



In vivo Gene electrotransfer: optimisation and mechanisms.

Franck M. André

► To cite this version:

| Franck M. André. In vivo Gene electrotransfer: optimisation and mechanisms.. Life Sciences [q-bio].
| INAPG (AgroParisTech), 2006. English. NNT : 2006INAP0027 . pastel-00002666

HAL Id: pastel-00002666

<https://pastel.hal.science/pastel-00002666>

Submitted on 4 Jul 2007

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

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



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON
(INA PG)
Ecole Doctorale ABIES
(Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnements et Santé)



THESE

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON (INA PG)

Spécialité : Biologie, Médecine et Santé

Electrotransfert de gènes *in vivo* : optimisation et mécanismes

Présenté par

Franck ANDRE

soutenu publiquement le 21/11/2006
devant le jury composé de :

Président	Mr Jean-Claude MEUNIER	Professeur à l'INA PG
Rapporteurs	Mme Marie-Pierre ROLS Mme Véronique PREAT	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse Professeur à l'UCL, Bruxelles
Examineur	Mr Justin TEISSIE	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse
Directeur de thèse	Mr Lluis M. MIR	Directeur de recherche, CNRS, Villejuif



CNRS UMR 8121 – Institut Gustave-Roussy : Vectorologie et transfert de gènes.
39, rue C. Desmoulins 94805 Villejuif



INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON
(INA PG)
Ecole Doctorale ABIES
(Agriculture, Alimentation, Biologie, Environnements et Santé)



THESE

Pour l'obtention du

DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL AGRONOMIQUE PARIS-GRIGNON (INA PG)

Spécialité : Biologie, Médecine et Santé

Electrotransfert de gènes *in vivo* : optimisation et mécanismes

Présenté par

Franck ANDRE

soutenu publiquement le 21/11/2006
devant le jury composé de :

Président	Mr Jean-Claude MEUNIER	Professeur à l'INA PG
Rapporteurs	Mme Marie-Pierre ROLS Mme Véronique PREAT	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse Professeur à l'UCL, Bruxelles
Examineur	Mr Justin TEISSIE	Directeur de recherche, CNRS, Toulouse
Directeur de thèse	Mr Lluis M. MIR	Directeur de recherche, CNRS, Villejuif



CNRS UMR 8121 – Institut Gustave-Roussy : Vectorologie et transfert de gènes.
39, rue C. Desmoulins 94805 Villejuif

À mes parents, pour m'avoir poussé jusque là...

Remerciements

Une thèse fait appel à la disponibilité et aux compétences de nombreuses personnes que je souhaite remercier ici.

Je remercie Monsieur Justin Teissié, Directeur de recherche au CNRS qui me fait l'honneur d'évaluer mon travail et également pour sa présence dans ce jury.

Je remercie Madame Véronique Prétat, Professeur de l'Université Catholique de Louvain et Madame Marie-Pierre Rols, Chargé de recherche au CNRS, d'avoir accepté d'examiner mon manuscrit.

Je remercie Monsieur Jean-Claude Meunier, Professeur à l'INA P-G, d'avoir présidé ce jury et aussi pour m'avoir donné accès à la formation de spécialisation en Sciences pour les Industries Biologiques et Alimentaires (SIBA) de l'INA-PG qu'il dirige.

Enfin, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Monsieur Lluís Mir, Directeur de recherche au CNRS, pour m'avoir accueilli dans son équipe. Mais aussi pour la confiance qu'il m'a accordé durant toute ma thèse, pour les nombreux meetings auxquels il m'a fait participer tout autour du globe durant ces quatre années, pour sa sympathie, son suivi de mon travail et enfin sa disponibilité malgré son emploi du temps souvent très chargé !

Je remercie aussi l'Association Française contre les Myopathies (AFM), pour m'avoir financièrement soutenu pendant ma thèse.

Je tiens également à remercier Madame Françoise Launay, responsable des contacts et des demandes d'information au sein de l'école doctorale ABIES, pour sa gentillesse, sa disponibilité et l'efficacité dont elle a fait preuve dans la gestion administrative de la mise en place des deux dernières années de mon financement.

Je remercie les différentes personnes impliquées dans la formation que j'ai reçue au cours de mon Diplôme Universitaire de Formation Supérieure BioMédicale (D.U.F.S.B.M.), effectué en parallèle de ma thèse, au sein de l'Institut de Formation Supérieure BioMédicale (IFSBM). Je remercie donc le professeur Claude Malvy pour m'avoir donné l'occasion de « reviewer » un article pour Nucleic Acids Research. Je remercie aussi chaleureusement Madame Marie-Claude Labastie pour son encadrement dynamique dans le cadre de ce D.U.. Enfin je tiens à remercier aussi Bertrand Tavitian, Directeur de recherche au CEA pour m'avoir encadré et conseillé durant mes trois ans à l'IFSBM et pour son idée des TMS (Transcranial Magnetic Stimulation) que je compte bien pouvoir tester un jour !

