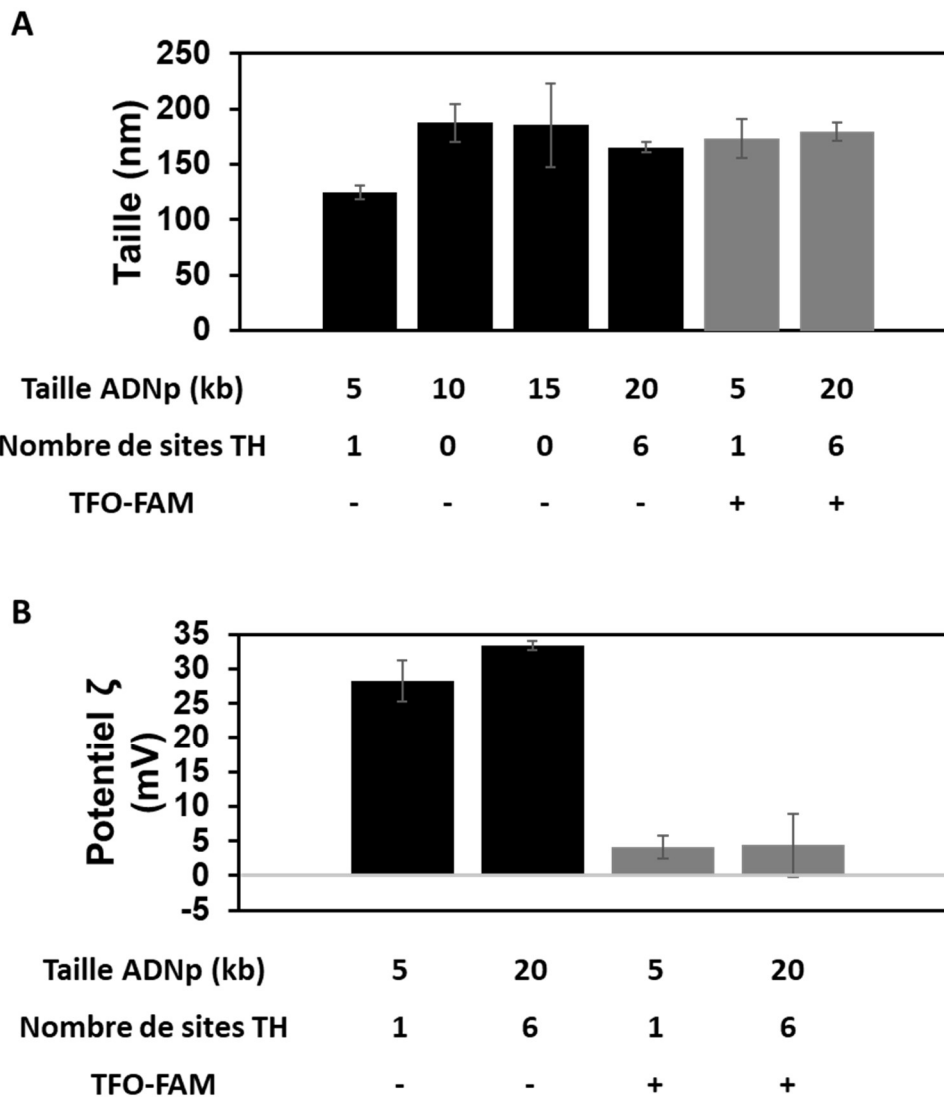


Figure 52 : Caractérisation de la taille (A) et du potentiel zeta (B) des complexes formés entre la PTG1 et des plasmides de 5, 10, 15 et 20 kb en présence de triple hélice (gris) ou non (noir). Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées +/- SD (n=6).

5.3.1.2 Test de l'activité de la luciférase *in cellulo*

L'efficacité de transfection des différentes constructions ADNp-TH-peptide ont été testées sur la lignée cellulaire HeLa qui a servi à la réalisation de la preuve de concept (Pigeon *et al.*, 2013). Pour cela, une quantité variable de plasmide phCEF1-CFTR-6TH ou pGenegrip (0,5 µg, 0,25 µg et 0,125 µg d'ADNp/puits) a été incubée en présence de 5 µM de TFO-peptide pendant une nuit, à 4°C. La concentration de TFO-peptide choisie,

soit 5 μ M, permet de réaliser la triple hélice dans des conditions saturant les sites TH et donc favoriser la formation du nombre maximal de triples hélices par molécules de plasmides. Ensuite, les plasmides-TFO-peptides sont complexés au PTG1, selon un ratio 1:6 avant d'être déposés sur les cellules (figure 53).

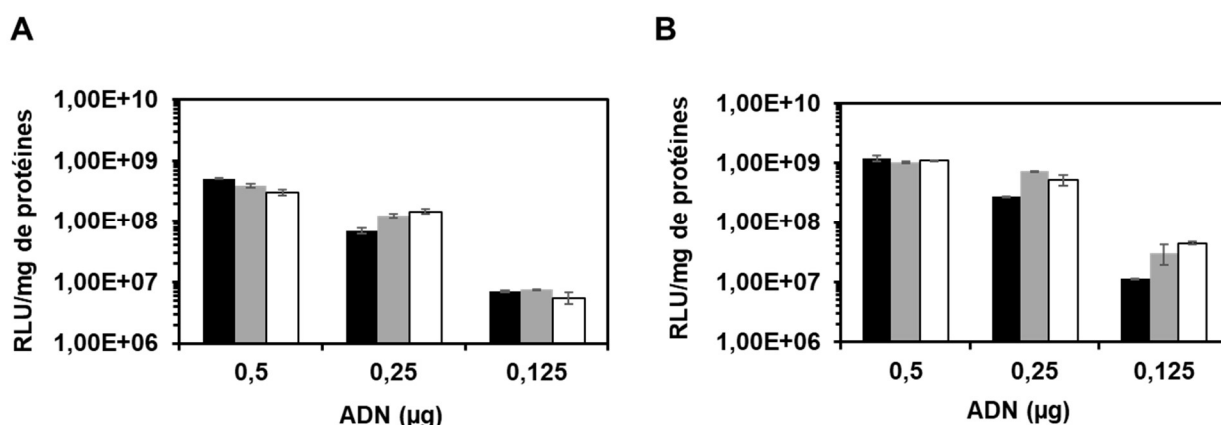


Figure 53 : Efficacité de transfection en fonction de la quantité en ADN. Les plasmides (A) phCEF1-CFTR-6TH ou (B) pGenegrip seul (gris), ou en présence de TFO-P4 (bleu) ou de TFO-P1 (orange) ont été transfectés dans les cellules HeLa, après complexation avec PTG1 au PTG1 à un ratio 1:6. Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées +/- SD (n=6).

Logiquement, l'activité de la luciférase diminue lorsque la concentration en plasmide diminue. Cependant, le peptide P4 n'améliore pas l'efficacité de transfection des ADNp contenant un ou six sites TH.

L'efficacité de transfection des ADNp pourrait être influencée par le peptide ou l'oligonucléotide impliqué dans cette nouvelle stratégie de liaison. Afin d'expliquer les résultats obtenus et d'améliorer l'impact du peptide P4 sur l'efficacité de transfection des ADNp contenant un ou six sites TH, nous avons commencé par contrôler les interactions entre le peptide P4 et les protéines cytosoliques soit par des expériences en microscopie

confocale en utilisant des extraits de cytosol et des microtubules isolés, soit par des expériences de co-immunoprécipitation. En parallèle, nous avons étudié l'impact du nombre de triple hélice par ADNp car un nombre trop élevé de peptide P4 par plasmide pourrait entraîner une multiplicité des interactions avec les partenaires cytosoliques et défavoriser le transport intracellulaire en créant un phénomène de rétention. Nous avons également exploré des pistes concernant l'accessibilité du peptide P4 après la complexation des ADNp-TH-peptide avec un polymère cationique en jouant sur la taille des oligonucléotides, les étapes d'assemblages et la nature du vecteur synthétiques.

5.3.2 Vérification de la fonctionnalité du peptide

5.3.2.1 Interaction des ADNp-P4 avec les microtubules isolés

Des études de microscopie confocale ont été menées dans le but de vérifier la fonctionnalité du peptide P4 seul ou associé à un plasmide ADN par une triple hélice. Pour cela, les échantillons sont composés :

- des extraits cytosoliques frais préparés extemporanément à partir d'un T75 contenant des cellules HeLa confluentes pour obtenir les protéines cytosoliques nécessaires à l'interaction (FIP1 et le complexe de la dynéine),
- des microtubules isolés polymérisés à l'aide du kit Cytoskeleton (Cytoskeleton, Inc., Denver, USA)
- des échantillons de peptide à tester : P4-Qdots ou ADNp-biotine-streptavidine-biotine-P4

Pour éviter la dépolymérisation des microtubules, tous les éléments sont conservés à 37°C sur un bloc chauffant. Afin de réaliser les observations et les acquisitions des interactions entre le peptide et les microtubules, la proportion de chaque élément du mélange a été mise au point. En effet, les microtubules étant des structures très dynamiques et sensibles aux proportions de tampon G-PEM, qui permet de stabiliser les MT grâce à la présence de taxol, mais également à la proportion de cytosol et d'échantillons P4 à ajouter au mélange de microtubules.

Les conditions permettant le maintien de la stabilité des microtubules et l'observation d'objets en quantités suffisantes sont 60% cytosol (complété avec de l'ATP à 100 mM, du cocktail inhibiteur de protéases dilué 100 fois, taxol à 20 μ M), 20% de microtubules polymérisés et 20% d'échantillon Qdots-P4 ou ADNp-P4.

Dans un premier temps, l'interaction entre le peptide P4-biotine associé à un Qdots-streptavidine 525 (vert) et les microtubules isolés (rouge) a été observée par microscopie confocale en présence d'extrait cytosolique (figure 54 A). On observe que le peptide P4 est à proximité des microtubules isolés. La même expérience a été menée avec le peptide P4 biotinylé associé au plasmide pspc5.12-Dys-6TH, marqué à la cyanine 5 (bleu), via un pont streptavidine-biotine. Les figures 54 B et C illustrent les interactions entre les ADNp-Cy5-biotine-streptavidine-P4 (bleu) et les microtubules isolés, dans deux échantillons indépendants. Ces résultats sont en faveur d'une interaction entre le plasmide-P4 et les microtubules isolés. Cependant, ces résultats ne permettent pas d'affirmer que le peptide P4 favorise une interaction systématique entre les ADNp et les

microtubules car il semblerait qu'en absence du peptide P4, quelques plasmides sont tout aussi proches des microtubules (figure 54 C). Il serait donc nécessaire d'approfondir la mise au point des conditions de polymérisation des microtubules et d'acquisition des images. En effet, les microtubules sont des structures dynamiques, difficiles à imager et les conditions utilisées pour réaliser les interactions entre le peptide P4 et les éléments cytosoliques ne sont peut-être pas les conditions idéales pour l'observation de ces évènements. De plus, le type de résultats obtenus au cours de cette thèse ne correspond pas aux précédentes observations publiées par Pigeon *et al.* en 2013. En comparaison à la figure 28 C, les conditions expérimentales ne semblent pas avoir été reproduites à l'identiques dans la figure 54 puisque la taille des microtubules diffère entre les expérimentations.

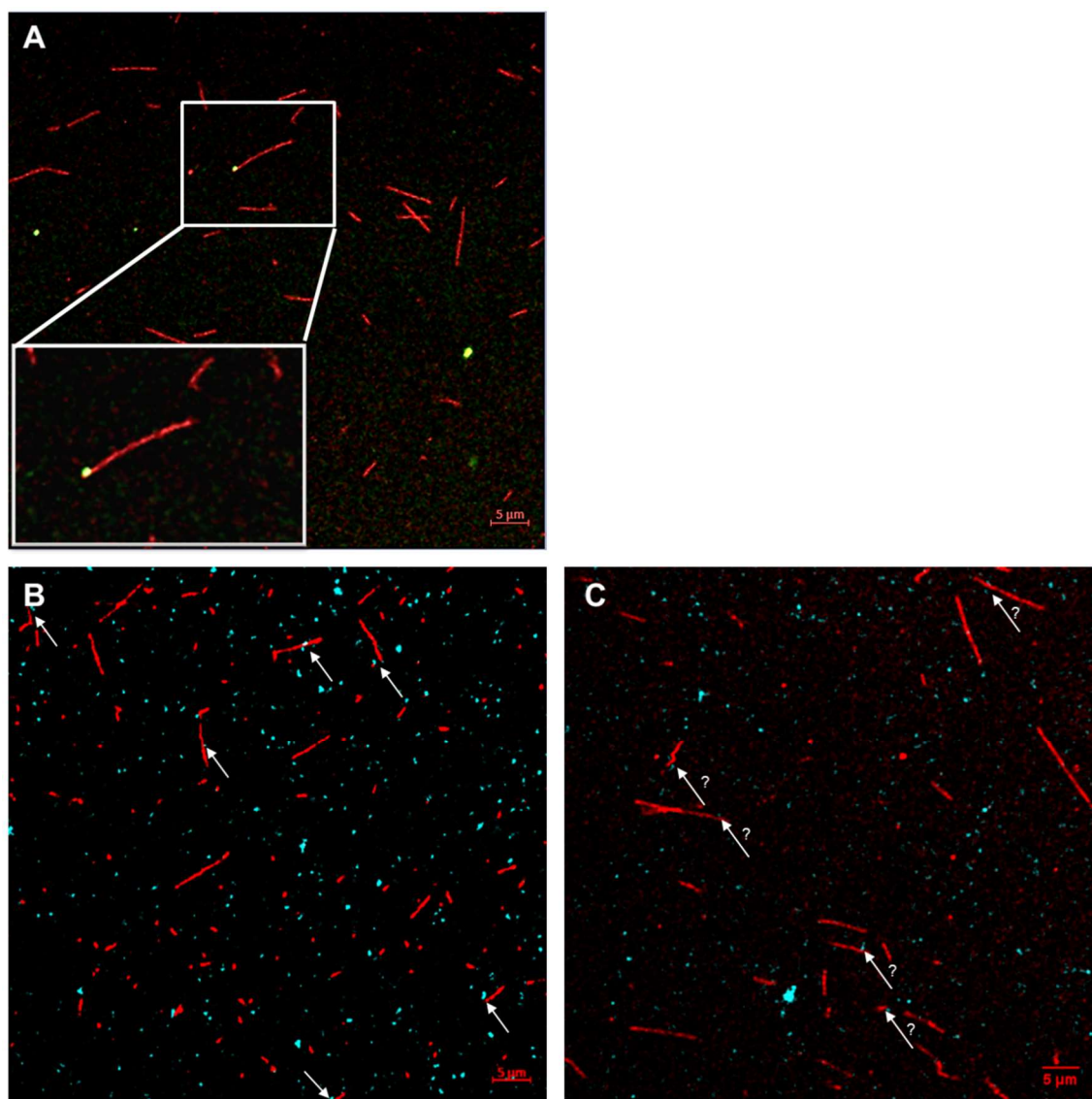


Figure 54 : Observation par microscopie confocale des interactions entre le peptide P4 et les microtubules. (A) Les microtubules isolés (Cytoskeleton, Inc.) marqués en rouge par la rhodamine. Les Qdots 525 ITK™-P4 (Q10141MP, Invitrogen, USA) sont représentés en vert. (B et C) Observation des interactions entre des (B) DysCy5biot-str-biot-P4 et (C) des plasmides Dys-Cy5 sans P4 et les microtubules isolés. Les microtubules isolés (Cytoskeleton, Inc.) sont marqués en rouge par la rhodamine. Les plasmides pspc5.12-Dys-biot-str-biot-P4 et pDys sont marqués par la cyanine 5 (Mirus Bio, USA) représentés en bleu. Acquisition réalisée avec le microscope confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging) équipé avec un objectif x63 à immersion dans l'huile. Les flèches blanches mettent en évidence les interactions observées entre les plasmides et les microtubules.

5.3.2.2 Co-Immunoprécipitation

Des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées entre le peptide P4 et la protéine de fusion FIP1-eGFP. Pour cela, des billes recouvertes d'anticorps anti-eGFP (SC-9996AC, Santa Cruz) ont été utilisés pour capturer la protéine FIP1-eGFP présente dans un extrait cytosolique préparé à partir d'une lignée cellulaire HeLa génétiquement modifiées pour surexprimer la protéine FIP1-eGFP. Après des étapes d'incubation, de centrifugation et de lavages, la capture de la protéine FIP1-eGFP par les anticorps anti-eGFP permet d'isoler les molécules en interaction avec la protéine FIP1. Le complexe streptavidine-rhodamine/Biotine-P4 a été incubé une nuit à 4°C dans du cytosol enrichi en protéine FIP1-eGFP. Après l'immunoprécipitation, les complexes protéiques isolés sont analysés à l'aide d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide 14% en conditions dénaturantes. D'après les résultats, le peptide P4 est bien précipité en présence de FIP1-eGFP (figure 55). Les migrations de l'extrait de cytosol enrichi en FIP1-eGFP, de la streptavidine, du peptide P4 biotinylé et du complexe streptavidine-biotine-P4 témoignent de la taille de chaque protéine en absence d'anticorps anti-eGFP. La protéine FIP1-eGFP (flèche verte), les monomères de streptavidine (flèche blanche), les complexes streptavidine-biotine-P4 (flèche rouge) ont donc une masse moléculaire aux alentours de 70 kDa, 13 kDa, et 64 kDa, respectivement.

La même expérience a été réalisé avec des plasmides associés au peptide P4 par des liaisons streptavidine-biotine. L'amplification de la séquence de la luciférase à partir des échantillons immunoprécipités n'a pas révélée la présence de plasmide associé à la protéine FIP-1.

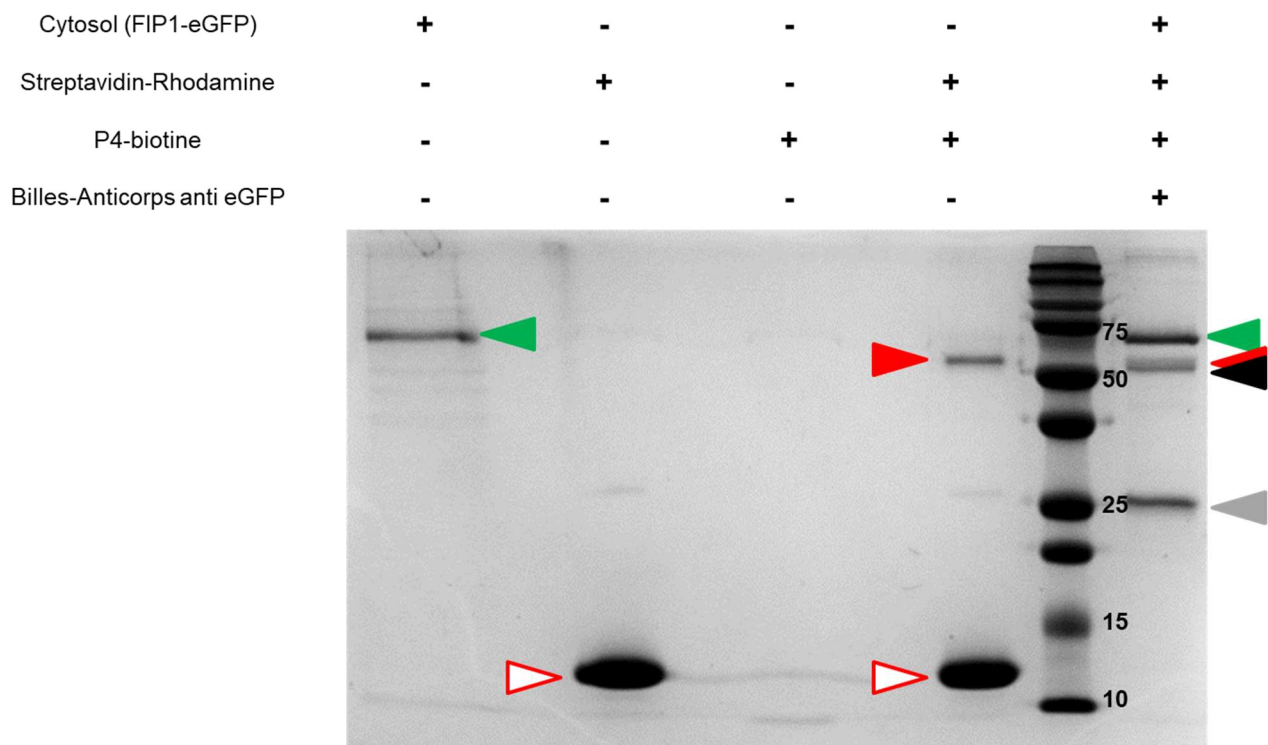


Figure 55 : Co-immunoprécipitation des complexes FIP1-eGFP/P4. Le complexe streptavidine-rhodamine/Biotine-P4 a été incubé une nuit à 4°C dans du cytosol enrichi en protéine FIP1-eGFP. Puis, l'immunoprécipitation a permis de révéler les interactions entre les protéines. Les flèches vertes désignent FIP1-eGFP, les flèches blanches encadrées en rouge indiquent les monomères de streptavidine-rhodamine, les flèches rouges désignent les complexes streptavidine-rhodamine/biotine-P4, la flèche noire désigne la chaîne lourde des anticorps anti-eGFP et la flèche grise désigne la chaîne légère des anticorps anti-eGFP. L'avant dernière piste correspond au marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, #1610374, Bio-Rad Laboratories).

5.3.3 Optimisation de la triple hélice

5.3.3.1 Quantité TH

En parallèle des études précédentes concernant le peptide P4, l'impact du nombre de triple hélice par plasmide ADN a été évalué par des expériences de transfection. En effet, les premières transfections ont été réalisées en présence d'un excès de TFO-peptide fixé par molécules d'ADN. Or, nous émettons l'hypothèse qu'il existerait une quantité optimale de TFO-peptide par plasmide qui favoriserait l'efficacité de transfection.

Par conséquent, l'impact du nombre de peptide P4 associé à un plasmide ADN par une triple hélice sur l'efficacité de transfection est évaluée en mesurant l'expression de la luciférase, en comparaison aux transfections réalisées avec les plasmides associés au peptide P1 qui n'interagit pas avec les microtubules. L'activité de la luciférase est mesurée 24 ou 48 heures après la transfection par des complexes PTG1PTG1/ADNp-TFO-peptide dans les cellules HeLa. La figure 56 A montre que l'efficacité de transfection du plasmide hCEF1-CFTR-6TH n'est pas améliorée en présence de P4 par rapport aux plasmides associés au peptide P1, quel que soit la quantité de peptide associée aux plasmides. 48 h après la transfection, l'activité de la luciférase diminue car les plasmides sont transfectés de manière transitoire et tendent à être éliminés au fil des divisions cellulaires.

Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les cellules ont été transfectées avec des TFO-ss-P4. Le pont disulfure présent à l'extrémité 3' de l'oligonucléotide a été ajouté pour favoriser le relargage de l'ADNp dans la région périnucléaire et ainsi faciliter le passage de l'enveloppe nucléaire.

5.3.3.2 Accessibilité du peptide

Nous avons pour but de remplacer la liaison biotine-streptavidine permettant d'associer le peptide P4 aux plasmides ADN par une liaison séquence spécifique reposant sur la formation d'une triple hélice. Or, il existe une différence de masse moléculaire entre les premiers assemblages biotine-streptavidine-biotine-peptide préalablement utilisés (soit environ 55,8 kDa) et la nouvelle stratégie TFO-peptides (approximativement 7kDa). Ceci implique que l'encombrement stérique des deux types

de liaisons est différent et que ce paramètre impacterait la reconnaissance ou la disponibilité du peptide pour FIP-1 dans le cytosol lorsque l'ADNp est complexé à un polymère cationique. Par conséquent, les assemblages ont été réalisés différemment. Tout d'abord le TFO-DBCO est hybridé au plasmide, lequel est ensuite complexé à la PTG1 (figure 56 A). Dans un second temps, les polyplexes sont préalablement formés avec l'ADNp-TFO puis incubés en présence d'une quantité croissante de peptide azide (figure 56 B). Finalement, les cellules sont transfectées avec ces complexes. Les résultats de bioluminescence présentés dans la figure 56 indiquent que l'ordre d'assemblage ne semble pas avoir d'impact sur l'efficacité de transfection.

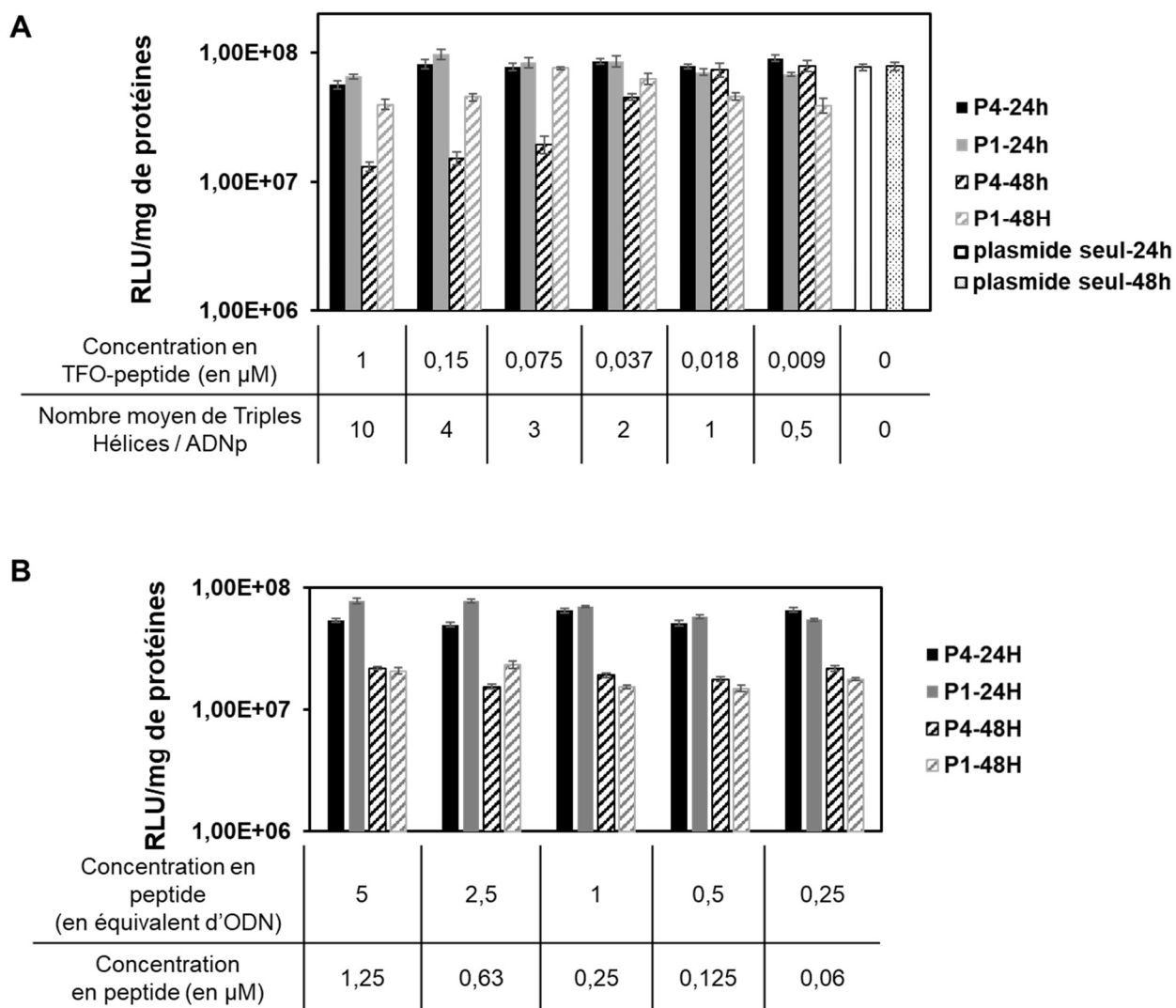


Figure 56 : Efficacité de transfection des plasmides phCEF1-CFTR-6TH en fonction de la quantité de peptides associés et complexés au polymère His/IPEI à 24 et 48 heures après la transfection de cellules HeLa. (A) Les TFO-DBCO sont conjugués au peptide P4-azide ou P1-azide puis hybridés avec le plasmide phCEF1-CFTR-6TH avant d'être complexés avec le polymère cationique PTG1. (B) Les TFO-DBCO sont hybridés avec les plasmides phCEF1-CFTR-6TH puis complexé au polymère cationique PTG1 puis les peptides sont conjugués en quantité variable. Les histogrammes noirs représentent les valeurs obtenues pour les phCEF1-CFTR-TFO-P4, les histogrammes gris représentent les résultats obtenus pour les phCEF1-CFTR-TFO-P1. Les histogrammes en couleur unie ou hachurés illustrent les résultats obtenus 24h ou 48h après la transfection, respectivement. Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées +/- SD (n=6).

Puisque l'ordre de complexation ne permet pas d'améliorer l'efficacité de transfection en présence du peptide P4, nous avons allongé la liaison entre le TFO-DBCO et le peptide par des molécules de polyéthylène glycol de différentes tailles (600, 1000, 2000 ou 5000 Da). Selon la taille du PEG, les peptides à l'extrémité d'un PEG deviendraient plus accessibles à FIP1 dans le cytosol (figure 57). Le TFO-PEG-peptide est obtenu après plus étapes de conjugaison. La première étape correspond à la conjugaison entre le TFO-DBCO et une molécule azide-PEG-azide. Cette réaction se réalise en milieux aqueux entre un groupement azide présent à l'une des extrémités du PEG et la fonction dibenzycyclooctyne, DBCO, présente à l'extrémité 5' du TFO. La seconde étape conjugue le TFO-PEG-azide au groupement DBCO présent à l'extrémité C-terminale du peptide.

