

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

Mots clés : Transfert de gènes ; Vecteurs synthétiques ; Injection hydrodynamique ; Muscles squelettiques ; Dystrophie musculaire de Duchenne

Résumé : L'injection hydrodynamique par la veine (HLV) est une méthode physique d'administration locorégionale utile en transfert de gènes. Elle permet en effet de cibler l'ensemble de la musculature d'un membre isolé par un garrot *via* la délivrance d'un volume important contenant des constructions d'acides nucléiques d'intérêt complexés ou non à des vecteurs synthétiques. Cette approche a pour avantages de conserver son efficacité du petit au grand animal tout en étant cliniquement applicable. Elle se révèle donc attractive pour le traitement par thérapie génique de myopathies comme celle de Duchenne. Lorsqu'utilisée dans sa configuration originelle, l'injection HLV permet de transférer de l'ADN nu avec une certaine efficacité. Cependant, les niveaux de transfection obtenus de la sorte sont limités et

insuffisants pour conférer un réel bénéfice thérapeutique. Dans ce contexte, ce travail s'est premièrement intéressé à l'identification des étapes potentiellement limitantes pour le transfert de gènes par administration HLV. Différentes pistes d'optimisations ont été proposées et ensuite testées en utilisant la souris en tant qu'animal modèle. Ainsi, divers vecteurs synthétiques ont été utilisés, notamment des copolymères tribloc amphiphiles neutres, pouvant aider au franchissement du sarcolemme des fibres musculaires. De même, une série d'ADN plasmidiques comportant des séquences spécifiques pouvant faciliter l'étape de l'import nucléaire (appelées « DNA nuclear Targeting Sequences » ou DTS) a été mise au point et évaluée en exploitant la procédure HLV.

Title: Non-viral gene transfer to skeletal muscles using hydrodynamic limb vein injection: optimization strategies and application in the mouse

Keywords: Gene transfer; Synthetic vectors; Hydrodynamic Limb Vein injection; Skeletal muscles; Duchenne muscular dystrophy

Abstract: Hydrodynamic Limb Vein injection (HLV) is a physical loco-regional gene delivery method. In fact, it allows to treat the whole musculature of a given limb isolated by a tourniquet thanks to the delivery of a large volume containing nucleic acid constructs complexed or not with synthetic vectors. This delivery approach is efficient in small as well as in large animals and clinical trial demonstrated its feasibility and safety in humans. Thus, HLV injection is attractive for gene therapy applications dedicated to myopathies, comprising Duchenne muscular dystrophy. While used in its first indication, naked DNA can be transfected with some efficiency. However, the gene transfer efficacies obtained

are insufficient to reach a therapeutic threshold. In this context, the first part of this work was dedicated to the identification of potential hurdles that could limit the transfection efficiency during HLV injection. Then, some optimizations have been proposed and evaluated using mice as a convenient animal model. Accordingly, synthetic vectors comprising neutral amphiphilic triblock copolymers were used with the aim to help the transfection process when crossing the sarcolemma of muscle fibers. Likewise, in view to enhance the gene transfer at the nuclear translocation step, plasmid DNA equipped with DNA nuclear targeting sequences were designed and delivered *via* HLV injection.