Je remercie les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de pouvoir collaborer et pour tous les échanges enrichissant que nous avons eu : Gregor Sersa pour l'électrotransfert sur les tumeurs PC3 avec le gène p53, Saulius Satkauskas pour le travail sur le rôle électrophorétique du LV in vivo, Dewy Vernerey pour son aide précieuse pour l'étude statistique sous SAS, Dominique Renoir pour le travail sur l'électrotransfert de siRNA en intra tumoral, Elisabeth Connault et Paule Opolon pour la réalisation et l'analyse des coupes histologiques, Anne Leroy-Willig pour son travail sur la visualisation de la perméabilisation membranaire par RMN et Bassim Al Sakere et Rafael Davalos pour le travail sur l'électroporation irréversible.

Je voudrais aussi remercier les « Barcelonaises » Alba y Neus et le « centralien » Christophe qui sont venus en stage dans notre équipe et qui tout en apprenant avec moi certaines techniques m'ont aussi rendu service !

Merci aussi aux secrétaires Annie et Magali pour leur aide précieuse pour tout ce qui concerne la paperasse administrative dont je raffole tant !

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des personnels du laboratoire qui contribuent à nous faciliter au quotidien la vie au laboratoire : les techniciens et techniciennes de la laverie et de l'autoclavage, le

personnel de l'animalerie (SCEA), l'équipe d'entretien (surtout la pipelette Isilda pour sa constante bonne humeur et sa présence quand tout le monde a déjà quitté le laboratoire !), sans oublier le personnel de l'atelier d'électronique de l'IGR et de l'IGEA pour nous avoir toujours remplacé rapidement les nombreux fusibles que l'on grillait sur les machines !

Bien sur un merci ému à tous les collègues du labo présents et passés, et ils sont nombreux ! Dans le désordre :

Nassim le « faux frère » algérien (pardon kabyle !), pour sa faculté à mettre une bonne ambiance, son côté « obsédé » (leurre ou vérité ?), les séances de muscu, de piscine, et bientôt de jogging, les cinés, etc. Peut-on encore parler de simple collègue ?

Marie-Ange pour les coups de mains pour les cultures de cellules et pour ses nombreux débats philosophiques (dois-je aussi mentionner son esprit et son humour farfelus ? ;-). Arrivés en même temps dans l'équipe nous la quittons aussi presque en même temps.

Mihaela la Roumaine pour le ping-pong à 22h, le parcours dans les arbres et sa présence au labo jusqu'à des « heures pas possibles » et aussi les week-ends, sans parler de sa bonté et de sa gentillesse qui laissent penser que, finalement, il existe des gens vraiment bons sur terre.

Christel pour son aide pour les « manips à 4 mains » et ces fameuses injections dans la veine de la queue ! Sans oublier les raquettes de ping-pong qu'elle nous a laissées, très utiles pour se changer les idées, et pour l'ambiance de travail (et de presque « vacances » aussi !) qu'elle a contribué à mettre au labo par sa bonne humeur durant son court post doc. chez nous.

Bassim l'Irakien pour sa gentillesse et son sourire, qui en font une véritable version masculine de Mihaela !

Claire, la sympathique râleuse, pour m'avoir aidé dans les manips de temps à autre et surtout pour m'avoir distrait encore beaucoup plus de fois !

Sa consœur Marie une « chieuse » comme on les aime qui permet de ne jamais s'ennuyer !

Toutes les étrangères qui sont passées plus brièvement et qui ont contribué à donner une ambiance internationale et à nous faire voyager virtuellement (Pernille la Danoise, Sonata la Lituanienne, Selma et Simona les Slovénes, Tamsin l'Anglaise hispanisante)

Jean-Rémi le véritable ingénieur, pour sa disponibilité, son ingéniosité et sa faculté à avoir réponse à tout.

Dorothée pour sa candeur et les corrections d'anglais (désolé, je ne pourrai pas faire le messager pour Marrakech !)

Toute l'équipe des « gens de l'étage au-dessus » à commencer par leur leader, le dynamique et souriant Karim, suivi des sympathiques « squatters » de notre luminomètre : Fred, Betsy et Delphine et enfin le thésard-chimiste Henri pour ses connaissances en physique/chimie, mais surtout pour le volley et le séjour à St Malo !

Céline 1 et 2 pour leur gestion efficace des pièces, stocks et du fonctionnement général du labo.

Stéphanie, qui est malheureusement décédée, pour son dynamisme et son efficacité dans la gestion des pièces, stocks et autres aspects du labo.

Désiré pour nous avoir transmis à Christel et à moi une partie de sa dextérité sans pareil pour les injections dans la veine de la queue, sans parler de sa visite quotidienne pour papoter.

Pierre le fan de métal pour son excellent goût musical, les séances de muscu et pour le cross en 125 qu'il faut absolument qu'on se fasse avec Stéphane !