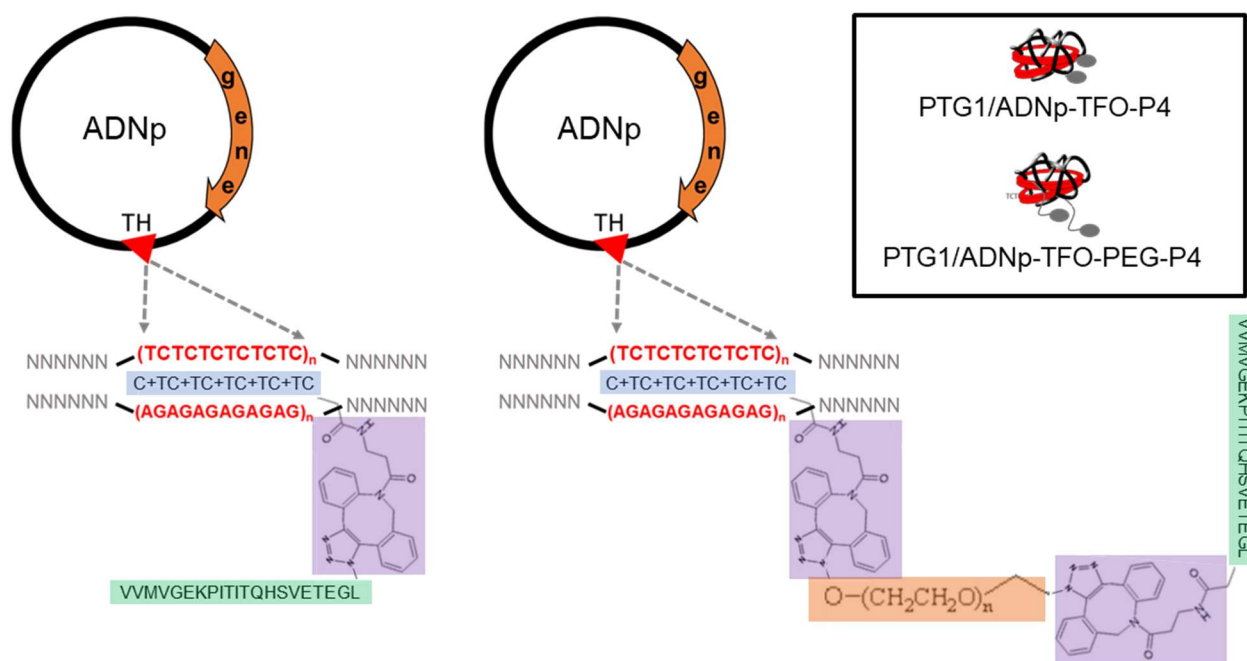


Figure 57 : Schéma du greffage d'un TFO-P4 et d'un TFO-PEG-P4 à un plasmide ADN. Le plasmide possède les séquences codantes pour le gène thérapeutique et de la luciférase et une séquence oligopurine•oligopyrimidine, appelée site TH, où le TFO forme la triple hélice. Bleu : TFO, violet : groupement DBCO, vert : peptide P4 et orange : PEG de 0,6/1/2 ou 5 kDa. Dans l'insert, représentation schématique des polyplexes formés à partir de PTG1 et des plasmides-TFO-P4 ou PTG1 complexé à des plasmides-TFO-PEG-P4.

Les mesures de bioluminescence indiquent une augmentation de l'efficacité de transfection en faveur du peptide P4 lorsqu'il est conjugué à un TFO allongé par une molécule de PEG. A une concentration de 1 μ M de TFO-PEG-peptide, P4 améliore l'efficacité de transfection x1,14, x1,23 et x2,7 lorsque le PEG a une masse de 0,6, 1 et 5 kDa, respectivement. A 0,037 μ M de TFO-PEG-peptide, P4 améliore l'efficacité de transfection x1,34, x1,24 et x1,3 lorsque le PEG a une masse de 0,6, 1 et 5 kDa, respectivement. A 0,019 μ M de TFO-PEG-peptide, P4 améliore l'efficacité de transfection x1,54 et x1,3 lorsque le PEG a une masse de 2 et 5 kDa, respectivement. Cependant, les écarts types calculés pour chaque condition soulignent la faible reproductibilité de l'expérience (figure 58).

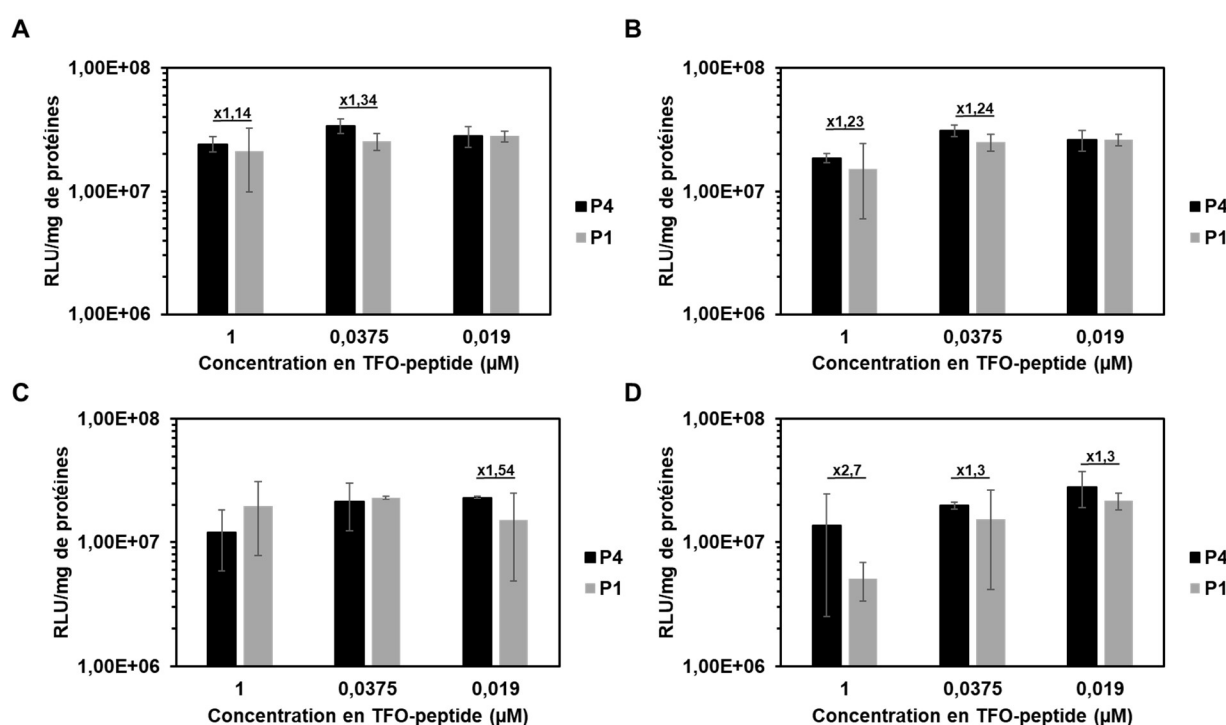


Figure 58 : Efficacité de transfection des plasmides phCEF1-CFTR-6TH en fonction de la quantité de TFO-PEG-peptides, 48 heures après la transfection. Les cellules HeLa ont été transfectées avec 0,5 μ g de plasmides phCEF1-CFTR-TFO-PEG-P4 (noir) et les phCEF1-CFTR-TFO-PEG-P1 (gris) par puits. Les peptides P4 azide ou P1-azide sont conjugués aux (A) TFO-PEG_600-DBCO, (B) TFO-PEG_1K-DBCO, (C) TFO-PEG_2K-DBCO ou (D) TFO-PEG_5K-DBCO. Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées +/- SD (n=6).

Dans l'optique de vérifier l'accessibilité du peptide pour ces cibles cytosoliques, nous avons greffé le peptide P4-N3 ou P1-N3 directement sur du polymère cationique PEI. Les résultats de bioluminescence, obtenus à la suite de cette transfection, n'indiquent pas de bénéfice en faveur du peptide P4 (Figure 59).

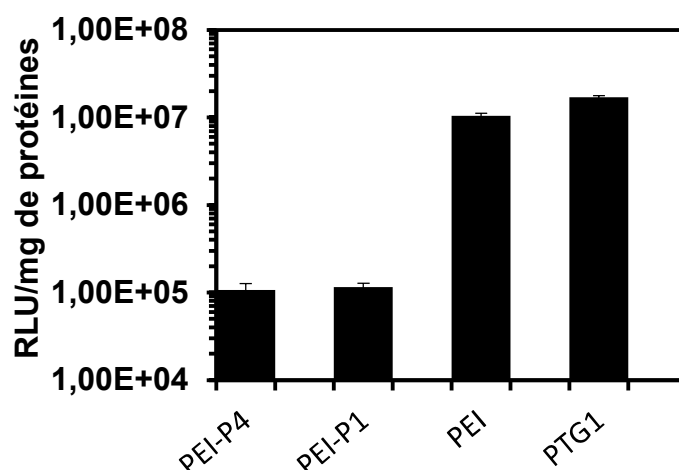


Figure 59 : Efficacité de transfection des plasmides phCEF1-CFTR-6TH complexés à la IPEI-P4, la IPEI-P1, la IPEI ou la PTG1. Les cellules HeLa ont été transfectées avec 0,5 µg de plasmides phCEF1-CFTR-6TH. Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées +/- SD (n=6).

5.3.3.3 Influence du vecteur

La nature du vecteur est un paramètre pouvant influencer l'efficacité de transfection. C'est pourquoi, les cellules HeLa ont été transfectées avec des ADNp-TFO-peptides complexés à des liposomes cationiques (lipofectamine 3000, Invitrogen). Après 48h de transfection, l'activité de la luciférase est mesurée à partir du lysat cellulaire. De la même façon que les résultats de transfection obtenus avec les polyplexes (ADNp-TFO-peptide/PTG1), le peptide P4 ne semble pas avoir un avantage sur le peptide P1 contrôle (figure 60). La nature du vecteur (liposomes cationiques ou polymères cationiques) ne semble pas changer les résultats de bioluminescence concernant la

transfection des ADNp-TFO-peptide. Cependant, nous observons que les plasmides possédant le plus faible nombre de TFO-P4 (0,019 μ M et 0,037 μ M soit une ou deux triples hélices) a une activité de luciférase plus élevée qu'avec le TFO-P1. Ces données pourraient suggérer qu'un nombre trop important de peptide P4 aurait un impact négatif sur l'efficacité de transfection. La multiplicité des peptides P4 sur l'ADN pourrait augmenter la rétention des plasmides sur les microtubules et donc avoir un effet contraire à celui attendu.

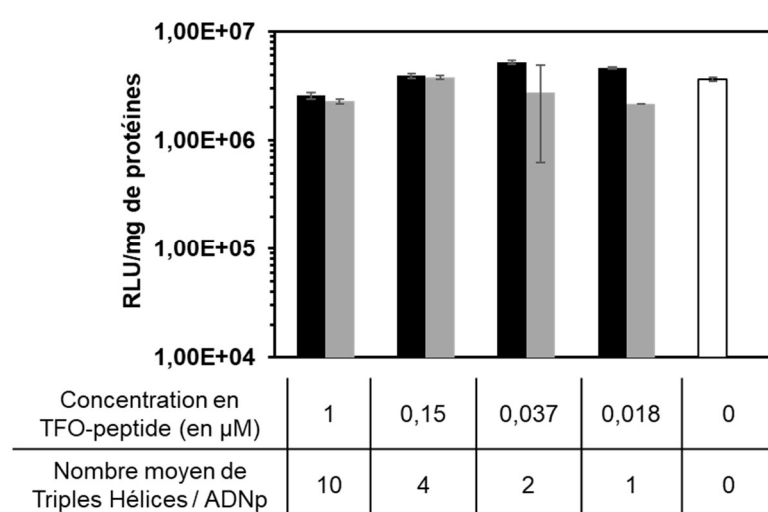


Figure 60: Efficacité de transfection des lipoplexes phCEF1-CFTR-TFO-peptide/lipofectamine 3000 en fonction de la concentration en TFO-peptide. Les cellules HeLa ont été transfectées avec 0,5 μ g de plasmides phCEF1-CFTR (blanc) ou phCEF1-CFTR-TFO-P4 (noir) ou phCEF1-CFTR-TFO-P1 (gris) par puits. Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées $\pm$ SD (n=4).

5.3.3.4 Stabilité de la triple hélice

Nous avons également testé la stabilité de la triple hélice puisque ni les variations dans le nombre de TFO-peptide par plasmide, ni les optimisations dans l'accessibilité du peptide, ni la nature du vecteur synthétique ne permet de mettre en évidence un bénéfice net en faveur du peptide P4. Nous émettons alors l'hypothèse que la triple hélice ne serait

pas stable lors de la condensation de l'ADNp avec le polymère cationique. La stabilité de la triple hélice a donc été vérifiée en fonction de la température, du temps et après précipitation à l'éthanol (précipitation, congélation/décongélation, centrifugation) (figure 61). D'après les résultats, la triple hélice est toujours formée après une heure d'incubation à des températures comprises entre 25 et 50°C, après au moins 9 jours d'incubation à 4°C et après avoir été purifiée par précipitation dans l'éthanol.

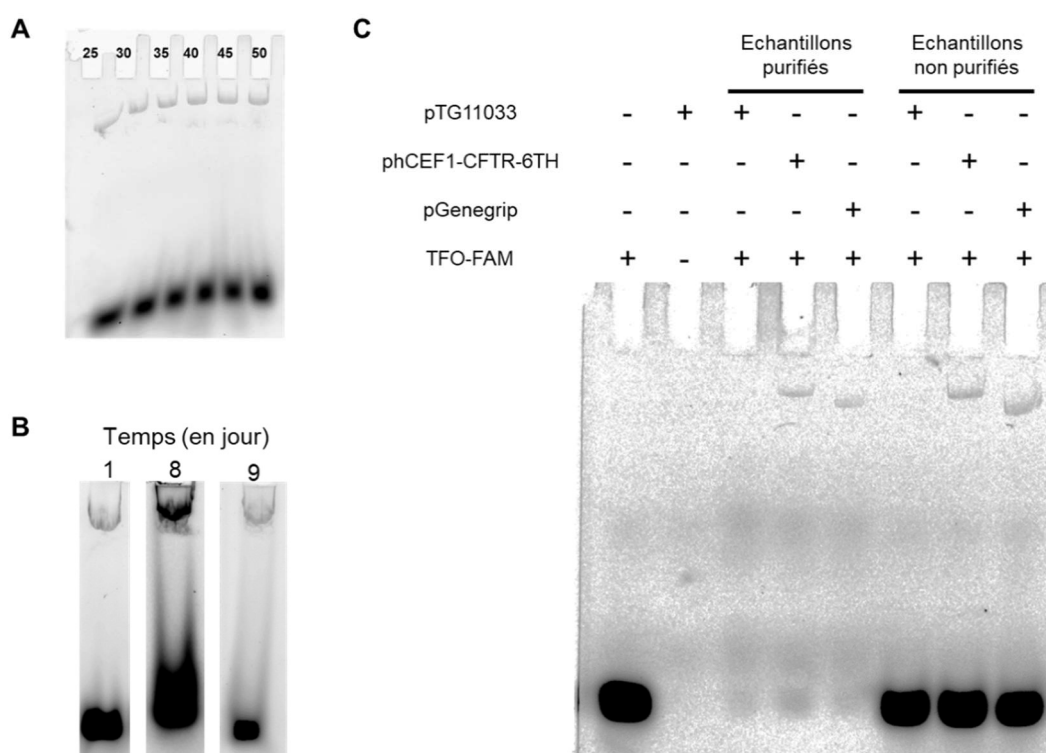


Figure 61 : Etude qualitative de la stabilité de la triple hélice (A) en fonction de la température (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C et 50°C), (B) après une conservation à 4°C jusqu'à 8 jours et (D) après une précipitation à l'éthanol 100%/NaCl 5M. 1 : 1E-11 moles de TFO-FAM, 2 : 1 µg pTG11033, 3 : pTG11033-6TH purifié, 4 : hCEF1-CFTRwo3NF-6TH purifié, 5 : pGenegrip purifié, 6 : pTG11033-6TH non purifié, 7 : hCEF1-CFTRwo3NF-6TH non purifié, 8 : pGenegrip non purifié. Les acquisitions ont été réalisées à l'aide du scanner Typhoon 9500 et du logiciel ImageJ.

Nous avons également testé la résistance de la triple hélice face à la condensation et à la décondensation des complexes formés avec la IPEI. La décomplexation des polyplexes PEI/ADNp-TFO-FAM a été réalisée en présence de sulfate de dextran de haut

poids moléculaire (8000 kDa) (figure 62). Le sulfate de dextran est un polyanion qui rentre en compétition avec l'ADNp dans le polyplexe. Généralement, la stabilité des polyplexes est évaluée de manière relative en comparant les concentrations en sulfate de dextran à partir desquelles l'ADNp commence à être dissocié des polyplexes. Plus les interactions entre l'ADNp et le polymère est stable, plus la concentration en sulfate de dextran sera élevée (Yamashita *et al.*, 2008). Ici, l'ADNp-TFO-FAM est complexé à la IPEI à un ratio 1:2 pendant 30 minutes puis le sulfate de dextran est ajouté en concentration croissante afin d'évaluer l'impact de la dissociation du complexe sur la stabilité de la triple hélice. Après l'électrophorèse sur un gel d'agarose, il apparaît que l'ADNp-TH-FAM est dissocié du polyplexe à partir de 5 μ M de sulfate de dextran et que la triple hélice a résisté à la complexation ainsi qu'à la décomplexation. Par conséquent, la triple hélice n'est pas déstabilisée ni par la condensation, ni par la dissociation de l'ADN avec la IPEI.

Cependant, nous observons qu'en absence de sulfate de dextran, aucun TFO libre n'est observé. Cela signifie que les TFO libres, en excès lors de la formation de la triple hélice, sont également complexés avec la IPEI tout comme ceux hybridés au plasmide.

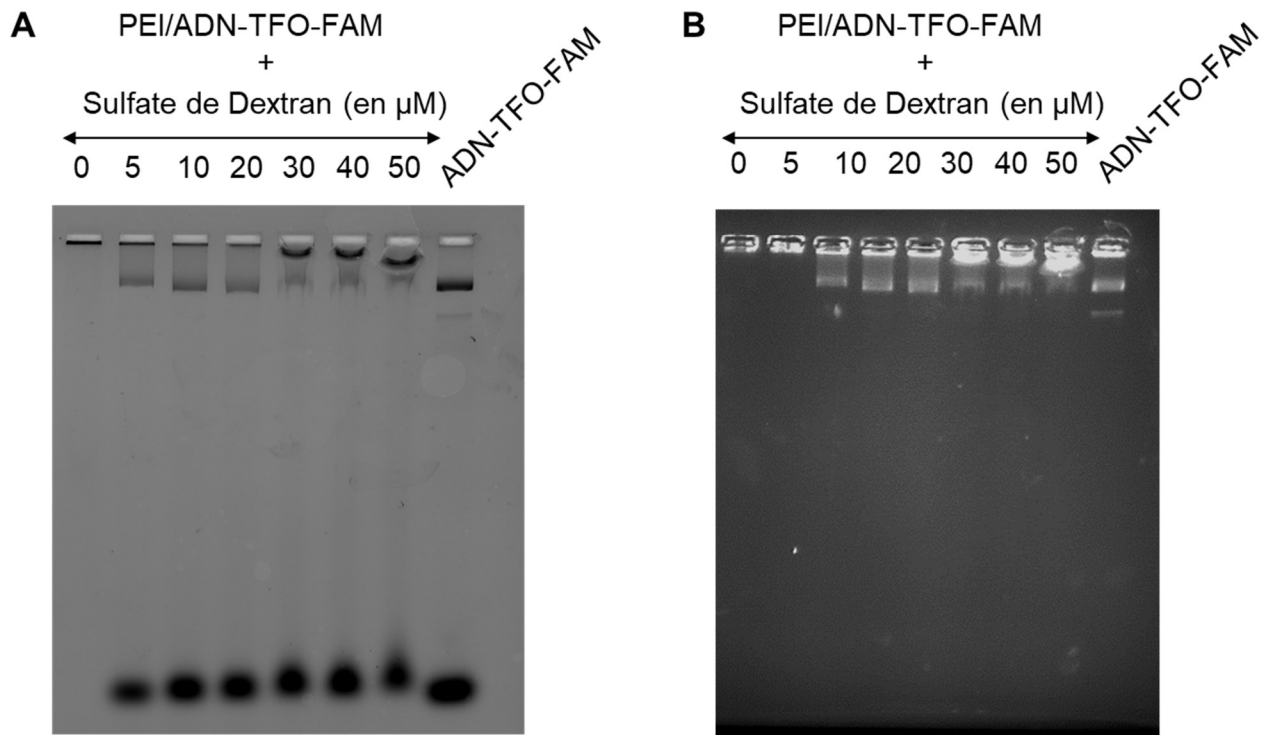


Figure 62: Stabilité de la triple hélice après la complexation et la décomplexation avec la IPEI. 10 μg de plasmide (1 μg/puits) a été condensés à un ratio 1 :6 avec la IPEI pendant 30 minutes puis incubés en présence d'une quantité croissante en sulfate de dextran 8000 kDa. (A) Révélation de la fluorescence des TFO-FAM avec le scanner Typhoon 9500. (B) Révélation des plasmides ADN aux UV après un bain de SyBR Green.

Or, une fois dans les cellules, les TFO-P4 libres pourraient entrer en compétition avec les TFO-P4 liés au ADNp pour interagir avec les protéines FIP1 et donc avec les microtubules. Ceci pourrait expliquer l'absence d'effet P4 sur la transfection. En effet, d'après les travaux de Branden *et al.* publiés en 1999, la purification des TFO-peptides libres permettrait d'améliorer l'efficacité de transfection d'un facteur 1,33 en comparaison au plasmide possédant des triples hélices non purifiées (Branden *et al.*, 1999).

5.3.3.5 Purification des oligonucléotides libres

Afin de s'acquitter des TFO-peptides libres présents dans le mélange réactionnel et éliminer toutes compétitions entre les TFO-peptides libres et les ADNp-TFO-peptide, différentes méthodes de purification ont été comparées (tableau 22). Bien qu'aucune des techniques n'a permis de séparer totalement les oligonucléotides libres des ADNp-TFO-peptides, des tests de bioluminescence ont été réalisés après avoir éliminé les TFO-peptides libres selon les meilleures méthodes de purification (*i.e* la méthode de précipitation à l'éthanol et la dialyse) (figure 63 **Figure 63 A**). Or, d'après les résultats obtenus en bioluminescence, la purification des TFO-peptide libres par la méthode de précipitation à l'éthanol ou par dialyse n'augmente pas le gain de transfection entre les plasmides associés au peptide P4 et ceux associés au peptide P1 (figure 63 **B**).

Tableau 22 : Purification des triples helices entre les FAM-TFO et les ADNp sans site TH (pTG11033) et ADNp avec 6 sites TH (ADNp-6TH). Le mélange est incubé pendant une nuit avec 1,5 µg d'ADNp et 1 µM de TFO-FAM. La purification des TFO-FAM libre est mesurée à l'aide d'une électrophorèse en gel d'agarose et visualisée à 488 nm avec le scanner Typhoon 9500. Ensuite, le gel d'agarose est incubé en présence de Sybr Green pour la visualisation de l'ADN. Les intensités de fluorescence des TFO-FAM libres et les quantités d'ADN sont évaluées avec le logiciel ImageJ.

Méthodes de purification	ADNp	Fluorescence des TFO-FAM liés (%)	Fluorescence des TFO-FAM libres (%)	Quantité TFO purifiée (%)	ADN (%)	Triple hélice
Précipitation éthanol 100%/NaCl 5M	ADNp-6TH	76,2	23,83	50	/	+
1ère précipitation éthanol 100%/NaCl 5M	ADNp-6TH	69,95	30,05	42,52	/	+
2e précipitation éthanol 100%/NaCl 5M	ADNp-6TH	82,78	11,22	66,47	/	+
3e précipitation éthanol 100%/NaCl 5M	ADNp-6TH	75,35	24,65	52,05	/	+
Précipitation éthanol 100%/Acétate de sodium 3M	ADNp-6TH	83,83	16,17	83	/	+
Colonne sephadex G50 (Mirus column)	ADNp-6TH	57,22	42,78	55,09	/	+/-
Précipitation éthanol 100%/NaCl 5M	ADNp-6TH	84,21	15,79	83,42	/	+
Colonne kit PCR clean up (Macherey Nagel)	pTG11033	/	21,4	78,6	/	/
Colonne kit PCR clean up (Macherey Nagel)	ADNp-6TH	0	44	56	/	+
Dialyse membrane de cellulose 12.4 kDa	pTG11033	/	~25	~75	/	/
Dialyse membrane de cellulose 12.4 kDa	pTG11033	/	~31	~68	/	/
pur-A-lyzer 12 kDa (6h)	pTG11033	/	27,22	72,78	47,65	/
pur-A-lyzer 12 kDa (22h)	pTG11033	/	33,67	66,33	44,54	/
pur-A-lyzer 12 kDa (30h)	pTG11033	/	12,94	87,06	68,23	/
pur-A-lyzer 25 kDa (6h)	pTG11033	/	39,61	60,39	93,3	/
pur-A-lyzer 25 kDa (22h)	pTG11033	/	25,81	74,19	95,92	/
pur-A-lyzer 25 kDa (30h)	pTG11033	/	16,42	83,58	84,53	/
PEG 8000/MgCl ₂ (Qiagen)	pTG11033	/	31,6	68,4	/	/
PEG 8000/MgCl ₂ (Qiagen)	ADNp-6TH	66	34	38,5	/	/

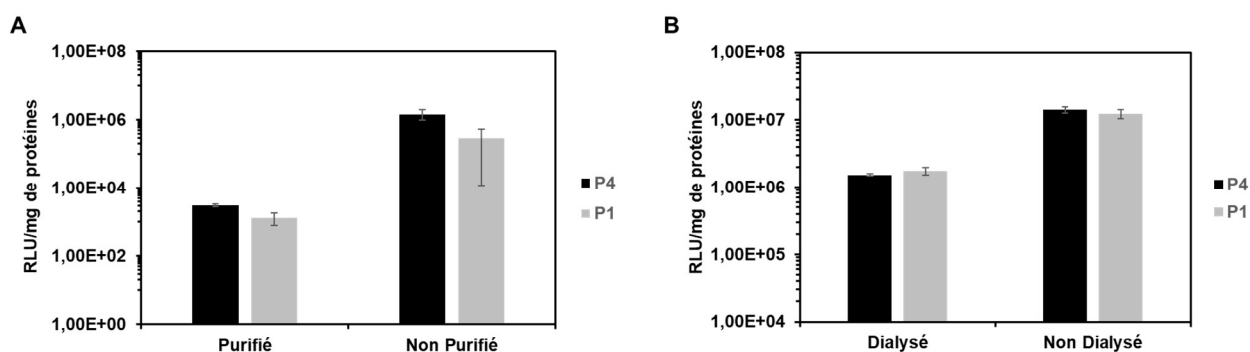


Figure 63 : Efficacité de transfection des phCEF1-CFTR-TFO-peptides après purification l'éthanol (A) ou par dialyse (B). Les valeurs de bioluminescence ont été mesurées 48h après transfection des cellules HeLa avec les phCEF1-CFTR-TFO-P4 (noir) ou phCEF1-CFTR-TFO-P1 (gris) complexés à la PTG1 à un ratio 1:6.

5.3.3.6 Equilibre et déplacements des triples hélices

La difficulté de séparer totalement les oligonucléotides libres de ceux associés aux plasmides par une triple hélice suppose l'existence d'un état d'équilibre entre les différents éléments moléculaires : les molécules de plasmides ADN et les TFO-peptide ($\text{ADNp} + \text{TFO} \rightleftharpoons \text{ADN-TFO}$). Afin de déterminer, l'existence d'un état d'équilibre et/ou la stabilité de la triple hélice, les plasmides ADN-6TH sont incubés en présence de TFO-FAM durant une nuit. Une fois la triple hélice formée, une quantité croissante de TFO-DBCO est ajoutée au mélange. Après une nuit supplémentaire d'incubation, le nombre de TFO-FAM par molécule de plasmide est évalué après une migration sur gel d'agarose. Comme le montre la figure 64 C, l'intensité de fluorescence des TFO-FAM hybridés aux plasmides reste constante bien que la quantité de TFO-DBCO compétiteurs augmente. Cela signifie que les triples hélices formées par les TFO-FAM ne sont pas remplacés par les TFO-DBCO.