Enfin les copains d'enfance qui m'ont permis de m'aérer les neurones et de me lobotomiser à coup d'informatique : Nico, Jim et Flo.

Voilà, j'espère n'avoir oublié personne !

Electrotransfert de gènes *in vivo* : optimisation et mécanismes.

Résumé :

L'électrotransfert est une solution prometteuse aux problèmes posés par les méthodes de transfert virales, aussi bien en termes d'applications thérapeutiques qu'en tant qu'outil de recherche. Cependant des progrès doivent encore être réalisés pour augmenter l'efficacité de transfection dans les divers types cellulaires, pour améliorer la connaissance des mécanismes impliqués ainsi que pour confirmer l'innocuité de l'électrotransfert.

Dans une étude préliminaire, nous avons démontré que l'efficacité de transfert par injection locale d'ADN seule augmentait avec la vitesse d'injection, impliquant probablement de l'endocytose médiée par récepteur, mais aussi une faible perméabilisation membranaire. Nous avons ensuite confirmé *in vivo* le rôle perméabilisant des impulsions courtes de fort voltage (HVs) et le rôle électrophorétique des impulsions longues de bas voltage (LVs), lors de l'électrotransfert. Nous avons aussi montré l'influence d'un délai entre le HV et le LV sur l'efficacité et la toxicité des impulsions électriques appliquées. Notre étude de l'impulsion HV semble montrer également que le tissu n'a pas besoin d'être complètement perméabilisé dans le cadre de l'électrotransfert. Nous avons aussi pu confirmer *in vivo* que plus les cellules du tissu étaient petites, plus le champ électrique à appliquer pour le HV devait être fort, conformément à l'équation de Schwan : $\Delta\Psi_i = F.g(\lambda).r.E.\cos\theta$, où « r » est le rayon de la cellule.

Enfin, nous avons montré l'absence de lésions et de stress cellulaire (Hsp70) induits par les combinaisons optimales de HV+LV utilisées pour l'électrotransfert, surtout lorsque l'impulsion LV est scindée en 8 impulsions.

Mots clés : Electrotransfert de gènes *in vivo*, électroperméabilisation, injection d'ADN, thérapie génique non virale, électroporation, électrotransfert d'ADN *in vivo*.

***In vivo* Gene electrotransfer: optimisation and mechanisms.**

Abstract:

DNA electrotransfer is a promising solution to the problems induced by the use of viral transfer techniques, both in terms of therapeutic applications and as a tool for research. However, improvements have to be made concerning the transfection efficacy in the different cell lines, the knowledge of the underlying mechanisms and also the knowledge of the safety of the electrotransfer.

In a preliminary study we have proved that transfection efficacy for DNA injection alone increased with the speed of injection, mainly due to receptor mediated endocytosis, but also partly to membrane permeabilisation.

Afterward we have confirmed *in vivo* the permeabilising role of the short high voltage pulses (HVs) and the electrophoretic role of the long low voltage pulses (LVs), during the electrotransfer. We have also shown the influence of a delay between the HV and the LV, on the efficacy and the toxicity of the pulses applied. Our study of the HV also tends to indicate that the tissue doesn't have to be entirely permeabilised to obtain a good electrotransfer. We have also confirmed *in vivo* that the smaller the cells are, the higher the voltage applied for the HV has to be. This is in agreement with Schwan's formula: $\Delta\Psi_i = F.g(\lambda).r.E.\cos\theta$, where "r" stands for the cell's radius.

At last, we have shown that there are no lesions or cellular stress induced by the optimal set of HV+LV used, especially when the LV pulse is split in 8 pulses.

Keywords: *In vivo* gene electrotransfer, electropermeabilisation, DNA injection, non viral gene therapy, électroporation, *in vivo* DNA electrotransfer.

Table des matières

<u>ABREVIATIONS UTILISEES :</u>	6
<u>AVANT PROPOS</u>	8
<u>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</u>	9
<u>I. INTRODUCTION A LA THERAPIE GENIQUE</u>	9
A. <u>PROTEOTHERAPIE ET THERAPIE GENIQUE</u>	10
B. <u>DIVERSES APPROCHES DE LA THERAPIE GENIQUE</u>	10
C. <u>APPLICATIONS CLINIQUES DE LA THERAPIE GENIQUE</u>	11
<u>II. LES DIVERS ACIDES NUCLEIQUES TRANSFECTES DANS LE CADRE DES THERAPIES GENIQUES</u>	12
A. <u>LES ACIDES NUCLEIQUES UTILISES DANS LE CADRE DE LA REGULATION TEMPORELLE DE L'EXPRESSION DES GENES</u>	13
1. <u>Stratégies anti-gène : ciblage direct du gène d'intérêt</u>	14
2. <u>Stratégies anti-ARNm</u>	15
a) <u>ARNm antisens codé par un vecteur</u>	15
b) <u>Oligodésoxynucléotides antisens (ODN)</u>	16
c) <u>ARNi (ou ARN interférence)</u>	17
d) <u>Ribozyme</u>	19
e) <u>DNAzyme</u>	20
f) <u>Aptamères</u>	20
g) <u>Points clés intervenant dans l'efficacité d'un antisens</u>	21
B. <u>LES SEQUENCES CODANTES D'ADN</u>	21
<u>III. LES ETAPES DU TRANSFERT D'ACIDES NUCLEIQUES</u>	22
A. <u>AMENER LES ACIDES NUCLEIQUES A PROXIMITE DE LA CELLULE CIBLE</u>	23
1. <u>Injection locale</u>	23
2. <u>Injection intraveineuse</u>	24
3. <u>Autres voies d'administration</u>	25
4. <u>La matrice extracellulaire : une barrière à l'apport des acides nucléiques au contact des cellules cibles</u>	26
5. <u>La magnétofection : une technique pour concentrer les acides nucléiques au niveau des cellules cibles</u>	29
B. <u>PASSAGE DE LA MEMBRANE CELLULAIRE</u>	29
1. <u>Barrière physique</u>	30
2. <u>Barrière électrostatique</u>	31
3. <u>Une possibilité de passage naturel de la membrane par les acides nucléiques ?</u>	31
C. <u>TRANSPORT ET DEGRADATION INTRACELLULAIRE</u>	33
1. <u>Transport</u>	33
2. <u>Dégradations</u>	33
3. <u>Piégeage dans des compartiments</u>	34
D. <u>PASSAGE DE L'ENVELOPPE NUCLEAIRE</u>	34
E. <u>CONTROLE DE L'ACTION DU TRANSGENE</u>	37
1. <u>Contrôle de l'initiation de la transcription du transgène : développement de systèmes inductibles</u>	38
a) <u>Exigences d'un bon système inductible</u>	38

b) <u>Systèmes régulables par la tétracycline</u>	39
c) <u>Systèmes basés sur des récepteurs aux hormones stéroïdes</u>	42
2. <u>Durée d'expression</u>	43
a) <u>Origines de la perte d'expression</u>	43
b) <u>Augmentation de la durée d'expression</u>	44
3. <u>Effets indésirables de l'acide nucléique dus à des réactions immunitaires contre la protéine exprimée ou l'ADN</u>	46
a) <u>Réaction immunitaire contre l'ADN : les motifs CpG non méthylés</u>	46
b) <u>Réaction immunitaire contre la protéine exogène</u>	48
IV. <u>LES DIFFERENTES METHODES DE TRANSFERT</u>	48
A. <u>LES METHODES VIRALES</u>	49
1. <u>Rétrovirus</u>	52
2. <u>Lentivirus</u>	52
3. <u>Adénovirus</u>	53
4. <u>Les virus associés aux adénovirus (AAV)</u>	54
5. <u>Herpes virus simplex (HSV)</u>	55
B. <u>LES METHODES PHYSICO-CHIMIQUES</u>	55
1. <u>ADN nu</u>	56
2. <u>Les vecteurs synthétiques</u>	57
a) <u>Polymères cationiques</u>	58
b) <u>Dendrimères</u>	60
c) <u>Lipides cationiques</u>	61
3. <u>Les méthodes physiques</u>	64
a) <u>Micro-injection</u>	64
b) <u>Injection locale : « jet injection »</u>	65
c) <u>Injection intraveineuse : la méthode hydrodynamique</u>	65
d) <u>Le canon à ADN : le gene gun</u>	67
e) <u>Ultrasons : la sonoporation</u>	68
f) <u>Laser</u>	68
g) <u>Champ magnétique</u>	69
h) <u>Electrotransfert</u>	69
C. <u>L'APPROCHE EX VIVO : LES VECTEURS CELLULAIRES</u>	69
1. <u>Vecteurs cellulaires utilisés pour la production de protéines</u>	70
2. <u>Vecteurs cellulaires utilisant les spécificités d'un type de cellules données</u>	70
V. <u>L'ELECTROTRANSFERT</u>	71
A. <u>HISTORIQUE</u>	71
B. <u>ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES GENERAUX CONSECUTIFS A L'APPLICATION D'UN CHAMP ELECTRIQUE A DES CELLULES</u>	73
1. <u>Notion de circuit électrique équivalent</u>	73
2. <u>Effets physico-chimiques de l'application d'un champ électrique</u>	73
a) <u>Effets scalaires</u>	73
(1) <u>Effet Joule</u>	73
(2) <u>Effets électrochimiques au niveau des électrodes</u>	74
b) <u>Effets vectoriels</u>	74
(1) <u>Effets à l'échelle de la cellule</u>	74
(a) <u>Orientation cellulaire</u>	74
(b) <u>Déformation des cellules</u>	74
(c) <u>Électrophorèse globale des cellules</u>	74
(d) <u>Diélectrophorèse cellulaire</u>	75
(2) <u>Effets à l'échelle moléculaire</u>	75