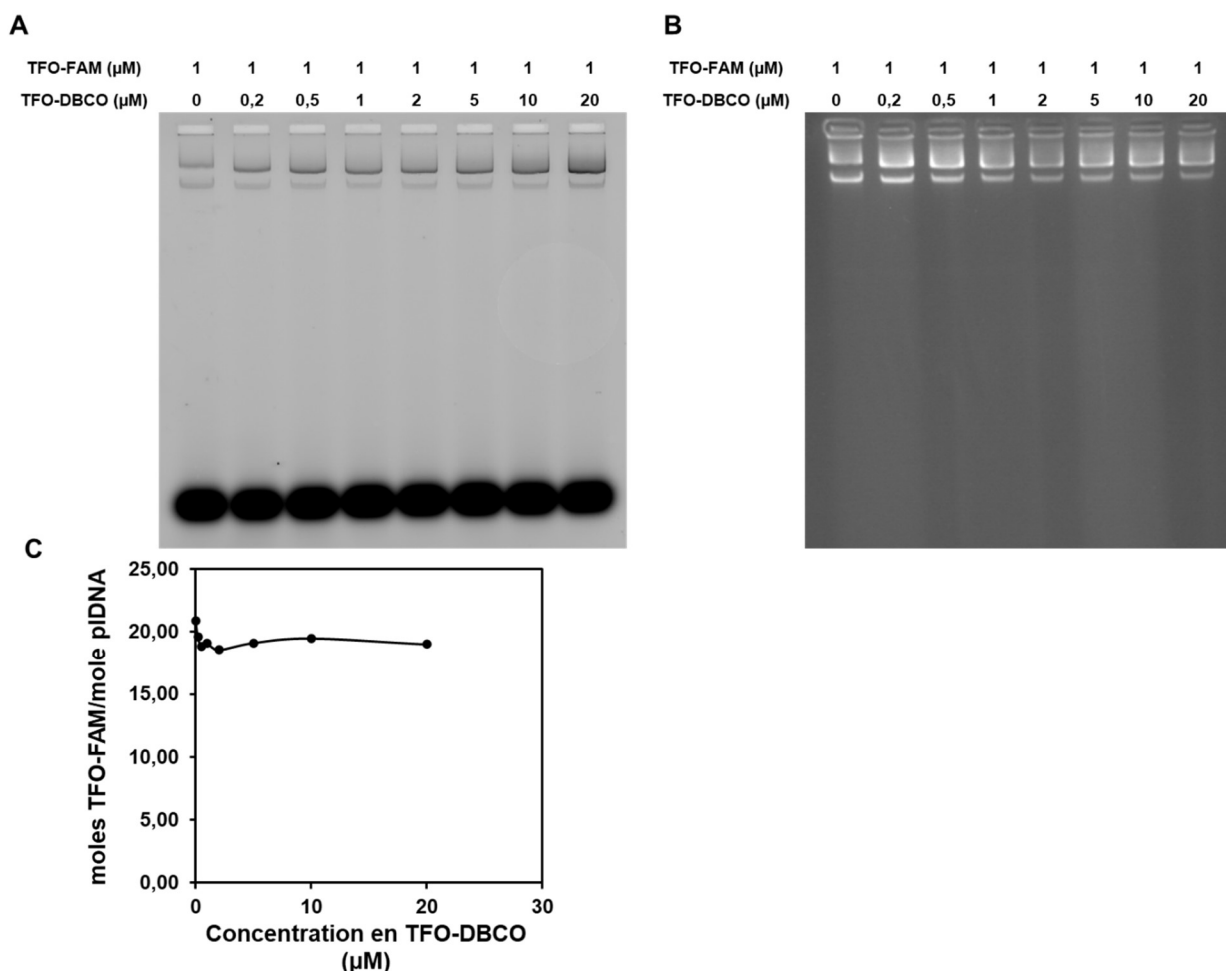


Figure 64: Test de stabilité de déplacement entre les TFO-FAM et les TFO-DBCO. 1 μM de TFO-FAM ont été incubés en présence de phCEF1-CFTR-6TH pendant une nuit à 4°C. Puis, une quantité croissante en TFO-DBCO a été ajoutée au mélange (0,2/0,5/1/2/5/10/20 μM). Après une nuit d'incubation à 4°C, les échantillons sont analysés à la suite d'une électrophorèse sur un gel contenant 2% d'agarose. (A) Révélation de la fluorescence des TFO-FAM à l'aide du scanner Typhoon 9500. (B) Révélation aux UVs des phCEF1-CFTR-6TH. (C) Courbe représentant le nombre de moles de TFO-FAM fixées par plasmides en fonction de la concentration en TFO-DBCO. Les intensités de fluorescence ont été mesurées à l'aide du logiciel ImageJ.

5.3.3.7 Formation de triples hélices avec des oligonucléotides non BNA

Le choix initial concernant l'utilisation de TFO-DBCO composés de BNA reposait sur leurs caractéristiques de résistance, de stabilité et de stabilité. Cependant, face à la difficulté de purifier totalement les TFO-peptide libres et au fait que les TFO libres se complexent aux polymères cationiques, nous avons examiné la formation des triples hélices à partir d'autres types d'oligonucléotides. Nous avons comparé la capacité à former des triples hélices avec des TFO de type phosphodiester dans un tampon légèrement acide (pH 5,8). Des TFO de type phosphorothioate (PS) et de type morpholino (PMO) ont été aussi utilisés (figure 65). Le TFO-PMO offre l'avantage de ne pas posséder de charges négatives et donc de ne pas être complexé avec un polymère cationique.

La capacité à former des triples hélices avec différents types de TFO a donc été testée dans les mêmes conditions de formation que celles utilisées pour les TFO-BNA. L'analyse par électrophorèse sur gel d'agarose indique que dans ces conditions, les TFO-phosphodiester et les TFO-phosphorothioates ne s'hybrident pas aux plasmides contenant des séquences oligopurine•oligopyrimidine contrairement aux TFO-BNA et aux TFO-PMO (figure 65). Par conséquent, nous avons transfecté des cellules HeLa avec des plasmides ADN associés à un peptide par un TFO-PMO ou un TFO-BNA. D'après les résultats de bioluminescence, l'efficacité de transfection est légèrement améliorée lorsque le peptide P4 est associé en petite quantité (0,019 μ M et 0,037 μ M soit 1 à 2 TFO-peptides/plasmide) à un plasmide ADN d'environ 20 kb possédant six sites TH.

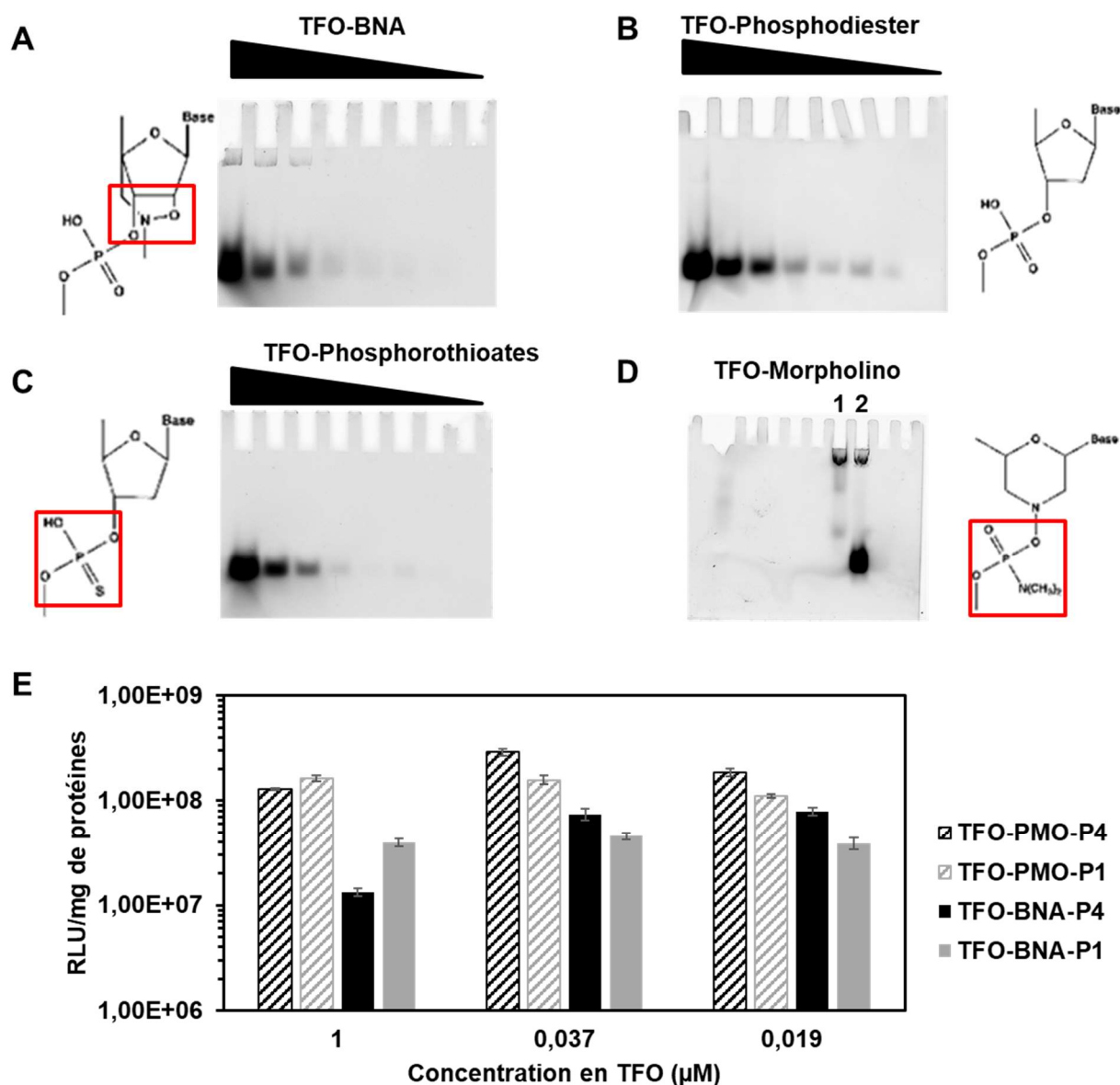


Figure 65 : Test de formation des triples hélices avec différents types d'oligonucléotides. (A-D) Révélation de la migration des TFO-FAM comportant des BNA (A), de liaisons phosphodiesters (B), des liaisons phosphorothioates (C) ou des phosphoroamidates-morpholino (D). Les plasmides phCEF1-CFTR-6TH ont été incubés une nuit à 4°C en présence de 0 μM , 0,009 μM , 0,019 μM , 0,037 μM , 0,075 μM , 0,15 μM , 0,3 μM ou 1 μM de TFO-BNA, TFO-phosphodiester ou TFO-phosphorothioates (D) 1 μM de TFO-PMO (1) ou 1 μM de TFO-BNA (2) ont été incubés en présence de phCEF1-CFTR-6TH. (E) Mesures de bioluminescence des plasmides phCEF1-CFTR-TFO(PMO)-P4 (noir hachuré), phCEF1-CFTR-TFO(PMO)-P1 (gris hachuré), phCEF1-CFTR-TFO(BNA)-P4 (noir) et phCEF1-CFTR-TFO(BNA)-P1 transfectés dans les cellules HeLa. Les rectangles rouges indiquent les modifications chimiques des nucléotides par rapport aux nucléotides natifs.

5.3.4 Efficacité de transfection des plasmides nus associés au peptide P4

5.3.4.1 Electroporation

Les transfections réalisées en utilisant des complexes ADN/polymère cationique n'ayant pu mettre en évidence un gain certain quant à la fixation du peptide P4 sur le plasmide, nous avons émis l'hypothèse le passage de la membrane plasmique, l'échappement endosomal et la dissociation des complexes ADN/polymère cationique dans les cellules n'étaient pas efficace. Aussi nous avons utilisé la méthode de l'électroporation pour transférer l'ADN nu dans les cellules. Cette méthode permet de perméabiliser la membrane plasmique des cellules grâce à un choc électrique permettant l'introduction de l'ADN dans les cellules. D'après les résultats obtenus en bioluminescence, le peptide P4 ne semble pas favoriser l'efficacité de transfection des ADNp par rapport au peptide P1 (figure 66). Cependant, certains auteurs ont décrit que lors de l'électroporation le réseau de microtubules est déstabilisé durant un certain temps selon la lignée cellulaire et les paramètres propres aux pulses électriques ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus (Kanthou *et al.*, 2006; Graybill et Davalos, 2020).

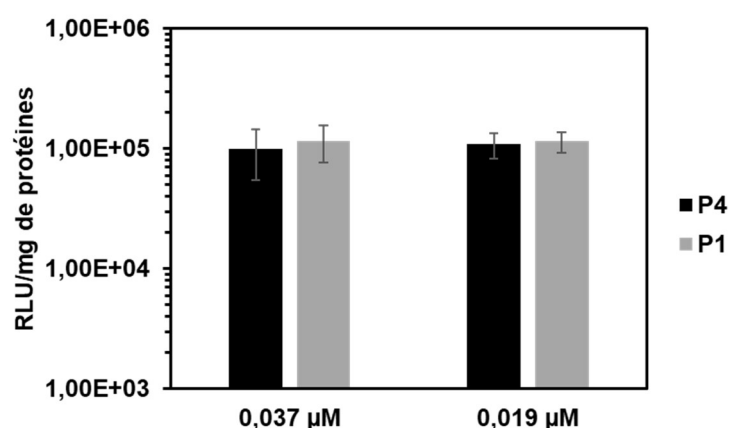


Figure 66 : Mesures de bioluminescence 48h après électroporation en fonction de la concentration en TFO-peptides. Les cellules HeLa ont été électroporées avec 1 µg de plasmides phCEF1-CFTR-TFO-P4 (noir) et les phCEF1-CFTR-TFO-P1 (gris). Les résultats correspondent aux moyennes des valeurs mesurées +/- SD (n=3).

Les conditions de formation et la stabilité des triples hélices entre des plasmides ADN possédant une ou six séquences oligopurine•oligopyrimidine et des TFO formés de BNA ont été déterminées. Tous les TFO-DBCO sont conjugués à un peptide-azide quand le ratio molaire est de 1 :5 (1 TFO pour 5 peptides). Les plasmides ADN possédant une séquence TH peuvent former jusqu'à 6 triples hélices sur les six sites disponibles tandis que les plasmides possédant six séquences TH peuvent en former 19-18 triples hélices sur 36 sites disponibles, après un minimum de 4H d'incubation à 4°C.

D'après les résultats de bioluminescence obtenus précédemment, l'ajout d'une grande quantité de TFO-P4 ne permettrait pas d'améliorer l'efficacité de transfection de 0,125 µg à 0,5 µg d'ADNp. Après la vérification des interactions entre le peptide P4 et la protéine FIP-1 par des observations en microscopie confocale et par des expériences de co-immunoprécipitation, nous avons trouvé grâce aux différentes transfections que de faibles quantités de TFO-P4 sont suffisantes pour observer une amélioration de l'efficacité de transfection de gros plasmides (environ 18 kpb) quel que soit le type de TFO ou de vecteur employé.

Ces travaux ont mis en évidence que l'hybridation du TFO aux séquences oligopurine•oligopyrimidine est stable dans le temps, à différentes températures et après dissociation des complexes. Cependant, la robustesse de la triple hélice peut être un inconvénient dans le cas où le peptide P4 ne se dissocierait pas de la protéine cytosolique FIP-1. Ainsi, l'ADNp-TFO-peptide serait « piégé » et une fois arrivé à proximité du noyau repartirait plus loin sans permettre la libération de l'ADN dans la région périnucléaire.

Nous avons vu que des TFO-P4 libres sont toujours présents après purification. Or, ces TFO libres sont aussi complexés aux polymères cationiques et aux liposomes cationiques au même titre que les ADNp-TH-peptides. L'impossibilité de purifier totalement ces TFO-P4 libres suggère l'existence d'un phénomène d'équilibre avec ceux fixés sur l'ADN, pour la protéine FIP1. Ce qui atténuerait les bénéfices dus au peptide P4 *in vitro*.

L'impact du peptide P4 sur l'efficacité de transfection pourrait également être atténué par un manque d'accessibilité du peptide lorsque les plasmides sont complexés à un vecteur synthétique (polymères ou liposomes cationiques) ou même lorsqu'ils sont fixés sur un ADN nu. Ainsi ce mode de fixation d'un peptide sur un ADNp pourrait faire que le peptide ne soit pas aussi bien accessible que dans le cas de sa fixation via la streptavidine. En effet, les expériences d'électroporation n'ont pas permis de déterminer si la présence du vecteur cationique impacte l'efficacité de transfection des plasmides-TFO-P4 car aucune amélioration en présence de P4 n'a été observée. Cependant, les conditions employées pour réaliser l'électroporation seraient susceptibles d'entraîner la dépolymérisation des microtubules. D'après certains auteurs, selon le type cellulaire, le temps et l'intensité du choc électrique, le cytosquelette est plus ou moins déstabilisé pendant plus ou moins longtemps (Kanthou *et al.*, 2006; Rosazza *et al.*, 2016). Dans le cas où le réseau de microtubules serait dépolymérisé, le système TFO-P4 ne permet pas d'améliorer le transport intracellulaire des plasmides ADN.

5.3.5 Efficacité *in vivo*

L'utilisation d'ADN nu est envisageable dans le contexte de la thérapie génique non-virale pour la dystrophie musculaire de Duchenne. Compte tenu de la taille du gène de la dystrophine, celui-ci ne peut être transfecté dans les muscles squelettiques par des vecteurs viraux, comme les AAV ou les lentivirus. L'injection hydrodynamique par la veine saphène (HLV : *hydrodynamic limb vein*) est une méthode d'administration locorégionale spécifiquement dédiée aux muscles squelettiques. Ce mode d'administration consiste en une interruption transitoire du flux sanguin dans un membre, suivie par une rapide administration, via le système veineux, d'un large volume de solution contenant les constructions d'acides nucléiques. De cette manière, une augmentation transitoire de la pression hydrostatique dans la veine saphène améliore la dispersion de l'ADN nu dans les muscles. Ce phénomène contribuerait à augmenter l'expression du transgène dans les cellules (Le Guen *et al.*, 2020). Du fait que les muscles soient riches en vaisseaux sanguins et notamment en capillaires sanguins autour des fibres musculaires, l'administration d'agents thérapeutiques par le réseau sanguin permet un accès plus aisé en comparaison à une injection intramusculaire (Itaka *et al.*, 2010). Dans les années 1990, J. Wolff *et al.* pensent que cette procédure est une solution pertinente pour traiter la globalité de la musculature pour un membre donné grâce à une seule injection. Il a été rapporté que l'injection HLV est efficace chez les petits et les grands animaux et que cette méthode d'administration ne provoque pas d'effet secondaire (Hagstrom *et al.*, 2004; Wooddell *et al.*, 2011; Le Guiner *et al.*, 2014; Le Guen *et al.*, 2020). Elle se révèle donc attractive pour le traitement par thérapie génique de myopathies comme celle de Duchenne (Herweijer et Wolff, 2007).

D'après les résultats obtenus *in vitro*, la concentration la plus appropriée en TFO-peptide à associer aux plasmides ADN codant la dystrophine complète est de 0,25 μM . Bien qu'à cette concentration, peu de bénéfices en faveur du peptide P4 aient été observés avec les complexes ADN/polymère cationique, il s'agit de la concentration minimale en TFO-peptide à laquelle le nombre maximal de triples hélices formées sur des plasmides possédant six sites TH est quasiment atteint, tout en limitant la quantité de TFO-peptide libres (figure 67).

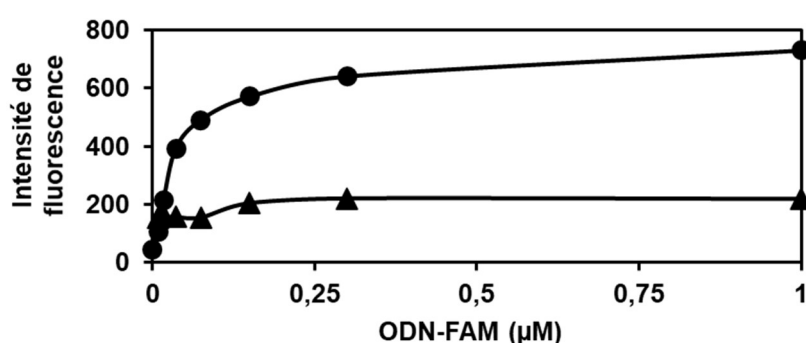


Figure 67: Choix de la concentration en TFO-peptide à greffer sur les pDys-6TH +/- 3NF. (A) Moyennes des mesures des intensités de fluorescence en fonction de la concentration en TFO-FAM après une nuit d'incubation à 4°C, en présence de plasmides possédant 1 site TH ($\blacktriangle$) ou 6 sites TH ($\bullet$).

Les expériences *in vivo* ont été réalisées par l'équipe du Dr Montier de l'UBO de Brest qui possède la maîtrise de l'injection hydrodynamique par la veine saphène. Les échantillons d'ADNp-TFO-ss-peptides ont été préparés au laboratoire avant d'être envoyés, puis injectés dans les membres postérieurs des souris Swiss. Ainsi, 50 μg de plasmides (pDys-6TH : 20,7 kb ou pDys-3NF-6TH : 22,2 kb) associés à 0,25 μM de TFO-ss-peptides P4 ou P1 ont été préparés et injectés de manière hydrodynamique dans les deux membres postérieurs de souris Swiss (figure 68).

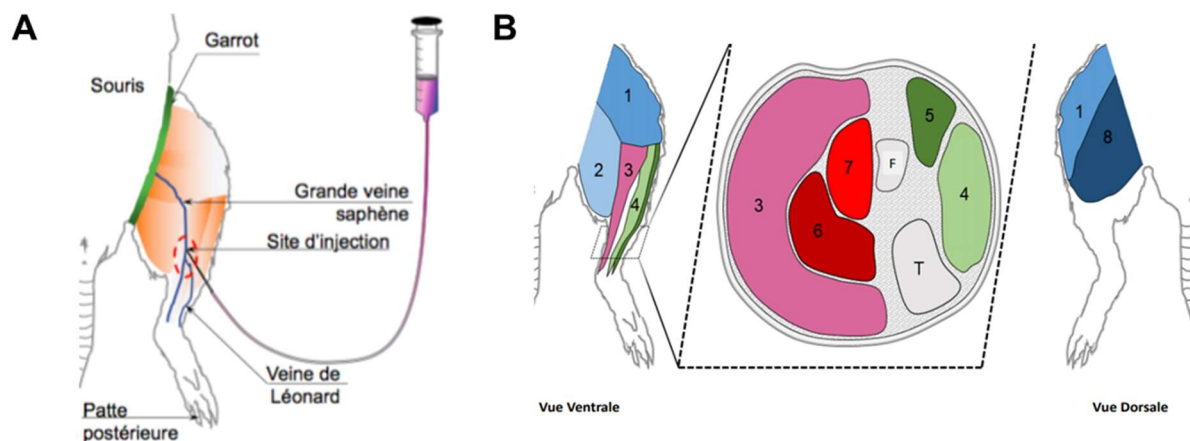


Figure 68 : Injection hydrodynamique par la veine saphène dans les membres postérieurs murins. (A) Méthode de l'injection hydrodynamique. (B) Représentation des différents muscles squelettiques dans les pattes postérieures des souris. 1 : quadriceps, 2 : les muscles postérieurs de la cuisse, 3 : le gastrocnemius, 4 : le tibialis, 5 : l'extenseur long des doigts (EDL), 6 : le plantaris, 7 : le soleus et 8 : l'ischio-jambier.

Les valeurs de bioluminescence ont été mesurées 3 et 7 jours après l'injection. En bioluminescence *in vivo*, le peptide P4 associé au pDys-6TH permet d'augmenter significativement l'activité luciférase par un facteur deux comparativement au peptide P1 (figure 69 A et B).

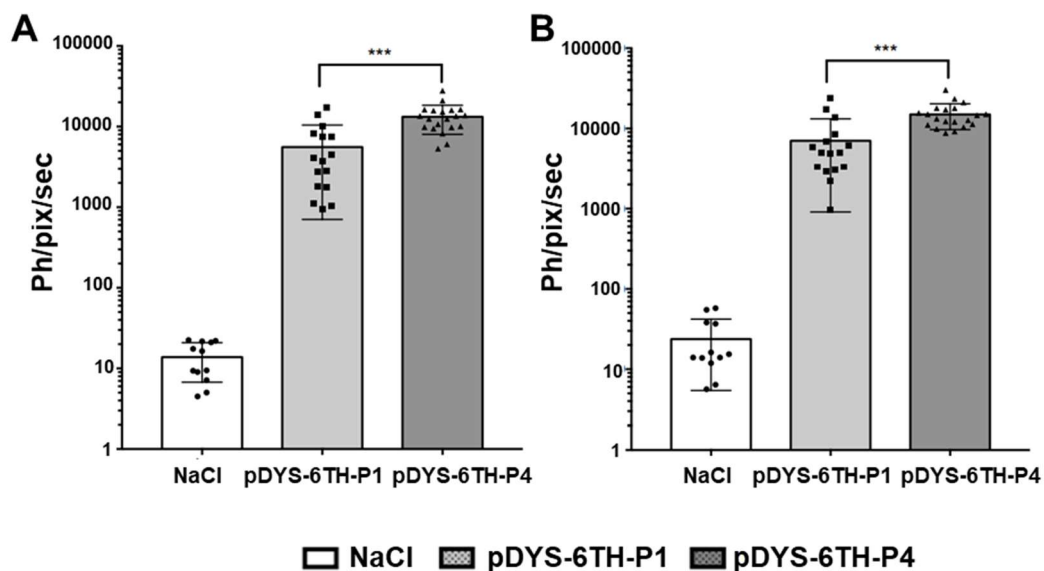


Figure 69 : Mesure de l'activité de la luciférase par bioluminescence après l'injection des plasmides pDYS-6TH-P1 et pDYS-6TH-P4 ou d'une solution saline NaCl. Mesures *in vivo*, à 3 (A) et 7 (B) jours après l'injection HLV dans les membres postérieurs des souris Swiss. Les résultats sont exprimés en photon/pixel/seconde (Ph/pix/sec) et correspondent aux moyennes des signaux de bioluminescence *in vivo* par traitement +/- SD. ***p < 0.001 ; test de Mann-Whitney (P1-luc utilisé comme référence).

La même expérience a été réalisée avec le plasmide pDys-3NF-6TH, qui possède des séquences 3NF favorisant le passage de l'ADN dans le noyau. Les mesures de bioluminescence *in vivo* à 3 et 7 jours indiquent que le peptide P4 n'améliore pas aussi significativement l'efficacité de transfection des plasmides avec 3NF par rapport au peptide P1 (figure 70 A et B).

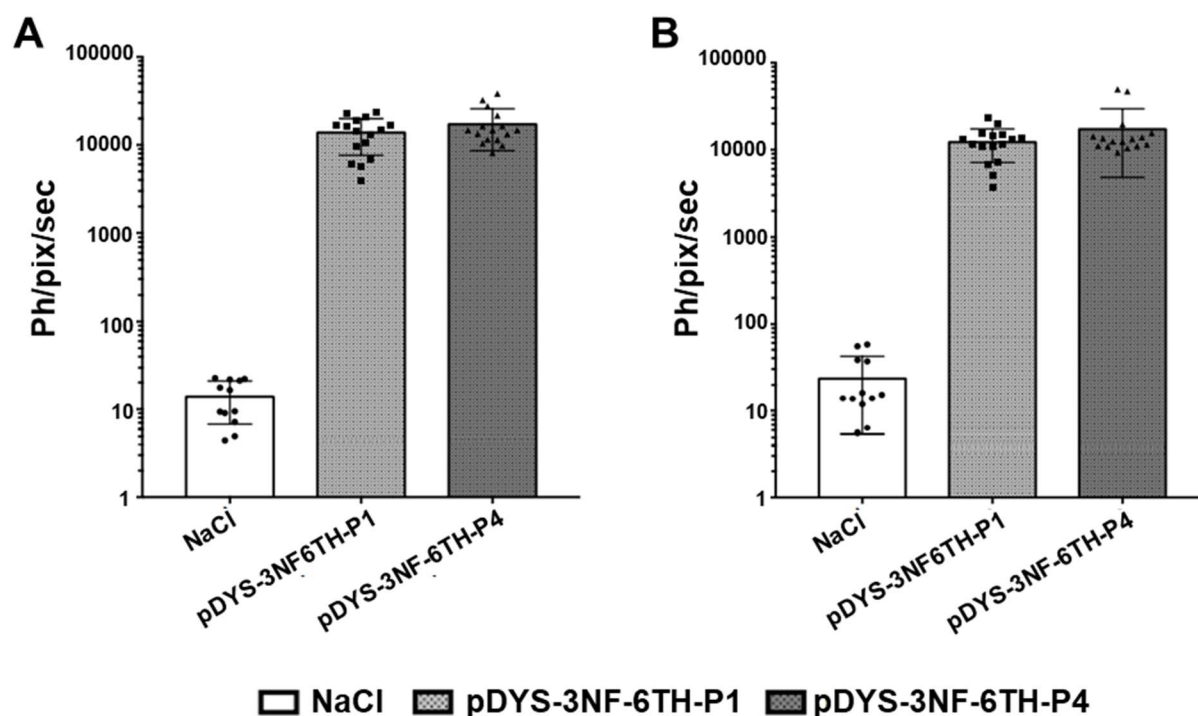


Figure 70 : Mesure de l'activité de la luciférase par bioluminescence après l'injection des plasmides pDYS-3NF-6TH-P1 et pDYS-3NF-6TH-P4 ou d'une solution saline NaCl. Mesures *in vivo*, à 3 (A) et 7 (B) jours après l'injection HLV dans les membres postérieurs des souris Swiss. Les résultats sont exprimés en photon/pixel/seconde (Ph/pix/sec) et correspondent aux moyennes des signaux de bioluminescence *in vivo* par traitement +/- SD. * $p < 0.001$; test de Mann-Whitney (P1-luc utilisé comme référence).**

7 jours après l'injection, 5 souris de chaque condition ont été sacrifiées et huit muscles de chaque patte postérieure ont été prélevés afin de mesurer l'activité de la luciférase dans les broyats musculaires. Les résultats obtenus à partir des broyats de muscles révèlent que le peptide P4 permet d'augmenter significativement la transfection

des plasmides pDYS-6TH dans l'ischio-jambier, en comparaison au contrôle P1. Une tendance en faveur du peptide P4 est systématiquement observée, notamment pour les muscles comme l'EDL (x3,8), le soleus (x3,3) et le gastrocnemius (x2,4) (tableau 23 et tableau 24). De plus, la distribution des points de mesures en bioluminescence *in vivo* ou *ex vivo* indique une forte homogénéité dans les muscles des souris traitées avec les pDys-TFO-P4 en comparaison aux souris traitées avec les plasmides pDys-TFO-P1.