(a)	<u>Electrophorèse et orientation des composants membranaires</u>	75
(b)	<u>Potentiel membranaire induit par le champ électrique</u>	75
C.	<u>ELECTROPERMEABILISATION</u>	76
1.	<u>Notion de seuil de perméabilisation membranaire</u>	76
2.	<u>Asymétrie de la perméabilisation membranaire</u>	77
3.	<u>Notion de réversibilité de la perméabilisation ou « resealing »</u>	78
4.	<u>Répercussions cellulaires de l'électroperméabilisation</u>	78
5.	<u>Modèles mécanistiques de l'électroperméabilisation</u>	79
a)	<u>Modèle expliquant la rupture irréversible de la membrane</u>	79
b)	<u>Electroporation ou la formation de pores : la théorie initiale</u>	79
(1)	<u>Modèles</u>	79
(2)	<u>Mise en évidence des pores ?</u>	80
c)	<u>Modèle actuel</u>	81
6.	<u>Applications de l'électroperméabilisation</u>	82
a)	<u>Électroperméabilisation et électrochargement</u>	82
b)	<u>Electrofusion</u>	83
c)	<u>Électroinsertion</u>	83
d)	<u>Electromortalité</u>	83
D.	<u>ASPECTS MECANISTIQUES DE L'ELECTROTRANSFERT</u>	84
1.	<u>Importance d'une composante électrophorétique lors de l'électrotransfert</u>	84
2.	<u>Une internalisation de l'ADN postérieure à l'impulsion électrique</u>	86
3.	<u>Implication du métabolisme énergétique dans l'électrotransfert</u>	86
4.	<u>Modèles mécanistiques de l'électrotransfert</u>	86
E.	<u>ASPECTS PRATIQUES DE L'ELECTROTRANSFERT</u>	88
1.	<u>Les différents paramètres électriques de l'électrotransfert</u>	88
a)	<u>Les générateurs d'impulsions</u>	88
b)	<u>Les électrodes</u>	89
c)	<u>Le champ électrique</u>	91
d)	<u>La forme des impulsions électriques</u>	92
e)	<u>La durée et le nombre d'impulsions électriques</u>	93
f)	<u>La fréquence</u>	94
2.	<u>Les autres paramètres influençant l'électrotransfert</u>	95
a)	<u>Composition du milieu</u>	95
(1)	<u>In vitro</u>	95
(2)	<u>In vivo</u>	96
b)	<u>Température</u>	97
c)	<u>Taille et concentration du plasmide</u>	97
d)	<u>Répercussions cellulaires et moléculaires de l'électrotransfert</u>	98
(1)	<u>In vitro</u>	98
(2)	<u>In vivo</u>	99
e)	<u>Tissus et cellules cibles</u>	100
F.	<u>APPLICATIONS DE L'ELECTROTRANSFERT</u>	102
1.	<u>Applications thérapeutiques</u>	102
a)	<u>Sécrétion ectopique de protéines</u>	102
b)	<u>Maladies nécessitant la production intracellulaire d'une protéine</u>	103
c)	<u>Vaccination par immunisation génétique</u>	104
d)	<u>Traitement des Cancers</u>	105
2.	<u>Outil d'investigation</u>	106
a)	<u>Etude de la régulation de l'expression d'un gène d'intérêt</u>	106
b)	<u>Etude de la fonction d'un gène/d'une protéine</u>	107
	<u>RESULTATS</u>	109