Les mesures *ex vivo* de l'activité de la luciférase, 7 jours après l'injection, à partir des plasmides 3NF associés au peptide P4 ou P1, révèlent une amélioration significative de l'activité de la luciférase dans les muscles EDL (x4,3) et les quadriceps (x3) et une tendance en faveur du peptide P4 dans les muscles postérieurs (x3,5), les ischio-jambiers (x2,7) et les plantaris (x1,5) (tableau 23 et tableau 24).

Les ratios pDYS-3NF-6TH-P4/pDYS-3NF-6TH et pDYS-3NF-6TH-P4/ pDYS-3NF-6TH-P1 indiquent également un effet positif du peptide P4 sur l'efficacité de transfection des plasmides contrairement au peptide P1 (tableau 25). Ainsi, la présence de P4 apporte un gain d'efficacité de transfection de manière globale.

Cependant, la comparaison entre les plasmides avec des séquences 3NF et les plasmides sans séquence 3NF ne montre pas d'effet de ces séquences. L'effet 3NF est dépendant de l'activation du facteur de transcription NF-κB. Une hypothèse concernant l'effet 3NF pourrait donc provenir de l'activation variable du facteur de transcription NF-κB selon le type de muscles et la présence ou non d'inflammation. Les souris Swiss sont normalement dans un état non inflammatoire et donc leurs muscles seraient moins

sensibles aux signaux 3NF. Des études ont montré que l'injection HLV génère une inflammation légère et transitoire au niveau du site d'injection (Toumi *et al.*, 2006). Cependant, si l'inflammation n'est pas homogène alors cela expliquerait les résultats de bioluminescence obtenus avec les plasmides 3NF.

Ces différences ne devraient pas s'observer avec les souris mdx, modèle pour la dystrophie musculaire de Duchenne, puisque ces souris mdx souffrent d'inflammations au niveau des tissus musculaires, provoquées par la dégénérescence de la pathologie. Par conséquent, chez ces souris mdx la voie NFkB, activée en amont de l'injection et de manière homogène dans les pattes, devrait favoriser la migration et le passage de l'enveloppe nucléaire des plasmides contenant les séquences 3NF.

De plus, l'impact des séquences 3NF serait probablement masqué par la présence d'un promoteur CMV dans tous les plasmides, situé en amont du gène codant la luciférase (figure 43, p145). En effet, ce promoteur possède également des motifs de reconnaissance spécifiques du facteur de transcription NF-κB. Par conséquent, le franchissement des barrières intracellulaires des plasmides sans séquence 3NF peut déjà être amélioré par le recrutement de NF-κB au niveau de leur promoteur CMV.

Tableau 23 : Résultats de luminescence ex vivo sur les broyats de muscles.

	pDYS-6TH-P1	pDYS-6TH-P4	pDYS-3NF-6TH	pDYS-3NF-6TH-P1	pDYS-3NF-6TH-P4
EDL	8,28E+05	3,18E+06	5,59E+05	3,27E+05	1,40E+06
Gastrocnemius	9,91E+05	2,40E+06	8,48E+05	1,55E+06	1,45E+06
Ischio-jambier	2,67E+06	5,64E+06	5,28E+05	6,51E+05	1,76E+06
Plantaris	7,64E+06	1,08E+07	4,45E+06	4,15E+06	6,28E+06
Muscles postérieurs de la cuisse	1,85E+06	2,20E+06	6,90E+05	5,76E+05	2,00E+06
Quadriceps	1,86E+06	2,76E+06	4,15E+05	2,72E+05	8,06E+05
Soleus	2,64E+06	8,66E+06	2,03E+06	4,74E+06	2,17E+06
Tibialis	2,57E+06	4,98E+06	1,23E+06	1,44E+06	1,01E+06
Moyennes	2,63E+06	5,08E+06	1,34E+06	1,71E+06	2,11E+06
Ecart type	2,14E+06	3,17E+06	1,36E+06	1,76E+06	1,75E+06

Tableau 24 : Effet du peptide P4 et des séquences 3NF sur la transfection à partir des résultats de luminescence obtenus pour 8 muscles squelettiques de membres inférieurs de souris Swiss après une injection HLV.

	EDL	Gastrocnemius	Ischio-jambier	Plantaris	Muscles postérieurs de la cuisse	Quadriceps	Soleus	Tibialis
pDYS-6TH-P4/ pDYS-6TH-P1	3,8	2,4	2,1*	1,4	1,2	1,5	3,3	1,9
pDYS-3NF-6TH-P4/ pDYS-3NF-6TH-P1	4,3*	0,9	2,7	1,5	3,5	3,0*	0,5	0,7
pDYS-3NF-6TH-P4/ pDYS-6TH-P4	0,4	0,6	0,3	0,6	0,9	0,3	0,3	0,2
pDYS-3NF-6TH-P1/ pDYS-6TH-P1	0,4	1,6	0,2	0,5	0,3	0,1	1,8	0,6
pDYS-3NF-6TH-P4/ pDYS-3NF-6TH	2,5	1,7	3,3	1,4	2,9	1,9	1,1	0,8
pDYS-3NF-6TH-P1/ pDYS-3NF-6TH	1,7	1,8	1,2	0,9	0,8	0,7	2,3	1,2

*p<0,05 ; test de Mann-Whitney (P1-Luc utilisé comme référence)

Globalement, après une injection HLV des plasmides codant la dystrophine avec ou sans 3NF, l'expression de la luciférase est augmentée en présence du peptide P4 dans les muscles squelettiques des souris (tableau 25).

Tableau 25 : Effet général de P4 sur la transfection des muscles squelettiques des membres inférieurs de souris Swiss par injection HLV.

Traitements	Nombre de pattes	Nombre de muscles analysés	Moyennes des activités luciférase <i>ex vivo</i> (RLU/mg muscle)	Ratios P4/P1
P1-Luc	n=8	n=64	263537,6	1,9*
P4-Luc	n=10	n=80	5081295,6	
P1-3NF-Luc	n=8	n=64	1712270,3	1,2
P4-3NF-Luc	n=8	n=64	2109347,9	

Nous observons également que le gain dans l'expression de la luciférase diffère selon le type de muscle. Ces variations ne semblent pas dues aux types de fibres (type I ou II) qui composent chaque muscle car sur les huit muscles, seul le soleus est un muscle riche en fibre de type I (Augusto *et al.*, 2004). De plus, des résultats proches sont obtenus dans le soleus et dans le gastrocnemius, riche en fibre de type IIB. Le tableau 26 assigne des valeurs approximatives de longueur et de masse à chaque muscle ou groupes de muscles (Charles *et al.*, 2016) et indique que les variations dans l'expression de la luciférase ne semblent pas être influencées ni par la taille, ni par la masse des différents muscles. En effet, à l'exception des soleus et des ischio-jambiers, le gain obtenu par le peptide P4 lorsqu'il est associé au pDYS-6TH varie entre les plantaris (x1,4), les quadriceps (x1,5), les tibialis (x1,9), les EDL (x3,8) et les gastrocnemius (x2,4). Les muscles les plus lourds (*i.e.* quadriceps, muscles postérieurs, ischio-jambiers et gastrocnemius), les intermédiaires (*i.e.* plantaris, et tibialis) et les plus légers (*i.e.* soleus et EDL) affichent tous des variations dans le gain d'expression entre les plasmides 3NF et les plasmides sans 3NF. Globalement, après une injection HLV des plasmides codant la dystrophine avec ou sans 3NF, l'expression de la luciférase est augmentée en présence du peptide P4 dans les muscles squelettiques des souris (tableau 26).

Dans le cadre de l'injection HLV, d'autres caractéristiques anatomiques ou morphologiques pourraient influencer l'accessibilité des plasmides aux muscles squelettiques des pattes postérieures des souris comme la localisation du muscle par rapport au site d'injection, sa profondeur, sa vascularisation ou encore l'homogénéité de la diffusion du volume injecté dans la totalité de la patte.

Tableau 26 : Analyse des résultats d'efficacité de transfection dans les muscles squelettiques des membres inférieurs de souris Swiss par injection HLV.

Muscles	Ratio pDYS-6TH-P4/ pDYS-6TH-P1	Ratio pDYS-3NF-6TH-P4/ pDYS-3NF-6TH-P1	Types de fibres musculaires	Longueurs des muscles (mm)	Masse des muscles (mg)
Soleus	3,3	0,5	I/IIA	9,23	6,5
EDL	3,8	4,3*	IIDB/IIB	11,08	8
Plantaris	1,4	1,5	IIB	11,46	20
Quadriceps	1,5	3*	II	10,75	150
Tibialis	1,9	0,7	IIDB/IIB	11,3	42
Muscles postérieurs ^a	1,2	3,5	/	11,9	180
Ischio-jambier ^b	2,1*	2,7	/	15,96	150
Gastrocnemius ^c	2,4	0,9	IIB	11,11	106

a : les muscles postérieurs de la cuisse regroupent le rectus femoris, vastus medialis, le vastus lateralis et le vastus intermedius. b : les muscles ischios-jambiers regroupent le biceps femoris anterior, le biceps femoris posterior, le semitendinosus et le semimembranosus ; c : les gastrocnemius regroupent le medial gastrocnemius et le lateral gastrocnemius.

6 Conclusions et perspectives

L'ensemble des travaux réalisés au cours de mon doctorat s'appuient sur le fait que le peptide P4 (Pigeon *et al.*, 2013) et les séquences 3NF (Gonçalves *et al.*, 2009) contribuent à améliorer le trafic intracellulaire des plasmides le long des microtubules et le passage de l'enveloppe nucléaire, de manière respective. Mes travaux de recherche sont dédiés à l'association de ces deux signaux moléculaires en vue d'améliorer l'efficacité de transfection de plasmides thérapeutiques dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne et de la mucoviscidose.

6.1 Construction des ADNp-TFO-peptide

Mon projet décrit l'attachement d'un peptide sur un plasmide ADN grâce à un oligonucléotide (TFO) capable de cibler et de former des triples hélices avec une séquence homopurine•homopyrimidine insérée dans l'ADNp. Les différentes constructions plasmidiques ont été réalisées grâce à la méthode « Gateway cloning » qui a permis de maîtriser l'ordre des inserts constituant ces plasmides. Ainsi, les plasmides thérapeutiques possèdent des séquences 3NF et six sites TH (homopurine•homopyrimidine) distincts des gènes rapporteurs et des gènes thérapeutiques (codant pour la protéine CFTR ou dystrophine) placés sous la dépendance de leur promoteur respectif.

L'emploi d'un TFO contenant des BNA permet de former des triples hélices de manière robuste et de maîtriser la localisation et la quantité de peptides associés au plasmide. Cette stratégie de fixation permet de conserver l'expression du transgène.

Nous avons montré que la conjugaison des TFO-DBCO aux peptides-azide est complète lorsque la réaction est réalisée à un ratio molaire de 1:5 (TFP-DBCO:peptide-azide), pendant une nuit à température ambiante.

A partir des différentes constructions plasmidiques réalisées au laboratoire, nous avons caractérisé la formation des triples hélices en fonction de la taille et du nombre de sites TH. Les plasmides qui possèdent un site TH peuvent former 6 triples hélices et les plasmides qui possèdent six sites TH forment 18 à 19 triples hélices avec des TFO-peptides, après une nuit d'incubation à 4°C. En d'autres termes, 100% des sites sont occupés lorsque les plasmides possèdent une séquence homopurine•homopyrimidine contre 50 à 53% pour les plasmides avec six séquences homopurine•homopyrimidine.

6.2 Efficacité de transfection des ADNp-TFO-peptide

Les expériences de transfection *in vitro* utilisant des polymères cationiques ou des liposomes cationiques n'ont pas permis d'obtenir les résultats escomptés. Cependant, elles ont permis de montrer qu'il serait préférable d'utiliser un TFO-PMO dépourvu de charge et qu'il ne serait pas nécessaire de fixer beaucoup de peptide par plasmide. En effet, le peptide P4 est plus efficace lorsqu'il est couplé en petite quantité au plasmide ADN par une triple hélice, quel que soit le type de TFO utilisé. Nos résultats sont en accord avec la littérature puisque parmi les stratégies d'équipement de plasmides avec des peptides de ciblage nucléaire (cf. tableau 20, p 114), rares sont celles qui améliorent drastiquement l'efficacité de transfection. Seule la stratégie de ligation développée par Zanta montre un gain d'amélioration équivalent à un facteur 100 lorsqu'un peptide unique est couplé à un ADNp (Zanta *et al.*, 1999). Cette stratégie est efficace mais elle est limitée par la complexité de son protocole qui nécessite plusieurs étapes délicates de purification et de digestion enzymatique.

Des études complémentaires sur la conformation spatiale des constructions ADNp-TFO-peptide en fonction du type de TFO, du nombre de TFO-peptide couplé à l'ADN et de la nature du peptide (P4 ou P1) permettraient de nous renseigner sur l'état de condensation du plasmide en présence ou en absence de ces éléments et peut être de comprendre pourquoi seulement 50% des sites TH sont occupés dans les plasmides possédant 6 séquences oligopurines•oligopyrimidines.

De plus, des expériences de *tracking* pour étudier le déplacement (vitesse et trajet) *in cellulo* apporteraient des connaissances supplémentaires sur le comportement des ADNp en fonction du nombre de TFO-peptide couplés. Ces données affirmeraient ou non l'hypothèse de rétention des ADNp-TFO lorsqu'un grand nombre de triple hélice est formé et pourraient répondre à l'hypothèse selon laquelle l'accessibilité du peptide serait améliorée lorsque la triple hélice est réalisée avec des séquences oligonucléotidiques allongées par une molécule de PEG.

Au même titre que l'accessibilité du peptide, la pureté des ADNp-TFO-peptide semble être un paramètre décisif pour notre stratégie. En effet, les rendements des réactions de conjugaison et de formation de triples hélices étant relativement faibles impliquent la présence de peptides-azide et de TFO-peptides libres dans le mélange. Une étape de purification, si possible compatible avec la production à grande échelle, permettrait d'observer plus précisément l'impact du peptide P4 lorsqu'il est associé à un plasmide par une triple hélice en limitant les potentiels évènements de compétition entre les ADNp-TFO-P4, TFO-P4 et P4-azide pour la protéine cytosolique FIP-1.

L'ensemble des travaux *in vitro* devraient être réalisés dans des cellules différenciées ou quiescentes. Ceci nous permettrait d'observer l'impact du peptide P4 en absence de division cellulaire et donc dans des conditions où le réseau de microtubules

reste stable. Le maintien de ce réseau devrait favoriser l'adressage du peptide P4 à la dynéine, via la protéine FIP-1, en comparaison au peptide P1. De plus, il serait intéressant d'obtenir ce type de résultats puisque les injections *in vivo*, des produits de thérapie génique, concernent des cellules qui ne se divisent pas ou peu.

Les injections hydrodynamiques des ADNp-TFO-peptide, dans les pattes postérieures de souris Swiss, ont montré que l'activité de la luciférase a tendance à être plus élevée en présence du peptide P4 en comparaison au peptide P1 et de manière indépendante au type de fibres musculaires et indépendamment des caractéristiques anatomiques de chaque muscle ou groupe de muscles étudiés. L'effet des signaux 3NF en association avec le peptide P4 reste à être étudié dans les souris mdx dans lesquelles les mécanismes d'inflammation permettront une meilleure prise en charge des plasmides par le facteur de transcription NF-kB. Des expériences avec des souris mdx sont en cours afin de déterminer le taux de restauration de la dystrophine dans les fibres musculaires en présence ou en absence de P4, par des techniques d'immunomarquages ou de western-blot. Ces prochaines études permettront de déterminer si les séquences 3NF et le peptide P4 ont un effet additif ou synergique sur l'efficacité de transfection des plasmides.

En regardant, les résultats obtenus *in vitro* et *in vivo*, il semblerait que la complexation avec un vecteur synthétique réduise l'efficacité de notre stratégie de couplage. Effectivement, les résultats obtenus *in vivo* montre un impact du peptide P4 plus évident, en comparaison au peptide P1 et aux données obtenues *in vitro*. Or, les travaux présentés dans ce manuscrit ne permettent pas de conclure sur l'état de complexation entre les ADNp-TFO-peptide et les vecteurs synthétiques à la sortie des endosomes.

L'emploi du gène codant la luciférase permet d'obtenir des résultats de manière simple et rapide lors des expériences *in vivo*. Cependant, le remplacement de ce gène rapporteur par le gène codant l'eGFP permettrait de réaliser des analyses par cytométrie en flux qui donneraient des résultats plus précis sur l'efficacité de transfection en comparaison aux mesures de bioluminescence.

En vue de finaliser l'optimisation de notre stratégie de couplage, il serait également intéressant de vérifier l'impact du nombre de séquence TH sur des plasmides de même taille car la présence de ces séquences répétées (six séquences oligopurine•oligopyrimidine = 1600 kb) pourrait modifier le comportement des plasmides en ralentissant leur trafic intracellulaire.

Ces recherches sont consacrées à l'équipement sélectif de plasmides avec des molécules de ciblage tout en préservant l'expression du ou des transgènes. Ils contribuent aux avancées concernant la construction de virus artificiels composés de plusieurs signaux moléculaires pour s'échapper des endosomes, migrer le long des microtubules et entrer dans le noyau dans le but d'améliorer le transfert de gènes thérapeutiques par des vecteurs non viraux qui sont moins coûteux et moins immunogènes que des vecteurs viraux.

7 Bibliographie

- Aartsma-Rus, A., Straub, V., Hemmings, R., Haas, M., Schlosser-Weber, G., Stoyanova-Beninska, V., . . . Balabanov, P. (2017). Development of exon skipping therapies for Duchenne muscular dystrophy: a critical review and a perspective on the outstanding issues. *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(5):251-259.
- Aboody, K., Najbauer, J., Metz, M., D'Apuzzo, M., Gutova, M., Annala, A., . . . Portnow, J. (2013). Neural stem cell-mediated enzyme prodrug therapy for glioma: preclinical studies. *Science translational medicine*, 5(184):184ra59.
- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nature Communications*, 9(1):1911.
- AFMTéléthon. (2020). Avancées dans les dystrophies musculaires de Duchenne et de Becker.
- AFM-Téléthon>Myoinfo. (2020). La dystrophie musculaire de Duchenne.
- Aitken, M., Moss, R., Waltz, D., Dovey, M., Tonelli, M., McNamara, S., . . . Reynolds, T. (2001). A phase I study of aerosolized administration of tgAAVCF to cystic fibrosis subjects with mild lung disease. *Human Gene Therapy*, 12(15):1907-1916.
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Pia Cicalese, M., Baricordi, C., . . . Naldini, L. (2003). Lentivirus-based gene therapy of hematopoietic stem cells in Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*, 341(6148):1233-1251.
- Akinc, A., Thomas, M., Klivanov, A., & Langer, R. (2005). Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *Journal of Gene Medicine*, 7(5):657-663.
- Akita, H., Kurihara, D., Schmeer, M., Schleef, M., & Harashima, H. (2015). Effect of the compaction and the size of DNA on the nuclear transfer efficiency after microinjection in synchronized cells. *Pharmaceutics*, 7(2):64-73.
- Al-Dosari, M., & Gao, X. (2009). Nonviral gene delivery: principle, limitations, and recent progress. *The AAPS journal*, 11(4):671-681.
- Allen, C., & Borisy, G. (1974). Structural polarity and directional growth of microtubules of *Chlamydomonas* flagella. *Journal of Molecular Biology*, 90(2),381-402.
- Allen, D., Whitehead, N., & Forehner, S. (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.
- Alonso-Padilla, J., Papp, T., Kajan, G., Benkö, M., Havelange, M., Lemckert, A., . . . Baker, A. (2016). Development of novel adenoviral vectors to overcome challenges observed with HAdV-5-based constructs. *Molecular Therapy*, 24(1):6-16.
- Alton, E., Beekman, J., Boyd, A., Brand, J., Carlon, M., Connolly, M., . . . Zhu, J. (2017). Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 72:137-147.
- Alton, E., Boyd, A., Cheng, S., Cunningham, S., Davies, J., Gill, D., . . . Porteous, D. (2013). A randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIB clinical trial of repeated application of gene therapy in patients with cystic fibrosis. *Thorax*, 68(11):1075-1077.

- Al-Zhaidy, S. A., Kolb, S. J., Lowes, L., Alfano, L. N., Shell, R., Church, K. R., . . . Mendell, J. R. (2019). AVXS-101 (Onasemnogene Apeparvovec) for SMA1: comparative study with a prospective natural history cohort. *Journal of neuromuscular diseases*, 6(3):307-317.
- Amoasii, L., Hildyard, J., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., Mireault, A., Caballero, D., . . . Olson, E. (2018). Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 362(6410):86-91.
- Anderson, J., Rogers, R., & Jarrett, H. (1996). Ca-Calmodulin binds to the carboxyl-terminal domain of dystrophin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(12):6605-6610.
- Aoki, Y., Hosaka, S., Kawa, S., & Kiyosawa, K. (2001). Potential tumor-targeting peptide vector of histidylated oligolysine conjugated to a tumor-homing RGD motif. *Cancer Gene Therapy*, 8(10):783-787.
- Ariansen, S., Afanasiev, B., Moskaug, J., Stenmark, H., Madshus, I., & Olsnes, S. (1993). Membrane translocation of diphtheria toxin A-fragment: role of carboxy-terminal region. *Biochemistry*, 32:83-90.
- Arnould, S., Chames, P., Perez, C., Lacroix, E., Duclert, A., Epinat, J.-C., . . . Pâques, F. (2006). Engineering of large numbers of highly specific homing endonucleases that induces recombination on novel DNA targets. *Journal of Molecular Biology*, 355(3):443-458.
- Aronsohn, a. H. (1998). Nuclear localization signal peptides enhance cationic liposom-mediated gene therapy. *Journal of Drug Targeting*, 5: 163-169.
- Aronsohn, A., & Hughes, J. (1998). Nuclear localization signal peptides enhance cationic liposome-mediated gene therapy. *Journal of Drug Targeting*, 5(3):163-169.
- Aronson, S., Veron, P., Collaud, F., Hubert, A., Delahais, V., Honnet, G., . . . Mingozi, F. (2019). Prevalence and relevance of pre-existing anti-adenovirus immunity in the context of Gene therapy for Crigler-Najjar syndrome. *Human Gene Therapy*, 30(10):1297-1305.
- Athanasopoulos, T., Graham, I., Foster, H., & Dickson, G. (2004). Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Therapy*, 11(S1):S109-S121.
- Augusto, V., Padovani, C., & Rocha Campos, G. (2004). Skeletal muscle fiber types in C57BL mice. *Brazilian journal of morphological sciences*, 21(2):89-94.
- Avery, O., MacLeod, C., & McCarty, M. (1944). Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. *The Journal of experimental medicine*, 79(2):137-158.
- Ayalon, G., Davis, J., Scotland, P., & Bennett, V. (2008). An ankyrin-based mechanism for functional organization of dystrophin and dystroglycan. *Cell*, 135:1189-1200.
- Badding, M., Vaughan, E., & Dean, D. (2012). Transcription factor- plasmid binding modulates microtubule interactions and intracellular trafficking during gene transfer. *Gene Therapy*, 19(3):338-346.
- Bai, H., Schiralli Lester, G., Petishnok, L., & Dean, D. (2017). Cytoplasmic transport and nuclear import of plasmid DNA. *Bioscience Reports*, 37(6).

- Bangel-Ruland, N., Tomczak, K., Fernandez Fernandez, E., Leier, G., Leciejewski, B., Rudolph, C., . . . Weber, W.-M. (2013). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-mRNA delivery: a novel alternative for cystic fibrosis gene therapy. *Journal of Gene Medicine*, 15:414-426.
- Barati, S., Chegini, F., Hurtado, P., & Rush, R. (2002). Hybrid tetanus toxin C fragment-diphtheria toxin translocation domain allows specific gene transfer into PC12 cells. *Experimental Neurology*, 177(1):75-87.
- Barba, A., Bochicchio, S., Dalmoro, A., & Lamberti, G. (2019). Lipid delivery systems for nucleic-acid-based-drugs: from production to clinical applications. *Pharmaceutics*, 11:360.
- Bartlett, J., Friedman, K., Ling, S., Pace, R., Bell, S., Bourke, B., . . . Knowles, M. (2009). Genetic modifiers of liver disease in cystic fibrosis. *JAMA*, 302(10):1076-1083.
- Barton-Davis, E., Cordier, L., Shoturma, D., Leland, S., & Sweeney, H. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(4):375-381.
- Barton-Davis, E., Cordier, L., Shoturma, D., Leland, S., & Sweeney, H. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 104(4):375-381.
- Bausinger, R., von Gersdorff, K., Braeckmans, K., Ogris, M., Wagner, E., Bräuchle, C., & Zumbusch, A. (2006). The transport of nanosized gene carriers unraveled by live-cell imaging. *Angewandte Chemie*, 118(10):1598-1602.
- Belanto, J., Mader, T., Eckhoff, M., Strandjord, D., Banks, G., Gardner, M., . . . Ervasti, J. (2014). Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *PNAS*, 111(15):5723-5728.
- Bellon, G., Michel-Calemard, L., Thouvenot, D., Jagneaux, V., Poitevin, F., Malcus, C., . . . Pavirani, A. (1997). Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Human Gene Therapy*, 8(1):15-25.
- Belmadi, N., Midoux, P., Loyer, P., Passirani, C., Pichon, C., Le Gall, T., . . . Montier, T. (2015). Synthetic vectors for gene delivery: an overview of their evolution depending on routes of administration. *Biotechnology Journal*, 10(9):1370-1389.
- Bengtsson, N., Hall, J., Odom, G., Phelps, M., Andrus, C., Hawkins, R., . . . Chamberlain, J. (2016). Muscle-specific CRISPR/Cas9 dystrophin gene editing ameliorates pathophysiology in mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Nature communications*, 8(14454).
- Benjaminsen, R., Matthebjerg, M., Henriksen, J., Moghimi, S., & Andresen, T. (2013). The possible "proton sponge" effect of polyethylenimine (PEI) does not include change in lysosomal pH. *Molecular Therapy*, 21(1):149-157.
- Bennett, C., & Swayze, E. (2010). RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 259-293.
- Bennett, M., & Eisenberg, D. (1994). Refined structure of monomeric diphtheria toxin at 2.3 Å resolution. *Protein Science*, 3:1464-1475.
- Bennevault-Celton, V., Urbach, A., Martin, O., Pichon, C., Guégan, P., & Midoux, P. (2011). Supramolecular assemblies of histidinylated α -cyclodextrin in the presence of DNA scaffold during CDplexes formation. *Bioconjugate Chemistry*, 22(12):2404-2414.

- Bertoni, C. (2014). Emerging gene editing strategies for Duchenne muscular dystrophy targeting stem cells. *Frontiers in Physiology*, 5:148.
- Bertrand, E., Gonçalves, C., Billiet, L., Gomez, J., Pichon, C., Cheradame, H., . . . Guégan, P. (2011). Histidinylated linear PEI: a new efficient non-toxic polymer for gene transfer. *Chemical Communications*, 47, 12547-12549.
- Bhosle, R., Michele, D., Campbell, K., Li, Z., & Robson, R. (2006). Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346(3):768-777.
- Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J., & Carroll, D. (2003). Enhancing Gene Targeting with designed zinc finger nucleases. *Science*, 300(5620):764-764.
- Bidou, L., Allamand, V., Rousset, J.-P., & Namy, O. (2012). Sense from nonsense: therapies for premature stop codon diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 18(11), 679-688.
- Biffi, A., Montini, E., Lioroli, L., Cesani, M., Fumagalli, F., Plati, T., . . . Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science*, 341(6148):1233158-1233158.
- Bilton, D., Fox, R., Webb, A., Lawler, W., McMahon, R., & Howat, J. (1990). Pathology of common bile duct stenosis in cystic fibrosis. *Gut*, 31: 236-238.
- Blaese, R., Culver, K., Miller, A., Carter, C., Fleisher, T., Clerici, M., . . . Anderson, W. (1995). T Lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, 270(5235):475-480.
- Bleker, S., Sonntag, F., & Kleinschmidt, J. (2005). Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *Journal of Virology*, 79(4):2528-2540.
- Bleker, S., Sonntag, F., & Kleinschmidt, J. (2005). Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A2 activity. *Journal of Virology*, 79(4):2528-2540.
- Bloomfield, V. (1996). DNA condensation. *Current Opinion in Structural Biology*, 6(3):334-341.
- Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., . . . Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959):1509-1512.
- Bogdanove, A., & Voytas, D. (2011). TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science*, 333(6051):1843-1846.
- Boissel, L., Betancur-Boissel, M., Lu, W., Krause, D., Van Etten, R., Wels, W., & Klingemann, H. (2013). Retargeting NK-92 cells by means of CD19 and CD20-specific chimeric antigen receptors compares favorably with antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Oncoimmunology*, 2:10, e26527.
- Bono, N., Ponti, F., Mantovani, D., & Candiani, G. (2020). Non-viral in vitro gene delivery: it is now time to set the bar! *Pharmaceutics*, 12:183.
- Bostick, B., Yue, Y., Lai, Y., Long, C., Li, D., & Duan, D. (2008). Adeno-associated virus serotype-9 microdystrophin gene therapy ameliorates electrocardiographic abnormalities in mdx mice. *Human Gene Therapy*, 19:851-856.
- Boudreau, R., & Davidson, B. (2010). RNAi therapeutics for CNS disorders. *Brain Research*, 1338:112-121.

- Bouquet, C., Vignal CLermont, C., Galy, A., Fitoussi, S., Blouin, L., Munk, M., . . . Thomasson, N. (2019). Immune response and intraocular inflammation in patients with Leber hereditary optic neuropathy treated with intravitreal injection of recombinant adeno-associated virus 2 carrying the ND4 gene: a secondary analysis of phase 1/2 clinical trial. *JAMA Ophthalmology*, 137(4):399-406.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J.-P. (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.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M., Mergny, M., Scherman, D., Demeneix, B., & Behr, J.-P. (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.
- Branden, C. a. (2001). In vivo nuclear delivery of oligonucleotides via hybridizing bifunctional peptides. *Gene Therapy*, 8: 84-87.
- Branden, L., Mohamed, A., & Smith, C. (1999). A peptide nucleic acid-nucleat localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA . *Nature Biotechnology*, 784-787.
- Branden, L., Mohamed, A., & Smith, E. (1999). A peptide nucleic acid-nuclear localization signal fusion that mediates nuclear transport of DNA. *Nature Biotechnology*, 17: 784-787.
- Bremner, K., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S., & Vallee, R. (2009). Adenovirus transport through a direct cytoplasmic dynein-hexon interaction. *Cell Host & Microbe*, 6(6):523-535.
- Brenman, J., Chao, D., Xia, H., Aldape, K., & Bredt, D. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 82: 743-752.
- Breuzard, G., Tertilt, M., Gonçalves, C., Cheradame, H., Géguan, P., Pichon, C., & Midoux, P. (2008). Nuclear delivery of NFkB-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.
- Brunelli, S., Sciorati, C., D'Antona, G., Innocenzi, A., Covarello, D., Galvez, B., . . . Clementi, E. (2007). Nitric oxide release combined with nonsteroidal antiinflammatory activity prevents muscular dystrophy pathology and enhances stem cell therapy. *PNAS*, 104(1):264-269.
- Budker, V., Gurevich, V., Hagstrom, J., Bortzov, F., & Wolff, J. (1996). pH-sensitive, cationic liposomes: a new synthetic virus-like vector. *Nature Biotechnology*, 14(6):760-764.
- Bukrinsky, M., Sharova, N., McDonald, T., Pushkarskaya, T., Tarpley, W., & Stevenson, M. (1993). Association of integrase, matrix, and reverse transcriptase antigens of human immunodeficiency virus type 1 with viral nucleic acids following acute infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(13):6125-6129.
- Büning, H. (2013). Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO Molecular Medicine*, 5(1):1-3.

- Bureau, M., Naimi, S., Torero Ibad, R., Seguin, J., Georger, C., Arnould, E., . . . Scherman, D. (2004). Intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1676(2):138-148.
- Bus, T., Traeger, A., & Schubert, U. (2018). The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. *Journal of Materials Chemistry B*.
- Bus, T., Traeger, A., & Schubert, U. (2018). The great escape: how cationic polyplexes overcome the endosomal barrier. *Journal of Materials Chemistry B*.
- Bushby, K., Finkel, R., Wong, B., Barohn, R., Campbell, C., Comi, G., . . . McDonald, C. (2014). Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve*, 50, 477-487.
- Buske, F., Mattick, J., & Bailey, T. (2011). Potential in vivo roles of nucleic acid triple-helices. *RNA biology*, 8(3), 427-439.
- Cabrini, G. (2018). Innovative Therapies for Cystic Fibrosis: The Road from Treatment to Cure. *molecular diagnosis and therapy*.
- Campbell, E., & Hope, T. (2015). HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8):471-483.
- Canine, B., Wang, Y., & Hatefi, A. (2008). Evaluation of the effect of vector architecture on DNA condensation and gene transfer efficiency. *Journal of controlled release*, 129(2):117-123.
- Canty, J., & Yildiz, A. (2020). Activation and regulation of cytoplasmic dynein. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(8):2843.
- Carlisle, R., Bettinger, T., Ogris, M., Hale, S., Mautner, V., & Seymour, L. (2001). Adenovirus hexon protein enhances nuclear delivery and increases transgene expression of polyethyleimine/plasmid DNA vectors. *Molecular Therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 4(5):473-483.
- Cartier R, R. R. (2002). Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems. *Gene Therapy*, 157-167.
- Cassany, A., Ragues, J., Guan, T., Bégu, D., Wodrich, H., Kann, M., . . . Gerace, L. (2015). Nuclear import of adenovirus DNA involves direct interaction of hexon with an N-terminal domain of the nucleoporin Nup214. *Journal of Virology*, 89(3):1719-1730.
- Castle, M., Perlson, E., Holzbaur, E., & Wolfe, J. (2014). Long-distance axonal transport of AAV9 is driven by dynein and Kinesin-2 and is trafficked in a highly motile Rab-7-positive compartment. *Molecular Therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, 22(3):554-566.
- Catros, V. (2019). Les CAR-T cells, des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux : de nouvelles générations pour le traitement des tumeurs solides. *Médecine/Sciences*, 35:316-326.
- Cautain, B., Hill, R., de Pedro, N., & Link, W. (2015). Components and regulation of nuclear transport processes. *The FEEBS journal*, 282(3):445-462.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., . . . Fisher, A. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288(5466), 669-672.
- Chamberlain Joel R, C. J. (may 2017). Progress toward Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Molecular therapy review*.

- Chamberlain Joel R, C. J. (may 2017). Progress toward Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Molecular therapy review*.
- Chamberlain, J., & Chamberlain, J. (2017). Progress toward Gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Molecular therapy*, 25(5): 1125-1131.
- Chan CK, J. D. (1999). Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Human Gene Therapy*, 10: 1695-1702.
- Chan CK, S. T. (2000). Supramolecular structure and nuclear targeting efficiency determine the enhancement of transfection by modified polylysines. *Gene Therapy*, 7: 1690-1697.
- Chan, C., & Jans, D. (1999). Enhancement of polylysine-mediated transferrin infection by nuclear localization sequences: polylysine does not function as a nuclear localization sequence. *Human Gene Therapy*, 10(10):1695-1702.
- Chan, D., & Kim, P. (1998). HIV entry and its inhibition. *Cell*, 93:681-684.
- Chan, J. (2001). Enhancement of MSH receptor- and GAL4- mediated gene transfer by switching the nuclear import pathway. *Gene Therapy*, 2001:8.
- Chang, Y.-H., Connolly, J., Shimasaki, N., Mimura, K., Kono, K., & Campana, D. (2013). A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances Natural Killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Research*, 73(6):1777-1786.
- Chargaff, E. (1950). Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*, 6(6), 201-209.
- Charles, J., Cappellari, O., Spence, A., Hutchinson, J., & Wells, D. (2016). Musculoskeletal geometry, muscle architecture and functional specialisations of the mouse hindlimb. *PLoS One*, 11(4):e0147669.
- Chen, P., Tian, J., Kovesdi, I., & Bruder, J. T. (1998). Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 273(10), 5815-5820.
- Chen, Q., Qi, R., Chen, X., Yang, X., Wu, S., Xiao, H., & Dong, W. (2017). A targeted and stable polymeric nanoformulation enhances systemic delivery of mRNA to tumors. *Molecular Therapy*, 25(1):92-101.
- Chen, W., Li, H., Liu, Z., & Yuan, W. (2016). Lipopolyplex for therapeutic gene delivery and its application for treatment of Parkinson's disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 8(68).
- Cheng, X., & Lee, R. (2016). The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 99(Pt A):129-137.
- Chesney, J., Awasthi, S., Curti, B., Hutchins, L., Linette, G., Triozzi, P., . . . Amatruda, T. (2018). Phase IIIb safety results from an expanded-access protocol of talimogene laherparepvec for patients with unresected, stage IIIB-IVM1c melanoma. *Melanoma research*, 28(1):44-51.
- Chiaki Hidai, H. K. (2018). Nonviral Gene Therapy for cancer : A Review. *diseases*.
- Chicoine, L., Al-Zaidy, S., Sahenk, Z., Lehman, K., Lowes, L., Miller, N., . . . Rodino-Klapac, L. (2019). Gene delivery for limb-girdle muscular dystrophy type 2D by isolated limb infusion. *Human Gene Therapy*, 30(7):794-801.

- Chicoine, L., Rodino-Klapac, L., Shao, G., Xu, R., Bremer, W., Camboni, M., . . . Martin, P. (2014). Vascular delivery of rAAVrh/MCK.GALGT2 to the gastrocnemius muscle of the rhesus macaque stimulates the expression of dystrophin and laminin $\alpha 2$ surrogates. *Molecular Therapy*, 22(4):713-724.
- Chiper, M., Tounsi, N., Kole, R., Kichler, A., & Zuber, G. (2017). Self-assembling 1.8 kDa polyethylenimines with dissolution switch at endosomal acidic pH are delivery carriers for plasmid DNA, mRNA, siRNA and exon-skipping oligonucleotides. *Journal of Controlled Release*, 246:60-70.
- Christie, M., Chang, C.-W., Rona, G., Smith, K., Stewart Alastair G, Takeda, A., . . . Kobe, B. (2016). Structural biology and regulation of protein import into nucleus. *Journal of Molecular Biology*, 428(10), 2060-2090.
- Cideciyan, A. (2010). Leber congenital amaurosis due to RPE65 mutations and its treatment with gene therapy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(5):398-427.
- Ciolina, C., Byk, G., Blanche, F., Thuillier, V., Scherman, D., & Wils, P. (1999). Coupling of nuclear localization signals to plasmid DNA and specific interaction of the conjugates with importin alpha. *Bioconjugates Chemistry*, 10(1), 49-55.
- Cohen, R., van der Aa, M., Macaraeg, N., Lee, A., & Szoka, F. (2009). Quantification of plasmid DNA copies in the nucleus after lipoplex and polyplex transfection. *Journal of Controlled Release*, 135(2):166-174.
- Collas P, A. P. (1997). Nuclear localization signals: a driving force for nuclear transport of plasmid DNA in zebrafish. *Biochemistry and Cell Biology*, 75: 633-640.
- Collas, & Alestrom. (1997). Rapid targeting of plasmid DNA to zebrafish embryo nuclei by nuclear localization signal of SV40 T antigen. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 6: 48-58.
- Collas, P., & Aleström, P. (1996). Nuclear localization signal of SV40 T antigen directs import of plasmid DNA into sea urchin male pronuclei in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 45(4):431-438.
- Collas, P., Husebye, H., & Alestrom, P. (1996). The nuclear localization sequence of SV40 T antigen promotes transgene uptake and expression in zebrafish embryo nuclei. *Transgenic Research*, 5: 451-458.
- Collins, F. (1992). Cystic Fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science*, 774-779.
- Colosimo, A., Serafino, A., Sangiuolo, F., Di Sario, S., Bruscia, E., Amicucci, P., . . . Mossa, G. (1999). Gene transfection efficiency of tracheal epithelial cells by DC-Chol-DOPE/DNA complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1419(2):186-194.
- Conner, S., & Schmid, S. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927):37-44.
- Cooney, A., Alaiwa, M., Shah, V., Bouzek, D., Stroik, M., Powers, L., . . . McCray Jr, P. (2016). Lentiviral-mediated phenotypic correction of cystic fibrosis pigs. *JCI Insight*, 1(14):e88730.
- Corey, M., Durie, P., Moore, D., Forstner, G., & Levison, H. (1989). Familial concordance of pancreatic function in cystic fibrosis. *The Journal of Pediatrics*, 115(2), 274-277.
- Counsell, J., Asgarian, Z., Meng, J., Ferrer, V., Vink, C., Howe, S., . . . Danos, O. (2017). Lentiviral vectors can be used for full-length dystrophin gene therapy. *Scientific Reports*, 7:79.
- Crawford, G., Lu, Q., Partridge, T., & Chamberlain, J. (2001). Suppression of revertant fibers in mdx mice by expression of functional dystrophin. *Human Molecular Genetics*, 10(24):2745-2750.

- Cristiano, R. (2002). Protein/DNA polyplexes for gene therapy. *Surgical Oncology Clinics' of North America*, 11(3);697-716.
- Cromwell, C., Sung, K., Park, J., Kryslar, A., Jovel, J., Kim, S., & Hubbard, B. (2018). Incorporation of bridged nucleic acids into CRISPR RNAs improves Cas9 endonuclease specificity. *Nature Communications*, 9, 1448.
- Crosbie, R., Heighway, J., Venzke, D., Lee, J., & Campbell, K. (1997). Sarcospan, the 25-kDa transmembrane component of the Dystrophin-Glcoprotein Complex. *Journal of Biological Chemistry*, 272(50):31221-31224.
- Crowley, S., Poliskey, J., Baumhover, N., & Rice, K. (2015). Efficient expression of stabilized mRNAPEG-peptide polyplexes in liver. *Gene Therapy*, 22(12):993-999.
- Crystal, R., McElvaney, N., Rosenfeld, M., Chu, C.-S., Mastrangeli, A., Hay, J., . . . Danel, C. (1994). Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nature Genetics*, 8(1):42-51.
- Cui, Z., Han, S.-J., Vangasseri, D., & Huang, L. (2005). Immunostimulation mechanism of LPD nanoparticle as a vaccine carrier. *Molecular Pharmaceutics*, 2(1):22-28.
- Cytoskeleton. (s.d.). fluorescent microtubules biochem kit cat #BK007R.
- Da Silva Sanchez, A., Paunovska, K., Cristian, A., & Dahlman, J. (2020). Treating cystic fibrosis with mRNA and CRISPR. *Human Gene Therapy*, 31(17-18):940-955.
- Dames, P., Laner, A., Maucksch, C., Aneja, M., & Rudolph, C. (2007). Targeting of the glucocorticoid hormone receptor with plasmid DNA comprising glucocorticoid response elements improves non viral gene transfer efficiency in the lungs of mice. *The Journal of Gene Medicine*, 9(9), 820-829.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D., & Schmid, S. (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *The Journal of Cell Biology*, 127(4):915-934.
- Dan, N., & Danino, D. (2014). Structure and kinetics of lipid-nucleic acid complexes. *Advances in colloid and interface science*, 205:230-239.
- D'Angelo, M., & Hetzer, M. (2008). Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes. *Trends in Cell Biology*, 18(10), 456-466.
- Dauty, E., & Verkman, A. (2005). Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*, 280(9):7823-7828.
- David, W. K. (2007). Nucleoplasmic transport of DNA: enhancing non-viral gene delivery. *Biochemical Journal*, 406: 185-202.
- David-Pfeuty, T., Erickson, H., & Pantaloni, D. (1977). Guanosinetriphosphatase activity of tubulin associated with microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12):5372-5376.
- Davies, M. (2002). Non-viral delivery systems. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(2):128-131.
- De Boeck, K. (2020). Cystic fibrosis in the year 2020: a disease with a new face. *Acta Paediatrica*, 109, 893-899.
- De Palma, C., & Clementi, E. (2012). Nitric oxide in myogenesis and therapeutic muscle repair. *Molecular Neurobiology*, 46:682-692.

- Dean, D. (1997). Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific. *Experimental Cell Research*, 230(2):293-302.
- Dean, D., Dean, B., Muller, S., & Smith, L. (1999). Sequence requirements for plasmid nuclear import. *Experimental cell research*, 253(2):713-722.
- Deborah R Gill, S. C. (2014). Delivery of genes into the CF airway. *Thorax*, 962-964.
- Deconinck, N., Ragot, T., Maréchal, G., Parricaudet, M., & Gillis, J. (1996). Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of dystrophin minigene. *PNAS*, 93:3570-3574.
- Delalande, A., Bastié, C., Pigeon, L., Manta, S., Leberte, M., Mignet, N., . . . Pichon, C. (2017). Cationic gas-filled microbubbles for ultrasound-based nucleic acids delivery. *Bioscience Reports*, 37(6):BSR20160619.
- Demeneix, B., & Behr, J.-P. (2005). Polyethyleimine (PEI). *Advances in Genetics*, 215-230.
- Demeneix, B., & Behr, J.-P. (2005). Polyethylenimine (PEI). *Advances in Genetics*, 215-230.
- den Dunnen, J. (2006). *Dystrophin isoforms*. Récupéré sur Leiden Muscular Dystrophy pages: <https://www.dmd.nl/isoforms.html>
- Di Gioia, S., & Conese, M. (2009). Polyethyleimine-mediated gene delivery to the lung and therapeutic applications. *Drug design, development and therapy*, 2:163-188.
- Dion, S., Demattéi, M.-V., & Renault, S. (2007). Les domaines à doigts de zinc: vers la modification de la structure et de l'activité des génomes. *Médecine/Sciences*, 23:834-839.
- Doherty, G., & McMahon, H. (2009). Mechanisms of endocytosis. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1):857-902.
- Domingue, J., Drewes, J., Merlo, C., Housseau, F., & Sears, C. (2020). Host responses to mucosal biofilms in the lung and gut. *Mucosal Immunology*.
- Doody, A., Korley, J., Dang, K., Zawaneh, P., & Putnam, D. (2006). Characterizing the structure/function parameter space of hydrocarbon-conjugated branched polyethylenimine for DNA delivery in vitro. *Journal of Controlled Release*, 116(2):227-237.
- Doorenweerd, N., Mahfouz, A., van Putten, M., Kaliyaperumal, R., t' Hoen, P., Hendriksen, J., . . . Lelieveldt, B. (2017). Timing and localization of human dystrophin isoform expression provide insights into the cognitive phenotype of Duchenne muscular dystrophy. *Scientific Reports*, 7(1):12575.
- Dowty, M., Williams, P., Zhang, G., Hagstrom, J., & Wolff, J. (1995). Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(10):4572-4576.
- Duca, M., Vekhoff, P., Oussedik, K., Halby, L., & Arimondo, P. (2008). The triple helix: 50 years later, the outcome. *Nucleic Acids Research*, 16: 5123-5138.
- Dupont, J.-B., Guo, J., Renaud-Gabardos, E., Poulard, K., Latournerie, V., Lawlor, M., . . . Mack, D. (2019). AAV-mediated gene transfer restores a normal muscle transcriptome in a canine model of X-linked myotubular myopathy. *Molecular Therapy*, 28(2):382-393.
- Dupret, B., & Angrand, P.-O. (2014). L'ingénierie des génomes par les TALEN. *Médecine/Sciences*, 30:186-193.

- Dzierlega, K., & Yokota, T. (2020). Optimization of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy. *Gene Therapy*.
- Echigoya, Y., Mouly, V., Garcia, L., Yokota, T., & Duddy, W. (2015). In silico based on predictive algorithms as a design tool for exon skipping oligonucleotides in Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE*, 10, e0120058.
- Eichler, F., Duncan, C., Musolino, P., Orchard, P., De Oliveira, S., Thrasher, A., . . . Williams, D. (2017). Hematopoietic stem-cell gene therapy for cerebral adrenoleukodystrophy. *The New England Journal of Medicine*, 377(17):1630-1638.
- Elliott, R., & Head, J. (2013). Adjuvant breast cancer vaccine improves disease specific survival of breast cancer patients with depressed lymphocyte immunity. *Surgical Oncology*, 22(3):172-177.
- El-Sayed, A., & Harashima, H. (2013). Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin-dependent to lipid raft-mediated endocytosis. *Molecular Therapy*, 21(6):1118-1130.
- Emery, A. (1993). Duchenne muscular dystrophy - Meryon's disease. *Neuromuscular disorders*, 3(4): 263-266.
- Erbacher, P., Roche, A., Monsigny, M., & Midoux, P. (1996). Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Experimental Cell Research*, 225(1):186-194.
- Erik V. Munsell, N. L. (January 2017). Journey to the Center of the Cell: Current Nanocarrier Design Strategies Targeting Biopharmaceuticals to the Cytoplasm and Nucleus. *Curr Pharm Des*.
- Evans, L., Mitchison, T., & Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *The Journal of Cell Biology*, 100(4):1185-1191.
- Farhood, H., Serbina, N., & Huang, L. (1995). The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1235(95), 289-295.
- Fasbender, A., Zabner, J., Zeiher, B., & Welsh, M. (1997). A low rate of cell proliferation and reduced DNA uptake limit cationic lipid-mediated gene transfer to primary cultures of ciliated human airway epithelia. *Gene Therapy*, 4(11):1173-1180.
- Fay, N., & Panté, N. (2015). Nuclear entry of DNA viruses. *Frontiers in Microbiology*.
- Feldherr, C., & Akin, D. (1990). The permeability of the nuclear envelope in dividing and nondividing cell cultures. *The journal of cell biology*, 111(1):1-8.
- Felsenfeld, G., Davies, D., & Rich, A. (1957). Formation of a three-stranded polynucleotide molecule. *Journal of the american chemical society*, 79(8), 2023-2024.
- Ferkol, T. W. (2019). Prevention of cystic fibrosis: The beginning of the end? *Science translational medicine*.
- Ferrari, A., Pellegrini, V., Arcangeli, C., Fittipaldi, A., Giacca, M., & Beltram, F. (2003). Caveolae-mediated internalization of extracellular HIV-1 tat fusion proteins visualized in real time. *Molecular Therapy*, 8(2), 284-294.
- Finkel, R., Flanigan, K., Wong, B., Bönnemann, C., Sampson, J., Sweeney, H., . . . Peltz, S. (2013). Phase 2a study of Ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE*, 12, e81302.

- Fisher, A., Hacein-Bey-Abina, S., & Cavazzana-Calvo, M. (2004). Thérapie génique du déficit immunitaire combiné lié à l'X: efficacité et complications. *Médecine/Sciences*, 20:115-117.
- Flatt, J., & Butcher, S. (2019). Adenovirus flow in host cell networks. *Open Biology*, 9:190012.
- Fletcher, S., Honeyman, K., Fall, A., Harding, P., Johnsen, R., & Wilton, S. (2006). Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of morpholino antisense oligonucleotide. *The Journal of Gene Medicine*, 8(2):207-216.
- Florin, L., Becker, K., Lambert, C., Nowak, T., Sapp, C., Strand, D., . . . Sapp, M. (2006). Identification of a dynein interacting domain in the papillomavirus minor capsid protein L2. *Journal of virology*, 80(13):6691-6696.
- Flotte, T., Zeitlin, P., Reynolds, T., Heald, A., Pedersen, P., Beck, S., . . . Guggino, W. (2003). Phase I of intranasal and endobronchial administration of a recombinant adeno-associated virus serotype 2 (rAAV2)-CFTR vector in adult cystic fibrosis patients: a two-part clinical study. *Human Gene Therapy*, 14(11):1079-1088.
- Forbes, D., Travesa, A., Nord, M., & Bernis, C. (2015). Nuclear transport factors: Global regulation of mitosis. *Current Opinion Cell Biology*, 35:78-90.
- Forrest, M., Meister, G., Koerber, J., & Pack, D. (2004). Partial acetylation of polyethylenimine enhances in vitro gene delivery. *Pharmaceutical Research*, 21(2):365-371.
- Friedrich, O., von Wegner, F., Chamberlain, J., Fink, R., & Rohrbach, P. (2008). L-Type Ca²⁺ channel function is linked to dystrophin expression in mammalian muscle. *PLoS ONE*, 3, e1762.
- Frigeri, A., Nicchia, G. P., Balena, R., Nico, B., & Svelto, M. (2004). Aquaporins in skeletal muscle: reassessment of the functional role of aquaporin-4. *The FASEB Journal*, 18(7):905-907.
- Funhoff, A., van Nostrum, C., Lok, M., Fretz, M., Crommelin, D., & Hennink, W. (2004). Poly(3-guanidinopropyl methacrylate): a novel cationic polymer for gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 15(6):1212-1220.
- Gabolde, M., Hubert, D., Guilloud-Bataille, M., Lenaerts, C., Feingold, J., & Besmond, C. (2001). The mannose bonding lectin gene influences the severity of chronic liver disease in cystic fibrosis. *Journal of Medical Genetics*, 38: 310-311.
- Gao, J., Hussain, R., & Weng, C. (2020). Voretigene Neparvovec in retinal diseases: a review of the current clinical evidence. *Clinical Ophthalmology*, 14:3855-3869.
- Gao, J., Mese, K., Bunz, O., & Ehrhardt, A. (2019). State-of-the-art human adenovirus vectorology for therapeutic approaches. *FEBS Letters*.
- Gao, Q., & McNally, E. (2015). The dystrophin complex: structure, function and implications for therapy. *Comprehensive Physiology*, 5(3): 1223-1239.
- Gao, X., & Huang, L. (1996). Potentiation of cationic liposome-mediated gene delivery by polycations. *Biochemistry*, 35(3), 1027-1036.
- Garber, K. (2018). Alnylam launches era of RNAi drugs. *Nature Biotechnology*, 36(9):777-778.
- Gaskin, K., Waters, D., Howman-Giles, R., De silva, M., Earl, J., Martin, H., . . . Dorney, S. (1988). Liver disease and common-bile-duct stenosis in cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 318(6), 340-346.

- Gehl, J. (2003). Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiologica Scandinavica*, 177(4):437-447.
- George, L., Sullivan, S., Giermasz, A., Rasko, J., Samelson-Jones, B., Ducore, J., . . . High, K. (2017). Hemophilia B gene therapy with a high-specific-activity factor IX variant. *The New England journal of medicine*, 377(23):2215-2227.
- Ghosh, M., Ghosh, K., Dahl, O., & Cohen, J. (1993). Evaluation of some properties of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide for antisense application. *Nucleic Acids Research*, 21(24), 5761-5766.
- Gill, S., Schroer, T., Szilak, I., Steuer, E., Sheetz, M., & Cleveland, D. (1991). Dynactin, a conserved, ubiquitously expressed component of an activator of vesicle motility mediated by cytoplasmic dynein. *The Journal of Cell Biology*, 115(6):1639-1650.
- Giovannangeli, C., & Hélène, C. (1997). Progress in developments of triplex-based strategies. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 7(4):413-421.
- Giovannangeli, C., Perrouault, L., Escudé, C., Thuong, N., & Hélène, C. (1996). Specific inhibition of in vitro transcription elongation by triplex-forming oligonucleotide-intercalator conjugates targeted to HIV proviral DNA. *Biochemistry*, 35(32):10539-10548.
- Godbey, W., & Mikos, A. (2001). Recent progress in gene delivery using non-viral transfer complexes. *Journal of controlled release*, 72(1-3):115-125.
- Goemans, N., Tulinius, M., van den Akker, J., Burm, B., Ekhardt, P., Heuvelmans, N., . . . Aartsma-Rus, A. (2011). Systemic administration of PR051 in Duchenne's muscular dystrophy. *The New England Journal of Medicine*, 364(16):1513-1522.
- Goemans, N., Tulinius, M., van den Hauwe, M., Kroksmark, A.-K., Buyse, G., Wilson, R., . . . Campion, G. (2016). Long-term efficacy, safety, and pharmacokinetics of Drisapersen in Duchenne Muscular Dystrophy: results from an Open-label extension study. *PLoS One*, 11(9):e0161955.
- Gomez, J.-P., Tresset, G., Pichon, C., & Midoux, P. (2019). Improved histidinylated IPEI polyplexes for skeletal muscle cells transfection. *International Journal of Pharmaceutics*, 58-67.
- Gonçalves, C., Ardourel, M.-Y., Decoville, M., Breuzard, G., Midoux, P., Hartmann, B., & Pichon, C. (2009). An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *The journal of gene medicine*, 11: 401-411.
- Gonçalves, C., Mennesson, E., Fuchs, R., Gorvel, J.-P., Midoux, P., & Pichon, C. (2004). Macropinocytosis of polyplexes and recycling of plasmid via the clathrin-dependent pathway impair the transfection efficiency of human hepatocarcinoma cells. *Molecular Therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 10(2):373-385.
- Goula, D., Remy, J., Erbacher, P., Wasowicz, M., Levi, G., Abdallah, B., & Demeneix, B. (1998). Size, diffusibility and transfection performance of linear PEI/DNA complexes in the mouse central nervous system. *Gene Therapy*, 5(5):712-717.
- Govindasamy, L., Padron, E., McKenna, R., Muzyczka, N., Kaludov, N., Chiorini, J., & Agbandje-McKenna, M. (2006). Structurally mapping the diverse phenotype of adeno-associated virus serotype 4. *Journal of Virology*, 80(23):11556-11570.
- Graybill, P., & Davalos, R. (2020). Cytoskeletal disruption after electroporation and its significance to pulse electric field therapies. *Cancers*, 12(5):1132.