<u>I.</u>	<u>INFLUENCE DE L'INJECTION SUR L'ELECTROTRANSFERT</u>	109
A.	PROBLEMATIQUE DE LA DISTRIBUTION DU VOLUME INJECTE	110
1.	Cas du muscle tibialis cranialis	110
2.	Cas des tumeurs sous cutanées	113
3.	Cas du foie	115
B.	INFLUENCE DE LA VITESSE D'INJECTION (ARTICLE 1)	117
<u>II.</u>	<u>ETUDE DES ALTERATIONS INDUITES PAR L'ELECTROTRANSFERT</u>	145
A.	LESIONS HISTOLOGIQUES	145
B.	INDUCTION DE L'EXPRESSION DE PROTEINES DE STRESS (HSP)	146
<u>III.</u>	<u>ETUDE DES PARAMETRES ELECTRIQUES</u>	150
A.	ROLES DES IMPULSIONS HV ET LV DANS LE MUSCLE (ARTICLE 2)	151
B.	ETUDE DE L'IMPULSION PERMEABILISANTE (HV) DANS DIVERS TISSUS	160
1.	Muscle	160
a)	Importance de la température de récupération de l'échantillon	160
b)	Influence du voltage de l'impulsion perméabilisante	161
c)	Effet d'un délai entre le HV et le LV	161
2.	Tumeur	163
a)	Intérêt du mélanome B16 comme modèle pour l'étude de l'électrotransfert de tumeur	163
b)	Influence du voltage de l'impulsion perméabilisante	164
c)	Effet d'un délai entre le HV et le LV	165
d)	Influence du voltage de l'impulsion électrophorétique	166
3.	Foie	167
a)	Intérêt de l'injection systémique par rapport à l'injection locale dans le cas de l'électrotransfert dans le foie	167
b)	Influence du voltage du HV et du LV appliqués	168
C.	NECESSITE D'UN CONTROLE ET D'UN AJUSTEMENT EN TEMPS REEL DES PARAMETRES ELECTRIQUES, DANS LE CADRE DE FUTURES APPLICATIONS CLINIQUES. (MANUSCRIT 1)	171
	<u>DISCUSSION/CONCLUSIONS</u>	187
<u>I.</u>	<u>NECESSITE DE CONTROLER LA VITESSE ET LA DISTRIBUTION DE L'INJECTION</u>	187
A.	IMPORTANCE DE LA DISTRIBUTION DU LIQUIDE INJECTE	187
B.	IMPORTANCE DE LA VITESSE D'INJECTION	187
<u>II.</u>	<u>DIVERS EFFETS DES IMPULSIONS ELECTRIQUES</u>	188
A.	CONFIRMATION IN VIVO DES ROLES PERMEABILISANTS ET ELECTROPHORETIQUES DES IMPULSIONS	188
B.	EFFET D'UNE AUGMENTATION DU VOLTAGE DE L'IMPULSION HV	189
C.	EFFET DE LA TAILLE DES CELLULES	189
D.	EFFET D'UNE AUGMENTATION DU VOLTAGE DE L'IMPULSION LV	189
E.	EFFET D'UN DELAI D'UNE SECONDE ENTRE LE HV ET LE LV	190
<u>III.</u>	<u>CONTROLE EN TEMPS REEL DU VOLTAGE DE L'IMPULSION PERMEABILISANTE POUR DE FUTURES APPLICATIONS CLINIQUES</u>	190
<u>IV.</u>	<u>PERSPECTIVES</u>	190
	<u>MATERIELS ET METHODES</u>	192

I.	<u>PRODUCTION DES VECTEURS PLASMIDIQUES.</u>	193
A.	<u>VECTEURS PLASMIDIQUES.</u>	193
B.	<u>TRANSFORMATION DES BACTERIES.</u>	194
1.	<u>Génotype et caractéristiques des souches d'E. coli.</u>	194
2.	<u>Milieu de culture.</u>	194
3.	<u>Préparation de bactéries électrocompétentes.</u>	194
4.	<u>Transformation de bactéries électrocompétentes par électroporation.</u>	195
5.	<u>Vérification du plasmide transfecté dans les bactéries.</u>	196
a)	<u>Miniprep d'ADN (Qiagen).</u>	196
b)	<u>Coupage par des enzymes de restriction.</u>	196
c)	<u>Electrophorèse d'ADN.</u>	196
6.	<u>Préparation de stocks de bactéries transformées.</u>	197
C.	<u>PRODUCTION DU PLASMIDE : GIGAPREP ENDOTOXIN FREE.</u>	197
1.	<u>Quantification de l'ARN et de l'ADN.</u>	197
II.	<u>EXPERIMENTATION ANIMALE.</u>	197
A.	<u>ANIMAUX</u>	197
B.	<u>ANESTHESIE</u>	197
C.	<u>TRANSFERT DE GENES IN VIVO DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE SOURIS</u>	198
1.	<u>Rasage :</u>	198
2.	<u>Injection de plasmides :</u>	198
3.	<u>Coinjection avec de la hyaluronidase ou de l'héparine :</u>	198
4.	<u>Electrotransfert :</u>	198
D.	<u>TRANSFERT DE GENE IN VIVO DANS UNE TUMEUR SOUS CUTANEE DANS LA SOURIS.</u>	198
1.	<u>Culture cellulaire :</u>	198
2.	<u>Inoculation des tumeurs sous cutanées :</u>	198
3.	<u>Rasage :</u>	199
4.	<u>Injection de plasmides :</u>	199
5.	<u>Electrotransfert :</u>	199
E.	<u>TRANSFERT DE GENE IN VIVO DANS LE FOIE DE LA SOURIS</u>	199
1.	<u>Laparotomie</u>	199
2.	<u>Injection de plasmides :</u>	199
3.	<u>Electrotransfert :</u>	199
F.	<u>OBSERVATIONS A LA LOUPE BINOCULAIRE AVEC OU SANS FLUORESCENCE.</u>	200
1.	<u>Préparation de l'animal.</u>	200
2.	<u>Optique</u>	200
G.	<u>PRELEVEMENTS</u>	200
1.	<u>Prélèvements des tissus chez la souris</u>	200
2.	<u>Prélèvements de sang</u>	200
H.	<u>HISTOLOGIE</u>	200
I.	<u>DOSAGE DE L'ACTIVITE LUCIFERASE.</u>	201
J.	<u>PROTOCOLE DE QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE Hsp70.</u>	201
1.	<u>Extraction d'ARN.</u>	201
2.	<u>Transcription inverse (RT)</u>	202
3.	<u>Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)</u>	202
K.	<u>STATISTIQUES</u>	203
	<u>REFERENCES</u>	204
	<u>ANNEXES</u>	228

Abréviations utilisées :

N.B. : la signification d'une abréviation n'est souvent rappelée qu'à sa première apparition dans le texte. Les abréviations utilisées sont les plus usuelles et correspondent souvent au terme anglais (écrit en italique ou traduit en français dans la liste suivante).

AAV	virus associé à l'adénovirus
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AEC	Arthrite Expérimentale induite par le Collagène
ARN	acide ribonucléique
ARNi	acide ribonucléique interférence
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
bp	paire de bases
BPV	virus du papillome bovin
Ca ²⁺	ion calcium
CHO	cellules d'ovaires de hamster chinois
Cl ⁻	ion chlorure
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	cytomégalovirus
CpG	Cytosine phosphate guanine
db	double brin
DBA/1	souris développant une inflammation articulaire due à une auto-immunité
DNase	désoxyribonucléase
DOGS	acide trifluoroacétique dioctadécylamidoglycylspermine
DOPE	dioléoylphosphatidyléthanolamine
DOSPA	trifluoroacétate de dioléoyloxy[(spermine-carboxyamido)éthyl]diméthylpropanaminium
DOTAP	dioléoyloxypropyltriméthylammonium propane
DOTMA	Chlorure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium
EBNA	<i>Epstein Barr Nuclear Antigen</i>
EDTA	éthylènediamine acide tétraacétate
Epo	érythropoïétine
ET	électrotransfert
Fe ²⁺	ion ferreux
Fe ³⁺	ion ferrique

FIV	Feline Immonodeficiency Virus
GFP	Green Fluorescent Protein
HIV	virus de l'immunodéficience humaine
hSeAP	Phosphatase alcaline sécrétée humaine
Hsp	<i>Heat shock protein</i>
HSV	Herpes Simplex Virus
i.m.	intramusculaire
LacZ	gène de la β -galactosidase
Luc	luciférase de <i>Photinus Pyralis</i>
MARs	régions d'attachement à la matrice nucléaire
Mg ²⁺	Ion magnésium
Mn ²⁺	Ion manganèse
NLS	signal de localisation nucléaire
Pb	paire de base
PBS	tampon phosphate salin
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEG	polyéthylène glycol
PEI	polyéthylène imine
PNA	<i>peptide nucleic acid</i>
PTGS	post-transcriptional gene silencing
RNase	ribonucléase
RT	<i>reverse transcription</i>
RT PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
Sb	Simple brin
SCID	Souris présentant une immunodéficience sévère combinée
SIV	Simian immunodeficiency virus
SV40	virus de singe 40
Tet	tétracycline
TetO	opérateur sensible à la tétracycline
TetR	répresseur sensible à la tétracycline
TNF- α	Tumor Necrosis Factor alpha
u.a.	unité arbitraire

Avant propos

Que ce soit à des fins thérapeutiques ou en tant qu'outil de recherche, le transfert d'acides nucléiques présente un intérêt évident. C'est un champ d'investigation en évolution permanente et très prometteur.

Dans la partie bibliographique de ce mémoire de thèse seront présentés dans un premier temps, l'intérêt de la thérapie génique ainsi que les divers types de molécules transfectées. Puis dans un deuxième temps les différentes étapes et obstacles rencontrés au cours du transfert d'acides nucléiques seront abordés, ainsi que les divers vecteurs utilisés pour faciliter ces mêmes étapes. Enfin la dernière partie du chapitre bibliographique abordera en détail l'électrotransfert qui est une des techniques de transfection non virales utilisées en transfert d'acides nucléiques. Ainsi les aspects théoriques et pratiques, tout comme les applications thérapeutiques et physiologiques de l'électrotransfert seront présentées.

Les mécanismes de l'électrotransfert sont encore mal connus. De plus, in vivo, des progrès en termes de spécificité, de nombre de cellules transfectées et de contrôle des effets secondaires, doivent être réalisés pour permettre une application courante optimale de l'électrotransfert de gènes dans le domaine clinique chez l'homme.