- Greber, U., & Fornerod, M. (2004). Nuclear import in viral infections. *Current topics in microbiology and immunology*, 285:109-138.
- Griesenbach, U., Inoue, M., Meng, C., Farley, R., Chan, M., Newman, N., . . . Alton, E. (2012). Assessment of F/HN-pseudotyped lentivirus as a clinically relevant vector for lung gene therapy. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(9):846-856.
- Griffith, F. (1928). The significance of pneumococcal types. *The Journal of hygiene*, 27:113-159.
- Gruenberg, J., & van der Goot, F. (2006). Mechanisms of pathogen entry through the endosomal compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(7):495-504.
- Gruner, S., Tate, M., Kirk, G., So, T., Turner, D., & Keane, D. (1988). X-ray diffraction study of the polymorphic behavior of the dioleoylphosphatidylethanolamine. *Biochemistry*, 27(8), 2853-2866.
- Grünweller, A., & Hartmann, R. (2007). Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *Biodrugs*, 21(4), 235-243.
- Guedan, S., Calderon, H., Posey Jr, A., & Maus, M. (2018). Engineering and design of chimeric antigen receptors. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, 12:145-156.
- Hacia, J., Wold, B., & Dervan, P. (1994). Phosphorothioate oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Biochemistry*, 33(18), 5367-5369.
- Hadri, L., Bobe, R., Kawase, Y., Ladage, D., Ishikawa, K., Atassi, F., . . . Hajjar, R. (2010). SERCA2a gene transfer enhances eNOS expression and activity in endothelial cells. *Molecular Therapy*, 18(7):1284-1292.
- Hager, S., Fittler, F., Wagner, E., & Bros, M. (2020). Nucleic acid-based approaches for tumor therapy. *Cells*, 9(9):2061.
- Hagstrom, J., Hegge, J., Zhang, G., Noble, M., Budker, V., Lewis, D., . . . Wolff, J. (2004). A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Molecular therapy*, 10(2):386-398.
- Hama, S., Akita, H., Iida, S., Mizuguchi, H., & Harashima, H. (2007). Quantitative and mechanism-based investigation of post-nuclear delivery events between adenovirus and lipoplex. *Nucleic Acids Research*, 35(5):1533-1543.
- Hama, S., Akita, H., Ito, R., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., & Harashima, H. (2006). Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. *Molecular Therapy*, 13(4):786-794.
- Hama, S., Akita, H., Ito, R., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., & Harashima, H. (2006). Quantitative comparison of intracellular trafficking and nuclear transcription between adenoviral and lipoplex systems. *Molecular Therapy*, 13(4):786-794.
- Hansen, C., & Nichols, B. (2009). Molecular mechanisms of clathrin-independent endocytosis. *Journal of Cell Science*, 122(11):1713-1721.
- Haque, A., Dewerth, A., Antony, J., Riethmüller, J., Schweizer, G., Weinmann, P., . . . Kormann, M. (2018). Chemically modified hCFTR mRNAs recuperate lung function in a mouse model of cystic fibrosis. *Scientific Reports*, 8(1):16776.
- Harris, J., Werling, D., Hope, J., Taylor, G., & Howard, C. (2002). Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions. *Trends in Immunology*, 23(3): 158-164.

- Harvey, B.-G., Leopold, P., Hackett, N., Grasso, T., Williams, P., Tucker, A., . . . Crystal, R. (1999). Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *The Journal of clinical investigation*, 104(9):1245-1255.
- Hastie, E., & Samulski, R. (2015). Adeno-associated virus at 50: a golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success - a personal perspective. *Human Gene Therapy*, 26:257-265.
- Hay, J., McElvaney, N., Herena, J., & Crystal, R. (1995). Modification of nasal epithelial potential differences of individuals with cystic fibrosis consequent to local administration of a normal CFTR cDNA adenovirus gene transfer vector. *Human Gene Therapy*, 6(11):1487-1496.
- Hébert, E. (2003). Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy? *Biology of the cell*, 95(2):59-68.
- Heinzinger, N., Bukrinsky, M., Haggerty, S., Ragland, A., Kewalramani, V., Lee, M.-A., . . . Emerman, M. (1994). The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(15):7311-7315.
- Hertoghs, K., Ellis, J., & Catchpole, I. (2003). Use a locked nucleic acid oligonucleotides to add a functionality to plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 31, 5817-5830.
- Herweijer, H., & Wolff, J. (2007). Gene therapy progress and prospects: hydrodynamic gene delivery. *Gene Therapy*, 14:99-107.
- Hirn, C., Shapovalov, G., Petermann, O., Roulet, E., & Ruegg, U. (2008). Nav1.4 deregulation in dystrophic skeletal muscle leads to Na⁺ overload and enhanced cell death. *The Journal of General Physiology*, 132(2):199-208.
- Hoestra, D., Rejman, J., Wasungu, L., Shi, F., & Zuhorn, I. (2007). Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochemical Society Transactions*, 35(1):68-71.
- Hoffman, E., Brown, R., & Kunkel, L. (1987). Dystrophin: The protein product of the duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51(6): 919-928.
- Hogle, J. (2002). Poliovirus cell entry: common structural themes in viral cell entry pathways. *Annual Review of Microbiology*, 56(1):677-702.
- Hoogsteen, K. (1959). The structure of crystals containing a hydrogen-bonded complex of 1-methylthymine and 9-methyladenine. *Acta Crystallographica*, 12(10), 822-823.
- Höök, P., & Vallee, R. (2006). The dynein family at a glance. *Journal of Cell Science*, 119:4369-4371.
- Horton, T. M., Ranheim, T. S., Aquino, L., Kusher, D. I., Saha, S. K., Ware, C. F., . . . Gooding, L. R. (1991). Adenovirus E3 14.7K protein functions in the absence of other adenovirus proteins to protect transfected cells from tumor necrosis factor cytotoxicity. *Journal of virology*, 65(5), 2629-2639.
- Howarth, J., Lee, Y., & Uney, J. (2010). Using viral vectors as gene transfer tools (Cell biology and toxicology special issue: ETCS-UK 1 day meeting on genetic manipulation of cells). *Cell Biology and Toxicology*, 26:1-20.
- Hoy, S. (2019). Elexacaftor/Ivacaftor/Tezacaftor: first approval. *Drugs*.
- Huang, H., Chen, F.-Y., & Lee, M.-t. (2004). Molecular mechanism of peptide-induced pores in membranes. *Physical Review Letters*, 92(19).

- Huang, J., Gao, J., Lv, X., Li, G., Hao, D., Yao, X., . . . Wang, R. (2010). Target gene therapy of glioma: overexpression of BAX gene under the control of both tissue-specific promoter and hypoxia-inducible element. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 42(4):274-280.
- Huang, Q.-D., Ren, J., Ou, W.-J., Fu, Y., Cai, M.-Q., Zhang, J., . . . Yu, X.-Q. (2012). Cationic lipids containing cyclen and ammonium moieties as gene delivery vectors. *Chemical Biology & Drug Design*, 79(6):879-887.
- Huh, W., Gomez-Navarro, J., Arafat, W., Xiang, J., Mahasreshti, P., Alvarez, R., . . . Curiel, D. (2001). Bax-induced apoptosis as a novel gene therapy approach for carcinoma of the cervix. *Gynecologic Oncology*, 83(2):370-377.
- Hulme, A., Perez, O., & Hope, T. (2011). COmplementary assays reveal a relationship between HIV-1 uncoating and reverse transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(24):9975-9980.
- Hutter, O., Burton, F., & Bovell, D. (1991). Mechanical properties of normal and mdx mouse sarcolemma: bearing on function of dystrophin. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 12(6):585-589.
- Hwu, W.-L., Muramatsu, S.-i., Tseng, S.-H., Tzen, K.-Y., Lee, N.-C., Chien, Y.-H., . . . Wu, R.-M. (2012). Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Science translational medicine*, 4(134):134ra61.
- Hyde, S., Pringle, I., Abdullah, S., Lawton, A., Davies, L., Varathalingam, A., . . . Gill, D. (2008). CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nature Biotechnology*, 26(5):549-551.
- Ibarra, A., & Hetzer, M. (2015). Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes & development*, 29(4), 337-349.
- Ibraghimov-Beskrovnya, O., Ervasti, J., Leveille, C., Slaughter, C., Sernett, S., & Campbell, K. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355(6362): 696-702.
- Ikemoto, M., Fukada, S.-i., Uezumi, A., Masuda, S., Miyoshi, H., Yamamoto, H., . . . Takeda, S. (2007). Autologous transplantation of SM/C-2.6+ satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice. *Molecular therapy*, 15(12): 2178-2185.
- Illesley, J., Sudol, M., & Winder, S. (2002). The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cellular Signalling*, 14(3):183-189.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., & Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169(12):5429-5433.
- Itaka, K., Osada, K., Morii, K., Kim, P., Yun, S.-H., & Kataoka, K. (2010). Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *Journal of Controlled Release*, 143:112-119.
- Iwamura, K., Kato, T., Miyahara, Y., Naota, H., Mineno, J., & Shiku, H. (2011). siRNA-mediated silencing of PD-1 ligands enhances tumor-specific human T-cell effector functions. *Gene Therapy*, 19(10):959-966.
- Iwata, Y., Arai, Y., Komamura, K., Miyatake, K., & Shigekawa, M. (2003). A novel mechanism of myocyte degeneration involving the Ca²⁺-permeable growth factor-regulated channel. *The Journal of Cell Biology*, 161(5): 957-967.

- Jani, A., Lochmüller, H., Acsadi, G., Simoneau, M., Huard, J., Garnier, A., . . . Massie, B. (1997). Generation, validation, and large scale production of adeviral recombinants with large size inserts such as a 6.3 kb human dystrophin cDNA. *Journal of Virological Methofs*, 64(2):111-124.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3):491-511.
- Ji, H., & Smith, L. (1993). Rapid purification of double-stranded DNA by triple-helix-mediated affinity capture. *Analytical chemistry*, 65(10), 1323-1328.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096):816-821.
- Johnson, L., Morgan, R., Dudley, M., Cassard, L., Yang, J., Hughes, M., . . . Rosenberg, S. (2009). Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood*, 114(3): 535-546.
- Jones, A. (2007). Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. *Journal of Cell and Molecular Medicine*, 11(4):670-684.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tüting, T., Thurner-Schuler, B., Stuge, T., Paragnik, L., . . . Enk, A. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *International journal of cancer*, 93(2):243-251.
- Joseph, P., O'Sullivan, B., Lapey, A., Dorkin, H., Oren, J., Balfour, R., . . . Meeker, D. (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. methods, safety and clinical implications. *Human Gene Therapy*, 12(11):1369-1382.
- Kadlecova, Z., Rajendra, Y., Matasci, M., Hacker, D., Baldi, L., Wurm, F. M., & Klok, H.-A. (2012). Hyperbranched polylysine: a versatile, biodegradable transfection agent for the production of recombinant proteins by transient gene expression and the transfection of primary cells. *Macromolecular Bioscience*, 12(6):794-804.
- Kafri, T., Blömer, U., Peterson, D., Gage, F., & Verma, I. (1997). Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nature Genetics*, 17(3):314-317.
- Kakimoto, S., Hamada, T., Komatsu, Y., Takagi, M., Tanabe, T., Azuma, H., . . . Nagasaki, T. (2009). The conjugation of diphtheria toxin T domain to poly(ethylenimine) based vectors for enhanced endosomal escape during gene transfection. *Biomaterials*, 30(3):402-408.
- Kaneda, I. U. (1989). Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Science*, 243: 375-378.
- Kaneda, Y., Iwai, K., & Uchida, T. (1989). Increased expression of DNA cointroduced ith nuclear protein in adult rat liver. *Science*, 243(4889),375-378.
- Kaneda, Y., Morishita, Y., & Tomita, N. (1995). Increased expression of DNA cointroduced with nuclear protein in adult rat liver. *Journal of Molecular Medicine*, 73(6).
- Kang, N.-H., Hwang, K.-A., Yi, B.-R., Lee, H., Jeung, E.-B., Kim, S., & Choi, K.-C. (2012). Human amniotic fluid-derived stem cells expressing cytosine deaminase and thymidine kinase inhibits the growth of breast cancer cells in cellular and xenograft mouse models. *Cancer Gene Therapy*, 19(6):412-419.

- Kanthou, C., Kranjc, S., Sersa, G., Tozer, G., Zupanic, A., & Cemazar, M. (2006). The endothelial cytoskeleton as a target of electroporation-based therapies. *Molecular cancer therapeutics*, 5(12):3145-3152.
- Kantoff, P., Schuetz, T., Blumenstein, B., Glode, L., Bilhartz, D., Wyand, M., . . . Godfrey, W. (2010). Overall survival analysis of phase II randomized controlled trial of a Poxiviral-based PSA-targeted immunotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Journal of clinical oncology*, 28(7):1099-1105.
- Kaplan, E., Shwachman, H., Perlmutter, A., Rule, A., Khaw, K.-T., & Holsclaw, D. (1968). Reproductive failure in males with cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 279(2), 65-69.
- Kaufmann, K., Büning, H., Galy, A., Schambach, A., & Grez, M. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO Molecular Medicine*, 1642-1661.
- Keller, M., Harbottle, R., Perouzel, E., Colin, M., Shah, I., Rahim, A., . . . Miller, A. (2003). Nuclear localization sequence templated nonviral gene delivery vectors: investigation of intracellular trafficking events of LMD and LD vectors systems. *ChemBioChem*, 4(4):286-298.
- Kerem, B.-S., Rommens, J., Buchanan, J., Markiewicz, D., Cox, T., Chakravarti, A., . . . Tsui, L.-C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, 245(4922), 1073-1080.
- Kerstin B. Kaufmann, H. B. (2013). Gene therapy on the move. *EMBO Molecular Medicine*, 1642-1661.
- Khalil, I., Kogure, K., Akita, H., & Harashima, H. (2006). Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacological Reviews*, 58(1):32-45.
- Kichler A, L. C. (2001). Polyethyleimine-mediated gene delivery: a mechanistic study. *Journal of Gene Medicine*, 2: 135-144.
- Kichler, A., Mechtler, K., Behr, J.-P., & Wagner, E. (1997). Influence of membrane-active peptides on lipospermine/DNA complex mediated gene transfer. *Bioconjugate Chemistry*, 8(2):213-221.
- Kim, A., Boylan, N., Suk, J., Lai, S., & Hanes, J. (2012). Non-degradative intracellular trafficking of highly compacted polymeric DNA nanoparticles. *Journal of controlled release*, 158(1):102-107.
- Kim, T., Ihm, J., Choi, Y., Nah, J., & Cho, C. (2003). Efficient gene delivery by urocanic acid-modified chitosan. *Journal of Controlled release*, 93(3):389-402.
- Kim, Y.-G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3):1156-1160.
- Kim, Y.-G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domaine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(3), 1156-1160.
- King, S. (2000). The dynein microtubule motor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1496(1), 60-75.
- King, S., & Schroer, T. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Cell Biology*, 2(1):20-24.
- King, S., & Schroer, T. (2000). Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Cell Biology*, 2(1):20-24.

- Kirchenbuechler, I., Kirchenbuechler, D., & Elbaum, M. (2016). Correlation between cationic lipid-based transfection and cell division. *Experimental cell research*, 345(1):1-5.
- Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annual Review of biochemistry*, 79(1):213-231.
- Knockenbauer, K., & Schwartz, T. (2016). The nuclear pore complex as a flexible and dynamic gate. *Cell*, 164(6), 1162-1171.
- Knowles, M., Hohneker, K., Zhou, Z., Olsen, J., Noah, T., Hu, P.-C., . . . Boucher, R. (1995). A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene transfe in the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 333(13):823-831.
- Kochenderfer, J., Feldman, S., Zhao, Y., Xu, H., Black, M., Morgan, R., . . . Rosenberg, S. (2009). Construction and pre-clinical evaluation of an anti-CD19 chimeric antigen receptor. *Journal of Immunotherapy*, 32(7):689-702.
- Koenig, M., Hoffman, E., Bertelson, C., Monaco, A., Feener, C., & Kunkel, L. (1987). Complete cloning of the duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50(3), 509-517.
- Kohn, D., Booth, C., Kang, E., Pai, S.-Y., Shaw, K., Santilli, G., . . . the Net4CGD consortium. (2020). Lentiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. *Nature Medicine*.
- Kohn, D., Booth, C., Kang, E., Pai, S.-Y., Shaw, K., Santilli, G., . . . the Net4CGD consortium. (2020). LEntiviral gene therapy for X-linked chronic granulomatous disease. *Nature Medicine*.
- Kojima, K., Nakajima, T., Taga, N., Miyauchi, A., Kato, M., Matsumoto, A., . . . Yamagata, T. (2019). Gene therapy improves motor and mental function of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain: a journal of neurology*, 42(2):322-333.
- Kolonko, A., Efig, J., Gonzalez-Espinosa, Y., Bangel-Ruland, N., van Driessche, W., Goycoolea, F., & Weber, W.-M. (2020). Capsaicin-loaded chitosan nanocapsules for wt-CFTR-mRNA delivery to a cystic fibrosis cell line. *Biomedicines*, 8(9):364.
- Komaki, H., Nagata, T., Saito, T., Masuda, S., Takeshita, E., Sasaki, M., . . . Aoki, Y. (2018). Systemic administration of the antisense oligonucleotide NS-065/NCNP-01 for skipping of exon 53 in patients with Duchenne muscular dystrophy. *Science Translational Medecine*, 10(437): eaan0713.
- Koo, T., Popplewell, L., Athanasopoulos, T., & Dickson, G. (2014). Triple trans-splicing adeno-associated virus vectors capable of transferring the coding sequence for full-length sytrophin protein into dystrophic mice. *Human Gene Therapy*, 25(2):98-108.
- Koshkin, A., Singh, S., Nielsen, P., Rajwanshi, V., Kumar, R., Meldgaard, M., . . . Wengel, J. (1998). LNA (locked nucleic acids): synthesis of adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, (54), 3607-3630.
- Kronenberg, S., Böttcher, B., von der Lieth, C., Bleker, S., & Kleinschmidt, J. (2005). A conformational change on the adeno-associated virus type 2 cpasid leads to the exposure of hidden VP1 N termini. *Journal of virology*, 79(9):5296-5303.
- Kruschinski, A., Moosmann, A., Poschke, I., Norell, H., Chmielewski, M., Seliger, B., . . . Charo, J. (2008). Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(45):17481-17486.

- Kumar, A., & Borier, A. (2003). Mechanical stress activates the nuclear factor- κ B pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *The FASEB Journal*, 17(3):386-396.
- Kural, C., Kim, H., Syed, S., Goshima, G., Gelfand, V., & Selvin, P. (2005). Kinesin and dynein move a peroxisome in vivo: a tug-of-war or coordinated movement? *Science*, 308(5727):1469-1472.
- Kutzler, M., & Weiner, D. (2008). DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics*, 9(10):776-788.
- Lacoste, J., François, J.-C., & Hélène, C. (1997). Triple helix formation with purine-rich phosphorothioate-containing oligonucleotides covalently linked to an acridine derivative. *Nucleic acids research*, 25(10), 1991-1998.
- Lacroix, L., Arimondo, P., Takasugi, M., Hélène, C., & Mergny, J.-L. (2000). Pyrimidine morpholino oligonucleotides form a stable triple helix in the absence of magnesium ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270(2), 363-369.
- Lam, J., Chow, M., Zhang, Y., & Leung, S. (2015). siRNA versus miRNA as therapeutics for gene silencing. *Molecular Therapy - Nucleic acids*, 4(9), e252.
- Lamaze, C., Fujimoto, L., Yin, H., & Schmid, S. (1997). The actin cytoskeleton is required for receptor-mediated endocytosis in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(33):20332-20335.
- Lassi, K., & Dawson, N. (2010). Update on castrate-resistant prostate cancer: 2010. *Current Opinion in Oncology*, 22(3):263-267.
- Le Doan, T., Perrouault, L., Praseuth, D., Habhou, N., Decout, J.-L., Thuong, N., . . . Helene, C. (1987). Sequence-specific recognition, photocrosslinking and cleavage of the DNA double helix by an oligo-[a]-thymidylate covalently linked to an azidoproflavine derivative. *Nucleic acids research*, (15), 7749-7760.
- Le Guen, Y., Le Gall, T., Midoux, P., Guégan, P., Braun, S., & Montier, T. (2020). Gene transfer to skeletal muscle using hydrodynamic limb vein injection: current applications, hurdles and possible optimizations. *The journal of gene medicine*, (22)2:e3150.
- Le Guiner, C., Montus, M., Servais, L., Cherel, Y., François, V., Thibaud, J.-L., . . . Voit, T. (2014). Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *The American Society of Gene and Cell Therapy*, 22(11):1923-1935.
- Le Guiner, C., Servais, L., Montus, M., Larcher, T., Fraysse, B., Moullec, S., . . . Dickson, G. (2017). Long term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Nature Communications*, 8:16105.
- Le Rumeur, E., Fichou, Y., Pottier, S., Gaboriau, F., Rondeau-Mouro, C., Vincent, M., . . . Bondon, A. (2002). Interaction of dystrophin Rod domain with membrane phospholipids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8):5993-6001.
- Le, P., & Nabi, I. (2003). Distinct caveolae-mediated endocytic pathways target the Golgi apparatus and the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Science*, 116(6):1059-1071.

- Lechardeur, D., Sohn, K.-J., Haardt, M., Joshi, P., Graham, R., Beatty, B., . . . Lukacs, G. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Therapy*, 6(4):482-497.
- Lechardeur, D., Sohn, K.-J., Joshi, P., Monck, M., Graham, R., Beatty, B., . . . Lukacs, G. (1999). Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer. *Gene Therapy*, 6:482-497.
- Lee, J., Woodsworth, M., Latimer, L., & Morgan, R. (1984). Poly(pyrimidine)*poly(purine) synthetic DNAs containing 5-methylcytosine form stable triplexes at neutral pH. *Nucleic acids research*, 12, 6603-6614.
- Lee, R., & Huang, L. (1996). Anionic liposome-entrapped polylysine-condensed DNA for tumor cell-specific gene transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 271(14):8481-8487.
- Leinonen, H., Ruotsalainen, A.-K., Määttä, A.-M., Laitinen, H., Kuosmanen, S., Kansanen, E., . . . Levenon, A.-I. (2012). Oxidative stress-regulated lentiviral tj/GCV gene therapy for lung cancer treatment. *Cancer Research*, 72(23):6227-6235.
- Leong, K., Mao, H.-Q., Truong-Le, V., Roy, K., Walsh, S., & August, J. (1998). DNA-polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *Journal of Controlled Release*, 53(1-3):183-193.
- Leopold, P., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K., Rodriguez-Boulan, E., & Crystal, R. (2000). Dynein- and Microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Human Gene Therapy*, 11(1),151-165.
- Levene, P. (1919). The structure of yeast nucleic acid. IV ammonia hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 40, 415-424.
- Levy, O., Ptacin, J., Pease, P., Gore, J., Eisen, M., Bustamante, C., & Cozzarelli, N. (2005). Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the Escherichia coli FtsK translocase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(49), 17618-17623.
- Li, C., & Samulski, R. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*.
- Li, S., & Huang, L. (1997). In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Therapy*, 4(9), 891-900.
- Li, S., Kimura, B., Reyes, M., Angello, J., Welikson, R., Hauschka, S., & Chamberlain, J. (2005). Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Therapy*, 12(14):1099-1108.
- Li, S., Rizzo, M., Chattacharya, S., & Huang, L. (1998). Characterization of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes for intravenous gene delivery. *Gene Therapy*, 5(7):930-937.
- Li, X., Eastman, E., Schwartz, R., & Draghia-Akli, R. (1999). Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nature Biotechnology*, 17(3):241-245.
- Li, X., Marani, M., Yu, J., Nan, B., Roth, J., Kawaga, S., . . . Marcelli, M. (2001). Adenovirus-mediated Bax overexpression for the induction of therapeutic apoptosis in prostate cancer. *Cancer Research*, 61:186-191.

- Li, Y., Kang, J., & Horwitz, M. (1997). Interaction of an adenovirus 14.7 kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytolysis with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *Journal of virology*, 71(2), 1576-1582.
- Li, Y., Kang, J., & Horwitz, M. (1997). Interaction of an Adenovirus 14.7 kilodalton protein inhibitor of tumor necrosis factor alpha cytolysis with a new member of the GTPase superfamily of signal transducers. *Journal of virology*, 71(2):1576-1582.
- Lietchi-Gallati, S., Koenig, M., Kunkel, L., Frey, D., Boltshauser, E., Schneider, V., . . . Moser, H. (1989). Molecular deletion patterns in Duchenne and Becker type muscular dystrophy. *Human Genetics*, 81(4):343-348.
- Lin, Q., Chen, J., Zhang, Z., & Zheng, G. (2014). Lipid-based nanoparticles in the systemic delivery of siRNA. *Nanomedicine*, 9(1):105-120.
- Lion, T. (2014). Adenovirus infections in immunocompetent and immunocomprised patients. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3):441-462.
- Liu, X., Wang, S., Guo, X., Wei, F., Yin, J., Zang, Y., . . . Chen, D. (2016). Exogenous p53 and ASPP2 expression enhances rAdV-TK/GCV-induced death in hepatocellular carcinoma cells lacking functional p53. *Oncotarget*, 7(14):18896-18905.
- Lo, S., & Wang, S. (2008). An endosomolytic Tat peptide produced by incorporation of histidine and cysteine residues as a nonviral vector for DNA transfection. *Biomaterials*, 29(15):2408-2414.
- Long, C., Amoasii, L., Mireault, A., McAnally, J., Li, H., Sanchez-Ortiz, E., . . . Olson, E. (2016). Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in mouse model of muscular dystrophy. *Science*, 351(6271): 400-403.
- Lopez, C., Arivett, B., Actis, L., & Tolmasky, M. (2015). Inhibition of AAC(6')-Ib-mediated resistance to amikacin in *Acinetobacter baumannii* by an antisense peptide-conjugated 2',4'-Bridged nucleic acid-NC-DNA hybrid oligomer. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59, 5798-5803.
- Lostal, W., Kodippili, K., Yue, Y., & Duan, D. (2014). Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors. *Human Gene Therapy*, 25:552-562.
- Lowe, C., May, C., & Reed, S. (1949). Fibrosis of the pancreas in infants and children. *American journal of diseases of children*, 78(3), 349-374.
- Lu, Q., Morris, G., Wilton, S., Ly, T., Artem'yeva, O., Strong, P., & Partridge, T. (2000). Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *The Journal of Cell Biology*, 148(5):985-996.
- Ludtke, J., Zhang, G., Sebestyen, M., & Wolff, J. (1999). A nuclear localization signal can enhance both the nuclear import and expression of 1 kb DNA. *Journal of Cell Science*, 2033-2041.
- Lukacs, G., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., & Verkman, A. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(3):1625-1629.
- Lukacs, G., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., & Verkman, A. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *Journal of Biological Chemistry*, 275(3):1625-1629.
- Lukashok, S., Tarassishin, L., Li, Y., & Horwitz, M. (2000). An adenovirus inhibitor of tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis complexes with dynein and small GTPase. *Journal of virology*, 74(10), 4705-4709.

- Lwin, S., Syed, F., Di, W.-L., Kadiyirire, T., Liu, L., Guy, A., . . . McGrath, J. (2019). Safety and early efficacy outcomes for lentiviral fibroblast gene therapy in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *JCI insight*, 4(11):e126243.
- MacNeal, R., & Purich, D. (1978). Stoichiometry and role of GTP hydrolysis in bovine neurotubule assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, 253(13):4683-4687.
- Maguire, A., Russell, S., Wellman, J., Chung, D., Yu, Z.-F., Tillman, A., . . . Bennett, J. (2019). Efficacy, safety, and durability of voretigene neparvovec-rzyl in RPE65 mutation-associated inherited retinal dystrophy: results of phase 1 and 3 trials. *Ophthalmology*, 126(9):1273-1285.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., . . . Mendell, J. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne Muscular dystrophy. *Annals of Neurology*, 67(6):771-780.
- Manning, K., Rao, A., Castro, M., & Cooper, T. (2017). BNA(NC) gapmers revert splicing and reduce RNA foci with low toxicity in myotonic dystrophy cells. *ACS Chemical Biology*, 12, 2503-2509.
- Mao, H.-Q., Roy, K., Truong-Le, V., Janes, K., Lin, K., Wang, Y., . . . Leong, K. (2001). Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 70(3):399-421.
- Marquez Loza, L., Yuen, E., & McCray Jr., P. (2019). Lentiviral vectors for the treatment and prévention of cystic fibrosis lung disease. *Genes*, 10(3):218.
- Marsh, M., & Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Advances in Virus Research*, 107-151.
- Martins, F., Sousa, J., Pereira, C., da Cruz e Silva, O., & Rebelo, S. (2020). Nuclear envelope dysfunction and its contribution to the aging process. *Aging Cell*, 00e13143.
- Matsumura, C., Taniguti, A., Pertille, A., Santo Neto, H., & Marques, M. (2011). Stretch-activated calcium channel protein TRPC1 is correlated with the different degrees of the dystrophic phenotype in mdx mice. *The American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 301:1344-1350.
- Mavilio, F., Pellegrini, G., Ferrari, S., Di Nunzio, F., Di Iorio, E., Recchia, A., . . . De Luca, M. (2006). Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells. *Nature Medicine*, 12(12):1397-1402.
- McClements, M., Barnard, A., Singh, M., Charbel Issa, P., Jiang, Z., Radu, R., & MacLaren, R. (2019). An AAV dual vector strategy ameliorates the Stargardt phenotype in adult *Abca4*^{-/-} mice. *Human gene therapy*, 30(5):590-600.
- McKenna, M., Rosewell-Shaw, A., & Suzuki, M. (2020). Modeling the efficiency of oncolytic adenoviruses in vitro and in vivo: current and future perspectives. *Cancers*, 12:619.
- McKenzie, T., Kobinger, G., Louboutin, J.-P., Radu, A., Javazon, E., Sena-Esteves, M., . . . Flake, A. (2005). Transduction of satellite cells after prenatal intramuscular administration of lentiviral vectors. *The Journal of Gene Medicine*, 7(1):50-58.
- McLendon, P., Fichter, K., & Reineke, T. (2010). Poly(glycoamidoamine) vehicles promotes ADNP uptake through multiple routes and efficient gene expression via caveolae-mediated endocytosis. *Molecular Pharmaceutics*, 7(3):738-750.
- McMahon, H., & Boucrot, E. (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(8):517-533.

- Meisel, J., & Gokel, G. (2016). A simplified direct lipid mixing lipoplex preparation: comparison of liposomal-, dimethylsulfoxide- and ethanol-based methods. *Scientific Reports*, 6:27662.
- Melim, C., Jarak, I., Veiga, F., & Figueiras, A. (2020). The potential of micelleplexes as a therapeutic strategy for osteosarcoma disease. *3 Biotech*, 10(4).
- Melis, M., Cau, M., Muntoni, F., Mateddu, A., Galanello, R., Boccone, I., . . . Cao, A. (1998). Elevation of serum creatin kinase as the only manifestation of an intergenic deletion of the dystrophin gene in three unrelated families. *European Journal of Paediatric Neurology*, 2(5): 255-261.
- Mendell, J., Goemans, N., Lowes, L., Alfano, L., Berry, K., Shao, J., . . . Telethon Foundation DMD Italian Network. (2016). Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Annals of neurology*, 79(2):257-271.
- Merienne, N., & Déglon, N. (2015). Approches de gene silencing pour le traitement de la maladie de Huntington. *médecine/sciences*, 31:159-167.
- Mesika, A., Grigoreva, I., Zohar, M., & Reich, Z. (2001). A regulated, NFkB-assisted import of plasmid DNA into mammalian cell nuclei. *Molecular therapy*, 3(5), 653-657.
- Mesika, A., Kiss, V., Brumfeld, V., Ghosh, G., & Reich, Z. (2005). Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Human Gene Therapy*, 16(2):200-208.
- Mettenleiter, T. (2016). Breaching the barrier - The nuclear envelope in virus infection. *Journal of Molecular Biology*, 428(10):1949-1961.
- Mével, M., Neveu, C., Gonçalves, C., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., Jaffrès, P.-A., & Midoux, P. (2008). Novel neutral imidazole-lipophosphoramides for transfection assays. *Chemical communications*, (27):3124-2126.
- Miah, K., Hyde, S., & Gill, D. (2019). Emerging gene therapies for cystic fibrosis. *Expert review of respiratory medicine*, 13(8):709-725.
- Midoux, P., & Monsigny, M. (1999). Gene transfer by histidylated polylysine/ADNp complexes. *Bioconjugate Chemistry*, 10(3) 406-411.
- Midoux, P., Breuzard, G., Gomez, J., & Pichon, C. (2008). Polymer-based gene delivery: a current review on the uptake and intracellular trafficking of polyplexes. *Current Gene Therapy*, 8(5):335-352.
- Midoux, P., Kichler, A., Boutin, V., Maurizot, J.-C., & Monsigny, M. (1998). Membrane permeabilization and efficient gene transfer by peptide containing several histidines. *Bioconjugate Chemistry*, 9(2):260-267.
- Midoux, P., Mayer, R., & Monsigny, M. (1995). Membrane permeabilization by α -helical peptides: a flow cytometry study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1239(2):249-256.
- Midoux, P., Mendes, C., Legrand, A., Raimond, J., Mayer, R., Monsigny, M., & Roche, A. (1993). Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells. *Nucleic Acids Research*, 21(4):871-878.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J.-J., & Jaffrès, P.-A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *British Journal of Pharmacology*, 157:166-178.

- Midoux, P., Pigeon, L., Goncalves, C., & Pichon, C. (2017). Peptides mediating DNA transport on microtubules and their impact on non-viral gene transfer efficiency. *Bioscience Reports*.
- Midoux, P., Pigeon, L., Gonçalves, C., & Pichon, C. (2017). Peptides mediating DNA transport on microtubules and their impact on non-viral gene transfer efficiency. *Bioscience Reports*.
- Midoux, P., Pigeon, L., Gonçalves, C., & Pichon, C. (2017). Peptides mediating DNA transport on microtubules and their impact on non-viral gene transfer efficiency. *Bioscience Reports*.
- Miller, A., & Dean, D. (2008). Cell-specific nuclear import of plasmid DNA in smooth muscle requires tissue-specific transcription factors and DNA sequences. *Gene Therapy*, 15(15):1107-1115.
- Miller, N. (2012). Glybera and the future of gene therapy in the European Union. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(5):419-419.
- Milone, M., & O'Doherty, U. (2018). Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia*, 32:1529-1541.
- Minotti, A., Barlow, S., & Cabral, F. (1991). Resistance to antibiotic drugs in Chinese hamster ovary cells correlates with changes in the level of polymerized tubulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(6):3987-3994.
- Mizrak, A., Bolukbasi, M. F., Ozdener, G. B., Brenner, G. J., Madlener, S., Erkan, E. P., . . . Saydam, O. (2013). Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Molecular Therapy: the Journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(1):101-108.
- Mizunoya, W., Upadhaya, R., Burczynski, F., Wang, G., & Anderson, J. (2011). Nitric oxide donors improve prednisone effects on muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *The American Journal Physiology-Cell Physiology*, 300:1065-1077.
- Monaco, A., Neve, R., Colletti-feener, C., Bertelson, C., Kurnit, D., & Kunkel, L. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323(6089): 646-650.
- Moore, N., Sheppard, C., Barbour, T., & Sakiyama-Elbert, S. (2008). The effect of endosomal escape peptides on in vitro gene delivery of polyethylene glycol-based vehicles. *The Journal of Gene Medicine*, 10(10):1134-1149.
- Morris. (1999). A novel potent strategy for gene delivery using a single peptide vector as carrier. *NUcleic Acids Research*, 27: 3510-3517.
- Morvan, M., & Lanier, L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature Reviews Cancer*, 16(1):7-19.
- Moscou, M., & Bogdanove, A. (2009). A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326(5959):1501-1501.
- Moser, H., & Dervan, P. (1987). Sequence-specific cleavage of double helical DNA by triple helix formation. *Science*, 238(4827), 645-650.
- Moss, R., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P., Clancy, J., . . . Heald, A. (2007). Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Human Gene Therapy*, 18(8):726-732.
- Moss, R., Milla, C., Colombo, J., Accurso, F., Zeitlin, P., Clancy, J., . . . Heald, A. (2007). Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Human Gene Therapy*, 18(8):726-732.

- Moss, R., Rodman, D., Spencer, T., Aitken, M., Zeitlin, P., Waltz, D., . . . Heald, A. (2004). Repeated adeno-associated virus serotype 2 aerosol-mediated cystic fibrosis transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis. *Chest*, 125(2):209-521.
- Movahedi, F., Hu, R., Becker, D., & Xu, C. (2015). Stimuli-responsive liposomes for the delivery of nucleic acid therapeutics. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 11(6):1575-1584.
- Mueller, S., Cao, X., Welker, R., & Wimmer, E. (2002). Interaction of the poliovirus receptor CD155 with the dynein light chain Tctex-1 and its implication for poliovirus pathogenesis. *The journal of biological chemistry*, 277(10):7897-7904.
- Mukonge, F., Dean, D., Hillery, E., Griesenbach, U., & Alton, E. (2003). Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(6), 749-760.
- Munsell, E., Ross, N., & O. Sullivan, M. (2016). Journey to the Center of the Cell: Current Nanocarrier Design Strategies Targeting Biopharmaceuticals to the Cytoplasm and Nucleus. *Curr Pharm Des*, 22(9):1227-1244.
- Munsell, E., Ross, N., & Sullivan, M. (2016). Journey to the Center of the Cell: Current Nanocarrier Design Strategies Targeting Biopharmaceuticals to the Cytoplasm and Nucleus. *Current Pharmaceutical Design*, 22(9):1227-1244.
- Nagasaki, T., Myohoji, T., Tachibana, T., Futaki, S., & Tamagaki, S. (2003). Can nuclear localization signals enhance nuclear localization of plasmid DNA? *Bioconjugate Chemistry*, 14:282-286.
- Nakamura, A. (2017). Moving towards successful exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Journal of Human Genetics*, 62(10):871-876.
- Nakamura, A. (2019). Mutation-Based Therapeutic Strategies for Duchenne Muscular Dystrophy : From Genetic Diagnosis to Therapy. *Journal of Personalized Medicine*.
- Nakamura, A., & Takeda, S. (2009). Exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Neuropathology*, 29(4):494-501.
- Neelapu, S., Locke, F., Bartlett, N., Lekakis, L., Miklos, D., Jacobson, C., . . . Go, W. (2017). Axicabtagene Ciloleucel CAR T-cell therapy in refractory large B-cell lymphoma. *The NEw England Journal of Medicine*, 377(26):2531-2544.
- Nelson, C., Hakim, C., Ousterout, D., Thakore, P., Moreb, E., Castellanos Rivera, R., . . . Gersbach, C. (2016). In vivo genome editing improves muscle function in mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 351(6271):403-407.
- Nemunaitis, J., Nemunaitis, M., Senzer, N., Snitz, P., Bedell, C., Kumar, P., . . . Fakhrai, H. (2009). Phase II trial of Belagenpumatucel-L, a TGF- β 2 antisense gene modified allogenic tumor vaccine in advanced non small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Cancer Gene Therapy*, 16(8):620-624.
- Neves. (1999). Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA. *Cell Biology and Toxicology*, 15: 193-202.
- Neves, C., Byk, G., Scherman, D., & Wils, P. (1999). Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA by covalent triple helix formation. *FEBS Letters*, 453: 41-45.
- Ni, R., Feng, R., & Chau, Y. (2019). Synthetic approaches for nucleic acid delivery: choosing the right carriers. *Life*, 9(59).

- Ni, R., Feng, R., & Chau, Y. (2019). Synthetic approaches for nucleic acid delivery: choosing the right carriers. *Life*, 9(59).
- Ni, R., Feng, R., & Chau, Y. (2019). Synthétique approaches for nucleic acid delivery: choosing the right carriers. *Life*, 9(59).
- Nichols, B. (2002). A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nature Cell Biology*, 4(5):374-378.
- Nichols, B., & Lippincott-Schwartz, J. (2001). Endocytosis without clathrin coats. *Trends in Cell Biology*, 11(10):406-412.
- Nicolas, A., Lucchetti-Miganeh, C., Ben Yaou, R., Kaplan, J., Chelly, J., Leturcq, F., . . . Le Rumeur, E. (2014). *DMD* gene. Récupéré sur eDystrophin: <http://edystrophin.genouest.org/index.php?page=knowledge&box=gene>
- Ohshima, S., Shin, J.-H., Yuasa, K., Nishiyama, A., Kira, J., Okada, T., & Takeda, S. (2009). Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV7 vector into dog skeletal muscle. *Molecular Therapy*, 17(1):73-80.
- Okada, T., & Takeda, S. (2013). Current Challenges and future directions in recombinant AAV-mediated gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Pharmaceuticals*, 6:813-836.
- Ondrej, V., Lukasova, E., Falk, M., & Kozubek, S. (2007). The role of actin and microtubule networks in plasmid DNA intracellular trafficking. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3):657-663.
- Ornaghi, F., Sala, D., Tedeschi, F., Maffia, M., Bazzucchi, M., Morena, F., . . . Gritti, A. (2020). Novel bicistronic lentiviral vectors correct β -Hexosaminidase deficiency in neural and hematopoietic stem cells and progeny: Implications for in vivo and ex vivo gene therapy of GM2 gangliosidosis. *Neurobiology of Disease*, 134:104667.
- Pack, D., Hoffman, A., Pun, S., & Stayton, P. (2005). Design and development of polymers for gene delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(7):581-593.
- Palfi, S., Gurruchaga, J., Ralph, G., Lepetit, H., Lavis, S., Buttery, P., . . . Mitrophanous, K. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: a dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet*, 383(9923):1138-1146.
- Pane, M., Palermo, C., Messina, S., Sansone, V., Bruno, C., Catteruccia, M., . . . Italian EAP Working Group. (2018). An observational study of functional abilities in infants, children, and adults with type 1 SMA. *Neurology*, 91(8):e696-e703.
- Panté, N., & Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Molecular biology of the cell*, 13(2):425-434.
- Parton, R., & Simons, K. (2007). The multiple faces of caveolae. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(3):185-194.
- Paschal, B., Sheptner, H., & Vallee, R. (1987). MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. *The Journal of Cell Biology*, 105(3):1273-1282.
- Pavlovic, K., Tristan-Manzano, M., Maldonado-Perez, N., Cortijo-Gutierrez, M., Sanchez-Hernandez, S., Justicia-Lirio, P., . . . Benabdellah, K. (2020). Using gene editing approaches to fine-tune the immune system. *Frontiers in immunology*, 11(570672).

- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., & Helenius, A. (2001). Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology*, 3(5):473-483.
- Perche, F., Gosset, D., Mével, M., Miramon, M.-L., Yaouanc, J.-J., Pichon, C., . . . Midoux, P. (2011). Selective gene delivery in dendritic cells with mannosylated and histidylated lipopolyplexes. *Journal of Drug Targeting*, 19(5):315-325.
- Perche, F., Lambert, O., Berchel, M., Jaffrès, P.-A., Pichon, C., & Midoux, P. (2012). Gene transfer by histidylated lipopolyplexes: a dehydration method allowing preservation of their physiochemical parameters and transfection efficiency. *International journal of pharmaceutics*, 423(1):144-150.
- Perez Ruiz de Garibay, A. (2016). Endocytosis in gene therapy with non-viral vectors. *Wiener Medizinische Wochenschrift*, 166(7-8), 227–235.
- Perlstein, B., Finniss, S., Miller, C., Okhrimenko, H., Kazimirsky, G., Cazacu, S., . . . Brodie, C. (2013). TRAIL conjugated to nanoparticles exhibits increased anti-tumor activities in glioma cells and glioma stem cells in vitro and in vivo. *Neuro-Oncology*, 15(1):29-40.
- Perricone, M., Morris, J., Pavelka, K., Plog, M., O'Sullivan, B., Joseph, P., . . . ST. George, J. (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. II. transfection efficiency in airway epithelium. *Human Gene Therapy*, 12(11):1383-1394.
- Petersen, M., & Wengel, J. (2003). LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics. *Trends in biotechnology*, 21(2), 74-81.
- Petrantoni, G., Ibarra-Karmy, R., & Arriagada, G. (2020). Microtubule retrograde motors and their role in retroviral transport. *Viruses*, 12(4):483.
- Petrof, B., Shrager, J., Stedman, H., Kelly, A., & Sweeney, H. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *PNAS*, 90:3710-3714.
- Phelps, S., Hauser, M., Cole, N., Rafael, J., Hinkle, R., Faulkner, J., & Chamberlain, J. (1995). Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice. *Human Molecular Genetics*, 4(8):1251-1258.
- Pierce, E., & Bennett, J. (2015). The status of RPE65 Gene Therapy trials: safety and efficacy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(9):a017285.
- Pierce, M., Chapman, H., Post, C., Svetlanov, A., Efrat, S., Horwitz, M., & Serreze, D. (2003). Adenovirus early region 3 antiapoptotic 10.4K, 14.5k and 14.7k genes decrease the incidence of autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 52(5), 1119-1127.
- Pigeon Lucie, G. C. (2013). An E3-14.7K Peptide that Promotes Microtubules-Mediated Transport of Plasmid DNA Increases Polyplexes Transfection Efficiency. *Small*.
- Pigeon, L., Goncalves, C., Gosset, D., Pichon, C., & Midoux, P. (2013). An E3.14-7K peptide that promotes microtubules-mediated transport of plasmid DNA increases polyplexes transfection efficiency. *small*.
- Pigeon, L., Gonçalves, C., Gosset, D., Pichon, C., & Midoux, P. (2013). An E3-14.7K Peptide that Promotes Microtubules-Mediated Transport of Plasmid DNA Increases Polyplexes Transfection Efficiency. *Small*.
- Pillay, S., & Carette, J. (2017). Host determinants of adeno-associated viral vector entry. *Current Opinion in Virology*, 24:124-131.

- Ponting, C., Blake, D., Davies, K., Kendrick-Jones, J., & Winder, S. (1996). ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 21(1):11-13.
- Porteus, M., & Baltimore, D. (2003). Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science*, 300(5620):763-763.
- Porteus, M., & Carroll, D. (2005). Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nature Biotechnology*, 23(8):967-973.
- Porteus, M., Cathomen, T., Weitzman, M., & Baltimore, D. (2003). Efficient gene targeting mediated by adeno-associated virus and DNA double strand breaks. *Molecular and cellular biology*, 23(10):3558-3565.
- Prickett, M., & Jain, M. (2012). Gene therapy in cystic fibrosis. *Translational Research*.
- Pringle, I., Hyde, S., Connolly, M., Lawton, A., Xu, B., Nunez-Alonso, G., . . . Gill, D. (2012). CpG-free plasmid expression cassettes for cystic fibrosis gene therapy. *Biomaterials*, 33(28):6833-6842.
- Prins, K., Humston, J., Mehta, A., Tate, V., Ralston, E., & Ervasti, J. (2009). Dystrophin is a microtubule-associated protein. *The Journal of Cell Biology*, 186(3): 363-369.
- Provsic, T., & Dervan, P. (1989). Triple helix formation by oligonucleotides on DNA extended to the physiological pH range. *Journal of the american chemical society*, 111(8), 3059-3061.
- Puras, G., Mashal, M., Zarate, J., Agirre, M., Ojeda, E., Grijalvo, S., . . . Pedraz, J. (2014). A novel cationic niosome formulation for gene delivery to the retina. *Journal of Controlled Release*, 174:27-36.
- Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., . . . Kahn, A. (1993). Efficient adenovirus-mediated transfer of human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature*, 361(6413):647-650.
- Rahman, A., Seki, S., Obika, S., Yoshikawa, H., Miyashita, K., & Imanishi, T. (2008). Design, synthesis and properties of 2',4'-BNAnc: a bridged nucleic acid analogue. *Journal of the american chemical society*, 130(14), 4886-4896.
- Rajagopal, P., & Feigon, J. (1989). NMR studies of triple-strand formation from the homopurine-homopyrimidine deoxyribonucleotides d(GA)₄ and d(TC)₄. *Biochemistry*, 28(19), 7859-7870.
- Ramachandran, J., Schneider, J., Crassous, P.-A., Zheng, R., Gonzalez, J., Xie, L.-H., . . . Peluffo, D. (2013). Nitric oxide signaling pathway in Duchenne muscular dystrophy mice: upregulation of L-arginine Transporters. *Biochemical Journal*, 449(1):133-142.
- Rangarajan, S., Walsh, L., Lester, W., Perry, D., Madan, B., Laffan, M., . . . Pasi, J. (2017). AAV5-Factor VIII gene transfer in severe hemophilia A. *The New England journal of medicine*, 377(26):2519-2530.
- Rapoport, A., Stadtmayer, E., Binder-Scholl, G., Golubeva, O., Volg, D., Lacey, S., . . . June, C. (2015). NY-ESO-1 specific TCR engineered T-cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nature Medicine*, 21(8):914-921.
- Reck-Peterson, S., Redwine, W., Vale, R., & Carter, A. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6):382-398.
- Rejman, J., Conese, M., & Hoekstra, D. (2006). Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *Journal of Liposome Research*, 16(3):237-247.

- Rentschler, S., Linn, H., Deininger, K., Bedford, M., Espanel, X., & Sudol, M. (1999). The WW domain of dystrophin requires EF-Hands région to interact with b-dystroglycan. *Biological CHemistry*, 380(4):431-442.
- Ribeil, J.-A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., . . . Cavazzana, M. (2017). Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *The New England journal of medicine*, 376(9):848-855.
- Rinkenauer, A., Schubert, S., Traeger, A., & Schubert, U. (2015). The influence of polymer architecture on in vitro ADNp transfection. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(38):7477-7493.
- Riordan, J., Rommens, J., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., . . . Tsui, L.-C. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245(4922), 1066-1073.
- Ritter, W., Plank, C., Lausier, J., Rudolph, C., Zink, D., Reinhardt, D., & Rosenecker, J. (2003). A novel transfecting peptide comprising a tetrameric nuclear localization sequence. *Molecular Reproduction and Development*, 81(11):708-717.
- Roberts, R., & Crothers, D. (1992). Stability and properties of double and triple helices: dramatic effects of RNA or DNA backbone composition. *Science*, 258(5087), 1463-1466.
- Robinson, E., MacDonald, K., Slaughter, K., McKinney, M., Patel, S., Sun, C., & Sahay, G. (2018). Lipid nanoparticle-delivered chemically modified mRNA restores chloride secretion in cystic fibrosis. *Molecular Therapy*, 26(8):2034-2047.
- Rogers, S., & Pfuderer, P. (1968). Use of viruses as carriers of added genetic information. *Nature*, 219(5155):749-751.
- Rommens, J., Iannuzzi, M., Kerem, B.-S., Drumm, M., Melmer, G., Dean, M., . . . Collins, F. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science*, 245(4922), 1059-1065.
- Rosazza, C., Deschout, H., Buntz, A., Braeckmans, K., Rols, M.-P., & Zumbush, A. (2016). Endocytosis and endosomal trafficking of DNA after gene electrotransfer in vitro. *Molecular Therapy- Nucleic Acids*, e286.
- Rosenberg, S., & Restifo, N. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*, 348(6230):62-68.
- Rosenberg, S., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R., Moen, R., . . . Anderson, W. (1990). Gene transfer into humans - immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modifiés by retroviral gene transduction. *The New England Journal of Medicine*, 323:570-578.
- Rosenberg, S., Anderson, W., Blaese, M., Hwu, P., Yannelli, J., Yang, J., . . . White, D. (1993). The development of gene therapy for the treatment of cancer. *Annals of surgery*, 218(4):455-463.
- Rossor, A., Reilly, M., & Sleight, J. (2018). Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple. *Practical Neurology*, 18(2),126-131.
- Rothe, M., Modlich, U., & Schambach, A. (2013). Biosafety challenges for use of lentiviral vectors in gene therapy. *Current gene therapy*, 13(6):453-468.

- Rouet, P., Smih, F., & Jasin, M. (1994). Introduction of double-strand breaks into genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Molecular and Cellular Biology*, 14(12):8096-8106.
- Roulon, H. a. (2002). Coupling of a targeting peptide to plasmid DNA using a new type of padlock oligonucleotide. *Bioconjugate Chemistry*, 13: 1134-1139.
- Roulon, T., Coulaud, D., Delain, E., Le Cam, E., Hélène, C., & Escudé, C. (2002). Padlock oligonucleotides as a tool for labeling superhelical DNA. *Nucleic Acids Research*, 30(3), E12.
- Rowe, W., Huebner, R., Gilmore, L., Parrott, R., & Ward, T. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Experimental Biology and Medicine*, 84(3):570-573.
- Roy, C. (1993). Inhibition of gene transcription by purine rich triplex forming oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Research*, 21(12):2845-2852.
- Sadoulet-Puccio, H., & Kunkel, L. (1996). Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathology*, 6(1):25-35.
- Sadoulet-Puccio, H., Rajala, M., & Kunkel, L. (1997). Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. *PNAS*, 94:12413-12418.
- Sahay, G., Alakhova, D., & Kabanov, A. (2010). Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release*, 145(3):182-195.
- Sakamoto, M., Yuasa, K., Yoshimura, M., Yokota, T., Ikemoto, T., Suzuki, M., . . . Takeda, S. (2002). Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(4):1265-1272.
- Salman, H., Abu-Arish, A., Oliel, S., Loyter, A., Klafter, J., Granek, R., & Elbaum, M. (2005). Nuclear localization signal peptides induce molecular delivery along microtubules. *Biophysical Journal*, 89(3):2134-2145.
- Samuel, T., Rosenberry, R., Lee, S., & Pan, Z. (2018). Correcting calcium dysregulation in chronic heart failure using SERCA2a gene therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 19:1086.
- Sasaki, K., Rahman, S., Obika, S., Imanishi, T., & Torigoe, H. (2008). Promotion of triplex formation by 2'-O,4'-C-aminomethylene bridged nucleic acid (2',4'-BNAnc) modification. *Nucleic Acids symposium series*, 52(1), 419-420.
- Sato, K., Yokota, T., Ichioka, S., Shibata, M., & Takeda, S. (2008). Vasodilation of intramuscular arterioles under shear stress in dystrophin-deficient skeletal muscle is impaired through decreased nNos expression. *Acta Myologica*, 30-36.
- Schirmann, T., & Pecher, G. (2005). Specific targeting of CD33+ leukemia cells by a natural killer cell line modified with a chimeric receptor. *Leukemia Research*, 29(3):301-306.
- Schroer, T., & Sheetz, M. (1991). Two activators of microtubule-based vesicle transport. *The Journal of Cell Biology*, 115(5):1309-1318.
- Schuster, S., Bishop, M., Tam, C., Waller, E., Borchmann, P., McGuirk, J., . . . Maziarz, R. (2018). Tisagenlecleucel in adult relapsed or refractory diffuse large B-cell lymphoma. *The New England journal of medicine*, 380(1):45-56.
- Schuster, S., Maziarz, R., Rusch, E., Li, J., Signorovitch, J., Romanov, V., . . . Maloney, D. (2020). Grading and management of cytokine release syndrome in patients treated with tisagenlecleucel in JULIET trial. *Blood Advances*, 4(7):1432-1439.

- Schwartz. (1999). Synthetic DNA-compacting peptides derived from human sequence enhance cationic lipid-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *Gene Therapy*, 6: 282-292.
- Schwartz, M., Duno, M., Palle, A. L., Krag, T., & Vissing, J. (2007). Deletion of exon 16 of the dystrophin gene is not associated with disease. *Human Mutation*, 28(2): 205.
- Sebestyen, M., Ludtke, J., Bassik, M., Zhang, G., Budker, V., Lukhtanov, E., . . . Wolff, J. (1998). DNA vector chemistry: the covalent attachment of signal peptides to plasmid DNA. *Nature Biotechnology*, 16: 80-85.
- Seidman, M., & Glazer, P. (2003). The potential for gene repair via triple helix formation. *The journal of clinical investigation*, 112:487-494.
- Seidman, M., Puri, N., Majumdar, A., Cuenoud, B., Miller, P., & Alam, R. (2005). The development of bioactive triple helix forming oligonucleotides. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1058(1), 119-127.
- Seksek, O., Biwersi, J., & Verkman, A. (1997). Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *The Journal of Cell Biology*, 138(1):131-142.
- Shieh, P. (2018). Emerging strategies in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Neurotherapeutics*, 15:840-848.
- Shimizu, M., Konishi, A., Shimada, Y., Inoue, H., & Ohtsuka, E. (1992). Oligo(2'-O-methyl)ribonucleotides effective probes for duplex DNA. *Federation of european biochemical societies*, 302, 155-158.
- Shin, J.-H., Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Kinoshita, K., Chiyo, T., . . . Takeda, S. (2011). Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Therapy*, 18(9):910-919.
- Shirley, J., de Jong, Y., Terhorst, C., & Herzog, R. (2020). Immune responses to viral gene therapy vectors. *Molecular Therapy*, 28(3):709-722.
- Shivarov, V., Ivanova, M., & Naumova, E. (2014). Rapid detection of DNMT3A R882 mutations in hematologic malignancies using a novel bead-based suspension assay with BNA(NC) probes. *PLoS ONE*, 9, e99769.
- Shurin, M., Gregory, M., & Morris, J. (2010). Genetically modified dendritic cells in cancer immunotherapy: a better tomorrow? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(11),1539-1553.
- Sing, C., Risser, D., Howatt, W., & Erickson, R. (1982). Phenotypic heterogeneity in Cystic Fibrosis. *American journal of medical genetics*, 13(2), 179-195.
- Singh, S., Nielsen, P., Koshkin, A., & Wengel, J. (1998). LNA (locked nucleic acids): synthesis and high-affinity nucleic acid recognition. *Chemical communications*, (4), 455-456.
- Slattum, P., Loomis, A., Machnik, K., Watt, M.-A., Duzeski, J., Budker, V., . . . Hagstrom, J. (2003). Efficient in vitro and in vivo expression of covalently modified plasmid DNA. *Molecular therapy*, 8(2), 255-263.
- Soler-Bistué, A., Zorreguieta, A., & Tolmasky, M. (2019). Bridged nucleic acids reloaded. *Molecules*, 24(12), 2297.
- Somanchi, S., Somanchi, A., Cooper, L., & Lee, D. (2012). Engineering lymph node homing of ex vivo-expanded human natural killer cells via trogocytosis of the chemokine receptor CCR7. *Blood*, 119(22):5164-5172.

- Sondergaard, P., Griffin, D., Pozsgai, E., Johnson, R., Grose, W., Heller, K., . . . Rodino-Klapac, L. (2015). AAV.Dysferlin overlap vectors restore function in dysferlinopathy animal models. *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 2(3):256-270.
- Southwell, A., Skotte, N., Bennet, C., & Hayden, M. (2012). Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 18(11):634-643.
- Souza-Menezes, J., da Silva Feltran, G., & Morales, M. (2014). CFTR and TNR-CFTR expression and function in the kidney. *Biophysical Reviews*, 6:227-236.
- Spiegelman, B., Penningroth, S., & Kirschner, M. (1977). Turnover of tubulin and the N site GTP in chinese hamster ovary cells. *Cell*, 12(3):587-600.
- Stauss, H., & Morris, E. (2013). Immunotherapy with gene-modified T cells: limiting side effects provides new challenges. *Gene Therapy*, 20(11):1029-1032.
- Stein, C., & Cohen, J. (1988). oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: a review. *Cancer research*, 48, 2659-2668.
- Stevenson, D., Gunn-Moore, F., Campbell, P., & Dholakia, K. (2010). Single cell optical transfection. *Journal of the Royal Society, Interface*, 7(47):863-871.
- Stirchak, E., Summerton, J., & Weller, D. (1989). Uncharged stereoregular nucleic acid analogs: 2. morpholino oligomers with carbamate internucleoside linkages. *Nucleic Acids Research*, 17(5), 6129-6141.
- Strauss, K., Carson, V., Brigatti, K., Young, M., Robinson, D., Hendrickson, C., . . . Miller, F. (2018). Preliminary safety and tolerability of a novel subcutaneous intrathecal catheter system for repeated outpatient dosing of nusinersen to children and adults with spinal muscular atrophy. *Journal of pediatric orthopedics*, 38(10):e610-e617.
- Sturm, S., Günther, A., Jaber, B., Jordan, P., Al Kotbi, N., Parkar, N., . . . Khwaja, O. (2019). A phase 1 healthy male volunteer single escalating dose study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of ridisplam (RG7916,RO7034067), a SMN2 splicing modifier. *British journal of clinical pharmacology*, 85(1):181-193.
- Subramanian A, R. P. (2000). Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 17: 873-877.
- Subramanian, A., Ranganathan, P., & Diamond, S. (1999). Nuclear targeting peptide scaffolds for lipofection of nondividing mammalian cells. *Nature biotechnology*, 17(9), 873-877.
- Suh, J., Paik, H.-J., & Hwang, B. (1994). Ionization of poly(ethyleimine) and poly(allylamine) at various pH's. *Bioorganic Chemistry*, 22(3), 318-327.
- Summerton, J., & Weller, D. (1997). Morpholino antisens oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development*, 7(3), 187-195.
- Suomalainen, M., Nakano, M., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R., & Greber, U. (1999). Microtubule-dependent plus and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *The Journal of cell biology*, 144(4):657-672.
- Swanson, J., & Watts, C. (1995). Macropinocytosis. *Trends in Cell Biology*, 5(11):424-428.

- Szybalska, E., & Szybalski, W. (1962). Genetics of human cell lines. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 48:2026-2034.
- Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J., Chew, W., Widrick, J., Yan, W., . . . Wagers, A. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 351(6271):407-411.
- Tagalakakis, A., He, L., Saraiva, L., Gustafsson, K., & Hart, S. (2011). Receptor-targeted liposome-peptide nanocomplexes for siRNA delivery. *Biomaterials*, 32(26):6302-6315.
- Tai, A., Chuang, J.-Z., Bode, C., Wolfrum, U., & Sung, C.-H. (1999). Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain tctex-1. *Cell*, 97(7):877-887.
- Tai, W., & Gao, X. (2017). Functional peptides for siRNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 110-111, 157-168.
- Takei, K., McPherson, P., Schmid, S., & De Camilli, P. (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP-gammaS in nerve terminals. *Nature*, 374(6518):186-190.
- Takis Athanasopoulos, M. M.-M. (2017). Nonintegrating Gene Therapy Vectors. *Hematol Oncol Clin*, 31 (2017) 753–770.
- Tamm, L., Han, X., Li, Y., & Lai, A. (2002). Structure and function of membrane fusion peptides. *Biopolymers*, 66(4):249-260.
- Tanaka, K., Kanazawa, T., Sugawara, K., Horiuchi, S., Takashima, Y., & Okada, H. (2011). A cytoplasm-sensitive peptide vector cross-linked with dynein light chain association sequence (DLCAS) enhances gene expression. *International Journal of Pharmaceutics*, 419(1-2):231-234.
- Tang, M., & Szoka, F. (1997). The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. *Gene Therapy*, 4(8), 823-832.
- Tanimoto, K. M. (2003). No enhancement of nuclear entry by direct conjugation of nuclear localization signal oetide to linearized DNA. *Bioconjugate Chemistry*, 14: 1197-1202.
- Tardieu, M., Zerah, M., Gougeon, M.-L., Ausseil, J., de Bournonville, S., Husson, B., . . . Heard, J.-M. (2017). Intracerebral gene therapy in children with mucopolysaccharidosis type IIIB syndrome: an uncontrolled phase 1/2 clinical trial. *The Lancet Neurology*, 16(9):712-720.
- Tatum, E. (1966). Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspectives in Biology and Medicine*, 10(1):19-32.
- Taylor, M., Jefferies, J., Byrne, B., Lima, J., Anbale-Venkatesh, B., Ostovaneh, M., . . . Victor, R. (2019). Cardiac and skeletal muscle effects in the randomized HOPE-Duchenne trial. *Neurology*, 92:e866-e878.
- Tebas, P., Stein, D., Tang, W., Frank, I., Wang, S., Lee, G., . . . June, C. (2014). Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *The New England Journal of Medicine*, 370(10)901-910.
- Temin, H. (1961). Mixed infection with two types of Rous sarcoma virus. *Virology*, 13(2):158-163.
- Terry, L., & Wente, S. (2009). Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryotic Cell*, 8(12), 1814-1827.

- Thomas, G., Ye, J., De Nardi, C., Monopoli, A., Ongini, E., & Victor, R. (2012). Treatment with a nitric oxide-donating NSAID alleviates functional muscle ischemia in the mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE*, 11, e49350.
- Thompson, A., Walters, M., Kwiatkowski, J., Rasko, J., Ribeil, J.-A., Hongeng, S., . . . Cavazzana, M. (2018). Gene therapy in patients with transfusion-dependent β -thalassemia. *The New England journal of medicine*, 378(16):1479-1493.
- Titeux, M., Pendaries, V., Zanta-Boussif, M., Décha, A., Pironon, N., Tonasso, L., . . . Hovnanian, A. (2010). SIN retroviral vectors expressing COL7A1 under human promoters for ex vivo gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Molecular Therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(8):1509-1518.
- Toledo, M. A., Janissen, R., Favaro, M. T., Cotta, M. A., Monteiro, G. A., Prazeres, D. M., . . . Azzoni, A. R. (2012). Development of a recombinant fusion protein based on the dynein light chain LC8 for non-viral gene delivery. *Journal of controlled release*, 159(2):222-231.
- Tomizawa, M., Shinozaki, F., Motoyoshi, Y., Sugiyama, T., Yamamoto, S., & Sueishi, M. (2013). Sonoporation: gene transfer using ultrasound. *World Journal of Methodology*, 3(4):39-44.
- Trandafir Laura M, L. M. (2019). Current Practices and Potential Nanotechnology Perspectives for Pain Related to Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Medicine*.
- Tremblay, J. (2015). CRISPR, un système qui permet de corriger ou de modifier l'expression de gènes responsables de maladies héréditaires. *Médecine/Sciences*, 31:1014-1022.
- Tros de Ilarduya, C., Sun, Y., & Düzgünes, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 159-170.
- Tsui, L.-C., & Dorfman, R. (2013). The cystic fibrosis gene: a molecular genetic perspective. *Cold Spring Harb Perspect Med*.
- Tufariello, J., Cho, S., & Horwitz, M. (1994). The adenovirus E3 14.7-kilodalton protein which inhibits cytolysis by tumor necrosis factor increases the virulence of vaccinia virus in a murine pneumonia model. *Journal of virology*, 68(1), 453-462.
- Tuszynski, M., Thal, L., Pay, M., Salmon, D., U, H., Bakay, R., . . . Conner, J. (2005). A phase 1 clinical trial of nerve growth factor gene therapy for Alzheimer disease. *Nature Medicine*, 11(5):551-555.
- Uchida, S., Perche, F., Pichon, C., & Cabral, H. (2020). Nanomedicine-based approaches for mRNA delivery. *Molecular Pharmaceutics*, 17(10), 3654-3684.
- Uludag Hasan, U. A. (2019). At the intersection of biomaterials and gene therapy : progress in non-viral delivery of nucleic acids. *frontiers in bioengineering and biotechnology*.
- Uludag, H., Ubeda, A., & Ansari, A. (2019). At the Intersection of Biomaterials and Gene Therapy: Progress in Non-viral Delivery of Nucleic Acids. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(131).
- Urnov, F., Miller, J., Lee, Y.-L., Beausejour, C., Rock, J., Augustus, S., . . . Holmes, M. (2005). Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 435(7042):646-651.
- Urnov, F., Rebar, E., Holmes, M., Zhang, H., & Gregory, P. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 11(9), 636-646.

- Vacik, J., Dean, B., Zimmer, W., & Dean, D. (1999). Cell-specific nuclear import of plasmid DNA. *Gene Therapy*, 6(6):1006-1014.
- van der Aa, K. d. (2005). An NLS peptide covalently linked to linear DNA does not enhance transfection efficiency of cationic polymer based gene delivery systems. *Journal of Gene Medicine*, 7: 208-217.
- van Gaal, E., Oosting, R., van Eijk, R., Bakowska, M., Feyen, D., Kok, R., . . . Mastrobattista, E. (2011). DNA nuclear targeting sequences for non-viral gene delivery. *Pharmaceutical research*, 28(7):1707-1722.
- Vangasseri, D., Han, S.-J., & Huang, L. (2005). Lipid-protamine-DNA-mediated antigen delivery. *Current Drug Delivery*, 2(4):401-406.
- Varga, C., Tedford, N., Thomas, M., Klibanov, A., Griffith, L., & Lauffenburger, D. (2005). Quantitative comparison of polyethyleimine formulations and adenoviral vectors in terms of intracellular gene delivery processes. *Gene Therapy*, 12(13):1023-1032.
- Vasquez, K., & Wilson, J. (1998). Triplex-directed modification of genes and gene activity. *Trends in biochemical Sciences*, 23(1), 4-9.
- Vasquez, K., Narayanan, L., & Glazer, P. (2000). Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice. *Science*, 530-533.
- Vasquez, K., Wensel, T., Hogan, M., & Wilson, J. (1995). Triple helix formation by synthetic oligonucleotides at a site within a selectable mammalian gene. *Biochemistry*, 34(21):7243-7251.
- Vaughan, E., & Dean, D. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Molecular Therapy*, 13(2):422-428.
- Vigna, E., & Naldini, L. (2000). Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy. *The Journal of Gene Medicine*, 2:308-316.
- Wagner, E. (1999). Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 38(3):279-289.
- Wagner, E. (2014). Polymers for nucleic acid transfer - an overview. *Advances in Genetics*, 231-261.
- Wagner, E., Plank, C., Zatloukal, K., Cotten, M., & Birnstiel, M. (1992). Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(17):7934-7938.
- Wagner, J., Messner, A., Moran, M., Daifuku, R., Kouyama, K., Desch, J., . . . Gardner, P. (1999). Safety and biological efficacy of an adeno-associated virus vector-cystic fibrosis transmembrane regulator (AAV-CFTR) in the cystic fibrosis maxillary sinus. *The Laryngoscope*, 109(2):266-274.
- Wagner, J., Nepomuceno, I., Messner, A., Moran, M., Batson, E., Dimiceli, S., . . . Gardner, P. (2002). A phase II, double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of tgAAVCF using maxillary sinus delivery in patients with cystic fibrosis with antrostomies. *Human Gene Therapy*, 13(11):1349-1359.
- Wakayama, Y., Jimi, T., Inoue, M., Kojima, H., Murahashi, M., Kumagai, T., . . . Shibuya, S. (2002). Reduced aquaporin 4 expression in the muscle plasma membrane of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Archives of Neurology*, 59(3):431-437.

- Wang, C.-Y., & Huang, L. (1984). Polyhistidine mediates an acid-dependent fusion of negatively charged liposomes. *Biochemistry*, 23(19): 4409-4416.
- Wang, D., & Gao, G. (2014). State-of-the-art human gene therapy: part II. Gene therapy strategies and applications. *Discovery Medicine*, 18(98):151-161.
- Wang, K., Kievit, F., & Zhang, M. (2016). Nanoparticles for cancer gene therapy: recent advances, challenges and strategies. *Pharmacological Research*, 114:56-66.
- Wang, K., Kievit, F., Jeon, M., Silber, J., Ellenbogen, R., & Zhang, M. (2015). Nanoparticle-mediated target delivery of TRAIL as gene therapy for glioblastoma. *Advanced Healthcare Materials*, 4(17):2719-2726.
- Wang, X., Yu, B., Ren, W., Mo, X., Zhou, C., He, H., . . . Lee, L. (2013). Enhanced hepatic delivery of siRNA and microRNA using oleic acid based lipid nanoparticle formulations. *Journal of Controlled Release*, 172(3):690-698.
- Wang, Y., Canine, B., & Hatefi, A. (2011). HSV-TK/GCV Cancer suicide gene therapy by designed recombinant multifunctional vector. *Nanomedicine*, 7(2):193-200.
- Watkins, S., Hoffman, E., Slayter, H., & Kunkel, L. (1988). Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibers. *Nature*, 333(6176):863-866.
- Watson, J., & Crick, F. (1953). Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 171(4356), 737-738.
- Way, M., Pope, B., Cross, R., Kendrick-Jones, J., & Weeds, A. (1992). Expression of the N-terminal domain of dystrophin in *E. coli* and demonstration of binding to F-actin. *FEBS letters*, 301:243-245.
- Welch, E., Barton, E., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W., Trifillis, P., . . . Sweeney, H. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*, 447(7140):97-91.
- Wienhues, H. S., Wienhues, U., Hosokawa, K., Höveler, A., Siegmann, B., & Doerfler, W. (1987). A novel method for transfection and expression of reconstituted DNA-protein complexes in eukaryotic cells. *DNA*, 6(1):81-89.
- Wilson, G., Dean, B., Wang, G., & Dean, D. (1999). Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA. *The Journal of biological chemistry*, 274(31):22025-22032.
- Wirth, T., Parker, N., & Ylä-Herttuala, S. (2013). History of gene therapy. *Gene*, 162-169.
- Wooddell, C., Hegge, J., Zhang, G., Sebestyen, M., Noble, M., Griffin, J., . . . Wolff, J. (2011). Dose response in rodents and nonhuman primates after hydrodynamic limb vein delivery of naked plasmid DNA. *Human Gene Therapy*, 22:889-903.
- Wu, Z., Asokan, A., & Samulski, R. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Molecular Therapy*, 14(3):316-327.
- Wyatt, R., & Sodroski, J. (1998). The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*, 280:1884-1888.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., & Chapman, M. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16):10405-10410.

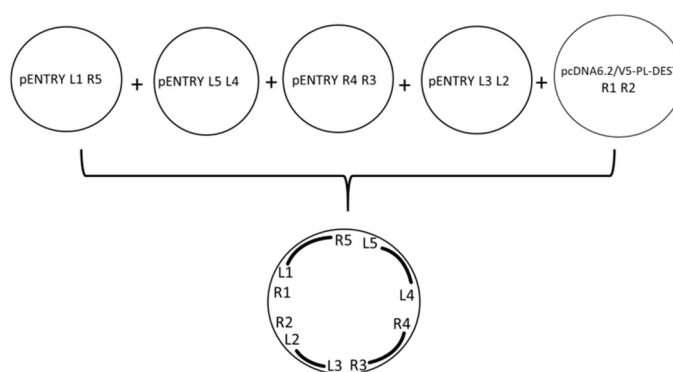
- Xionghao Liu, M. L. (2017). Gene therapy for Hemophilia and Duchenne muscular dystrophy in China. *Human Gene Therapy*.
- Xu, L., Park, K., Zhao, L., Xu, J., El Refaey, M., Gao, Y., . . . Han, R. (2016). CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx mice. *Molecular Therapy*, 24(3): 564-569.
- Xu, L., Park, K., Zhao, L., Xu, J., El Refaey, M., Gao, Y., . . . Han, R. (2016). CRISPR-mediated genome editing restores dystrophin expression and function in mdx mice. *Molecular therapy*, 24(3):564-569.
- Yamamoto, T., Harada-Shiba, M., Nakatani, M., Wada, S., Yasuhara, H., Narukawa, K., . . . Obika, S. (2012). Cholesterol-lowering action of BNA-based antisense oligonucleotides targeting PCSK9 in atherogenic diet-induced hypercholesterolemic mice. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, e22.
- Yamashita, A., Kanda, D., Katoono, R., Yui, N., Ooya, T., Maruyama, A., . . . Harashima, H. (2008). Supramolecular control of polyplex dissociation and cell transfection: efficacy of amino groups and threading cyclodextrins in biocleavable polyrotaxanes. *Journal of Controlled Release*, 131(2): 137-144.
- Yang, S., Li, H., Xu, L., Deng, Z., Han, W., Liu, Y., . . . Zu, Y. (2018). Oligonucleotide aptamer-mediated precision therapy of hematological malignancies. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 13:164-175.
- Yeung, E., Whitehead, N., Suchyna, T., Gottlieb, P., Sachs, F., & Allen, D. (2005). Effects of stretch-activated channel blockers on $[Ca^{2+}]_i$ and muscle damage in the mdx mouse. *Journal of Physiology*, 367-380.
- Yin, H., Kauffman, K., & Anderson, D. (2017). Delivery technologies for genome editing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(6):387-399.
- Ylä-Herttuala, S. (2012). Endgame: Glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European Union. *Molecular Therapy*, 20(10):1831-1832.
- Yokota, T., Lu, Q.-L., Morgan, J., Davies, K., Fisher, R., Takeda, S., & Partridge, T. (2006). Expansion of revertant fibers in dystrophic mdx muscles reflects activity of muscle precursor cells and serves as an index of muscle regeneration. *The Journal of Cell Science*, 119(13):2679-2687.
- Yokota, T., Pistilli, E., Duddy, W., & Nagaraju, K. (2007). Potential of oligonucleotide-mediated exon-skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 7(6): 831-842.
- Yokota, T., Takeda, S., Lu, Q.-L., Partridge, T., Nakamura, A., & Hoffman, E. (2009). A renaissance for antisense oligonucleotide drugs in neurology: exon skipping breaks new ground. *Archives of Neurology*, 66(1):32-38.
- Yoo, J. (2007). Nuclear targeting of non-viral gene carriers using psoralen-nuclear localization signal (NLS) conjugates. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 66: 28-33.
- Yoon, J., Chandrasekharan, K., Xu, R., Glass, M., Singhal, N., & Martin, P. (2009). The synaptic CT carbohydrate modulates binding and expression of extracellular matrix proteins in skeletal muscle: partial dependence on utrophin. *Molecular and Cell Neuroscience*, 41(4):448-463.
- Yoshimura, M., Sakamoto, M., Ikemoto, M., Mochizuki, Y., Yuasa, K., Miyagoe-Suzuki, Y., & Takeda, S. (2004). AAV vector-mediated microdystrophin expression in a relatively small percentage of mdx myofibers improved the mdx phenotype. *Molecular Therapy*, 821-828.
- Young, J., & Dean, D. (2015). Electroporation-mediated gene delivery. *Advances in Genetics*, 89:49-88.

- Young, J., Benoit, J., & Dean, D. (2003). Effect of a DNA Nuclear targeting sequence on gene transfer and expression of plasmids in the intact vasculature. *Gene Therapy*, 10(17):1465-1470.
- Young, J., Zimmer, W., & Dean, D. (2008). Smooth muscle-specific gene delivery in the vasculature based on restriction of DNA nuclear import. *Experimental Biology and Medicine*, 233(7):840-848.
- Yu, D., Pendergraff, H., Liu, J., Kordasiewicz, H., Cleveland, D., Swayze, E., . . . Corey, D. (2012). Single-stranded RNAs use RNAi to potently and allele-selectively inhibit mutant Huntingtin expression. *Cell*, 150(5):895-908.
- Yuasa, K., Yoshimura, M., Urasawa, N., Ohshima, S., Howell, J., Nakamura, A., . . . Takeda, S. (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Therapy*, 14(17):1249-1260.
- Yue, Y., Ghosh, A., Long, C., Bostick, B., Smith, B., Kornegay, J., & Duan, D. (2008). A single intravenous injection of adeno-virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. *Molecular Therapy*, 16(12):1944-1952.
- Yue, Y., Jin, F., Deng, R., Cai, J., Dai, Z., Lin, M., . . . Wu, C. (2011). Revisit complexation between DNA and polyethylenimine--effect of length of free polycationic chains on gene transfection. *Journal of Controlled Release*, 152(1):143-151.
- Zabner, J., Couture, L., Gregory, R., Graham, S., Smith, A., & Welsh, M. (1993). Adenovirus-mediated gene transfer transiently corrects the chloride transport defect in nasal epithelia of patients with cystic fibrosis. *Cell*, 72(2):207-216.
- Zabner, J., Ramsey, B., Meeker, D., Aitken, M., Balfour, R., Gibson, R., . . . Welsh, M. (1996). Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *The journal of clinical investigation*, 97(6):1504-1511.
- Zanta, M., Belguise-Valladier, P., & Behr, J.-P. (1999). Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 91-96.
- Zauner, W., Kichler, A., Schmidt, W., Sinski, A., & Wagner, E. (1996). Glycerol enhancement of ligand-polylysine/DNA transfection. *BioTechniques*, 20(5):905-913.
- Zeballos C., M., & Gaj, T. (2020). Next-generation CRISPR technologies and their applications in gene and cell therapy. *Trends in Biotechnology*.
- Zelphati, O., Liang, X., Hobart, P., & Felgner, P. (1999). Gene chemistry: functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA. *Human Gene Therapy*, 10(1):15-24.
- Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H., & Birnstiel, M. (1990). Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(10):3655-3659.
- Zhang. (1999). A transfecting peptide derived from adenovirus fiber protein. *Gene Therapy*, 6: 171-181.
- Zhang, F., Cong, L., Lodato, S., Kosuri, S., Church, G., & Arlotta, P. (2011). Programmable sequence-specific transcriptional regulation of mammalian genome using designer TAL effectors. *Nature Biotechnology*, 29(2):149-153.

- Zhang, X., Collins, L., & Fabre, J. (2001). A powerful cooperative interaction between a fusogenic peptide and lipofectamine for the enhancement of receptor-targeted, non-viral gene delivery vi integrin receptors. *The Journal of Gene Medicine*, 3(6):560-568.
- Zhang, Y., & Yu, L.-C. (2008). Single-cell microinjection technology in cell biology. *BioEssays*, 30(6):606-610.
- Zhao, M., Li, M., Zhang, Z., Gong, T., & Sun, X. (2015). Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA. *Drug Delivery*, 1-12.
- Zhi, D., Zhang, S., Wang, B., Zhao, Y., Yang, B., & Yu, S. (2010). Transfection efficiency of cationic lipids with different hydrophobic domains in gene delivery. *Bioconjugate Chemistry*, 21(4):563-577.
- Zhou, Z., Liu, X., Zhu, D., Wang, Y., Zhang, Z., Zhou, X., . . . Shen, Y. (2017). Nonviral cancer gene therapy: delivery cascade and vector nanoproperty integration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 115, 115-154.
- Zhu, P., Wu, F., Mosenson, J., Zhang, H., He, T.-C., & Wu, W.-S. (2017). CRISPR/Cas9-mediated genome editing corrects dystrophin mutation in skeletal muscle stem cells in mouse of muscle dystrophy. *Molecular Therapy Nucleic Acids*, 7, 31-41.
- Zhu, Y., Tan, W., & Lee, W.-L. (2018). An in vitro microscopy-based assay for microtubule-biding and microtubule-crosslinking by budding yeast microtubule-associated protein. *Bio-protocol*, 8(23):e3110.
- Ziemenowicz, G. L., Ziemienowicz, A., Görlich, D., Lanka, E., Hohn, B., & Rossi, L. (1999). Import of DNA into mammalian nuclei by proteins originating from a plant pathogenic bacterium. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 96(7): 3729-3733.
- Zinder, N., & Lederberg, J. (1952). Genetic exchange in Salmonella. *Journal of bacteriology*, 64(5):679-699.
- Zuckerman, J., Robinson, C., McCoy, K., Shell, R., Sferra, T., Chirmule, N., . . . Wilson, J. (1999). A phase I of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. *Human Gene Therapy*, 10(18):2973-2985.

8 Annexes

Après avoir exploré plusieurs stratégies de clonage, les différents plasmides ont été réalisés en utilisant le système de clonage Gateway par recombinaison multisites. Cette approche est basée sur la recombinaison site spécifique du bactériophage lambda qui permet son intégration dans le chromosome des bactéries comme E.coli. La technologie Gateway utilise les mêmes composants mais modifiés de manière à augmenter la spécificité et l'efficacité de la recombinaison. La figure 72 et le tableau 27 résument la stratégie employée ainsi que les diverses constructions intermédiaires nécessaires à l'établissement des plasmides finaux. Brièvement, cette technologie commence par une réaction dite BP qui permet l'intégration d'un ADNc d'intérêt dans un plasmide intermédiaire, nommée vecteur pDONOR. Cette recombinaison est réalisée par un échange entre les sites attB des produits PCR et des sites attP du pDONOR en présence d'un mélange enzymatique contenant la BP clonase II. Cette recombinaison aboutit à la formation de sites attL de chaque côté de l'ADNc. La réaction LR permet la recombinaison entre les sites attL et les sites attR du vecteur de destination pcDNA6.2/V5-PL-DEST grâce à l'action de de l'enzyme LR clonase II Plus.



	ADNp	
	pspc5-12-DYS-3NF-6TH	pspc5-12-DYS-6 TH
pENTRY		
L1 3NF CMV Luc 3NF R5	X	
L5 3NF spc5-12 L4	X	
R4 <i>dystrophin</i> 3NF R3	X	
L3 <i>Genegrip</i> x6 L2	X	X
L1 CMV Luc R5		X
L5 <i>spc5-12</i> L4		X
R4 <i>dystrophin</i> R3		X
pDestination		
R1 pcDNA 6.2/V5 Dest R2	X	X

Figure 72 and Table 27: construction des plasmides. La réaction LR permet la recombinaison entre les sites attL (L) des clones pENTRY avec les sites attR (R) des plasmides de destination pcDNA6.2/V5-PL-DEST grâce au mélange enzymatique LR clonase II Plus.

Caroline GIRARDIN

Transfert de gènes par vecteurs synthétiques : optimisation du transport intracellulaire et délivrance dans le noyau d'un plasmide ADN

Le transfert de gène est l'une des stratégies majeures de la thérapie génique visant à guérir des pathologies le plus souvent d'origine génétique. Contrairement aux vecteurs viraux, les vecteurs non viraux tels que les polymères cationiques et lipides cationiques sont prometteurs pour le transfert de gènes dans les cellules puisqu'ils sont moins immunogènes, moins coûteux et illimités dans la taille du transgène qu'ils transportent. Cependant, leur efficacité de transfection reste faible principalement à cause d'un transport intracellulaire et d'une délivrance dans le noyau limités. Les travaux réalisés dans cette thèse visent à maximiser l'efficacité de transfection en assemblant des signaux moléculaires à un ADN plasmidique (ADNp). Ces signaux moléculaires sont impliqués dans la migration de l'ADN à travers le cytosol en utilisant un peptide P4 se liant indirectement à la dynéine et dans le transport nucléaire de l'ADN en utilisant des séquences 3NF reconnues par le facteur NFkB. Ces travaux sont focalisés sur l'optimisation de plasmides contenant le gène codant la protéine dystrophine ou CFTR, dans le contexte de la dystrophie musculaire de Duchenne et de la mucoviscidose, respectivement. Pour cela, une stratégie de greffage entre un peptide et différents plasmides ADN a été mise au point en s'appuyant sur la formation de triples hélices entre un oligonucléotide conjugué au peptide P4 et des séquences oligopurines•oligopyrimidines insérées dans les ADNp. L'efficacité de cette stratégie a été évaluée *in cellulo* et *in vivo*. Après l'injection hydrodynamique dans la veine saphène des pattes postérieures de souris d'un plasmide codant le gène de la luciférase, les mesures de l'activité de la luciférase dans les muscles squelettiques par bioluminescence sont en faveur d'une amélioration du transfert de gène dans des tissus musculaires lorsque le peptide P4 est associé au plasmide ADN par une triple hélice.

Mots clés : thérapie génique, triple hélice, plasmide ADN, trafic intracellulaire, microtubules

Gene transfer by synthetic carriers: optimization of intracellular transport and delivery in nucleus of plasmid DNA

Gene transfer is one of the major strategies of gene therapy to cure pathologies mostly of genetic origin. Unlike viral vectors, non-viral vectors such as cationic polymer and cationic lipids are promising for gene transfer since they are less immunogenic, less expensive and they can carry an unlimited size of the transgene. However, their transfection efficiency remains low mainly due to a limited intracellular transport and delivery to the nucleus of plasmid DNA coding the transgene. The works performed in this thesis aims to maximize transfection efficiency by assembling molecular signals to DNA plasmid (pDNA). These molecular signals favour the migration of pDNA through the cytosol by using P4 peptide indirectly binding to dynein and in the nuclear transport of pDNA using 3NF sequences recognized by the NFkB factor. The work is focused on the optimization of plasmids coding for the gene of the dystrophin or CFTR, in the context of Duchenne muscular dystrophy and Cystic fibrosis, respectively. For this purpose, a grafting strategy between a peptide and different DNA plasmids was developed based on the formation of triple helix between an oligonucleotide- P4 peptide conjugate with oligopurines • oligopyrimidines sequences inserted in pDNA sequence. The efficiency of this strategy was evaluated *in cellulo* and *in vivo*. After hydrodynamic injection of a plasmid encoding the luciferase gene into the saphenous vein of the hind legs of mice, measurements of luciferase activity in skeletal muscle by bioluminescence favour an improvement in gene transfer into muscle tissue when the P4 peptide is associated with the DNA plasmid by a triple helix.

Keywords : gene therapy, triple helix; DNA plasmid; intracellular trafficking, microtubules



Centre de Biophysique Moléculaire
Rue Charles Sadron
45071 Orléans Cedex 02