L'objectif de ce travail de thèse a donc consisté à étudier in vivo, plusieurs de ces points dans le cadre de l'électrotransfert au moyen d'une combinaison d'impulsions électroperméabilisantes (HV) et électrophorétiques (LV). Dans un premier temps l'influence sur le transfert de gènes de la vitesse d'injection et de la distribution du volume injecté ont été étudiées. Ensuite l'éventuelle induction par l'électrotransfert de lésions tissulaires ou d'un stress cellulaire a été évaluée. L'influence du voltage du HV et du LV, sur le nombre de fibres transfectées et l'intensité du transfert par fibre a ensuite été analysée dans le muscle. Une optimisation du voltage appliqué pour l'impulsion perméabilisante et dans une moindre mesure pour l'impulsion électrophorétique a ensuite été réalisée dans divers tissus : muscle, tumeur, foie. Enfin un algorithme permettant le contrôle en temps réel de l'efficacité et de la sécurité de l'impulsion perméabilisante a été testé in vivo.

L'ensemble de ces travaux apporte une meilleure connaissance des contraintes et des mécanismes de l'électrotransfert in vivo et résulte en des conditions expérimentales plus efficaces et plus sûres.

Introduction Bibliographique

Introduction Bibliographique

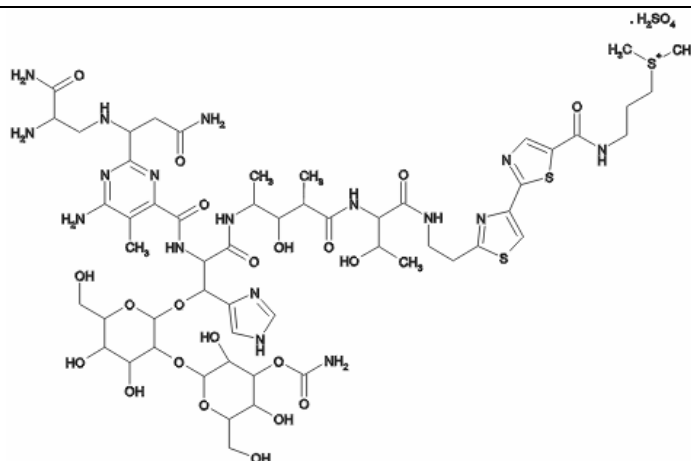
I. Introduction à la thérapie génique

De manière générale il existe de nombreux types de molécules qu'il peut être intéressant de faire pénétrer dans les cellules. Ainsi, dans le cadre des chimiothérapies antitumorales, la plupart des agents chimiques doivent pénétrer dans les cellules tumorales. La pénétration de ces molécules de petites tailles est le plus souvent spontanée (cas de la vinblastine par exemple), mais il peut être nécessaire de faciliter leur entrée dans les cellules par des techniques telles que l'électropérméabilisation (cas de la bléomycine et dans une moindre mesure du cisplatine) (voir figure 1). Il est également intéressant de faire pénétrer certaines molécules plus complexes et plus grosses telles que des protéines ou des acides nucléiques, qui pénètrent très difficilement les cellules de manière spontanée.

Molécule non perméante :

Bléomycine

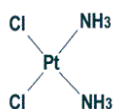
(Masse molaire : 1415,56 g/mol)



Molécule peu perméante :

Cisplatine

(Masse molaire : 300 g/mol)



Molécule perméante :

Vinblastine

(Masse molaire : 909,07 g/mol)

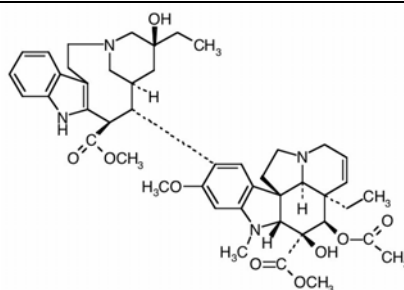


Figure 1 : Exemple de molécules (perméantes ou non), utilisées en chimiothérapie ou en électrochimiothérapie. La taille n'est pas l'unique facteur faisant qu'une molécule ne rentre pas spontanément dans la cellule.

A. Protéothérapie et thérapie génique

Les protéines ayant des fonctions très diverses, leur pénétration dans la cellule peut avoir de très nombreuses utilités. Cependant il peut être plus judicieux de faire pénétrer un gène codant pour cette protéine puisque l'entrée d'un seul gène peut permettre à elle seul la production de très nombreuses protéines. C'est le principe de base des thérapies géniques.

La thérapie génique présente de nombreux avantages comparée à l'administration de protéines recombinantes. En effet, la production à grande échelle de protéines recombinantes coûte cher, et leur efficacité reste limitée à cause d'une élimination ou dégradation rapides dans la circulation sanguine. Celles-ci entraînent la nécessité d'injections répétées et à forte dose de la protéine recombinante. Les forts taux circulants obtenus, ainsi que la répétition des injections entraînent fréquemment des effets indésirables, voire une certaine toxicité. La thérapie génique, par contre, permet une production stable à long terme, et potentiellement régulée de la protéine thérapeutique (voir figure 2). Elle peut aussi permettre une expression localisée du transgène, évitant tout risque lié à la présence systémique de protéine (Chernajovsky, Gould *et al.* 2004).

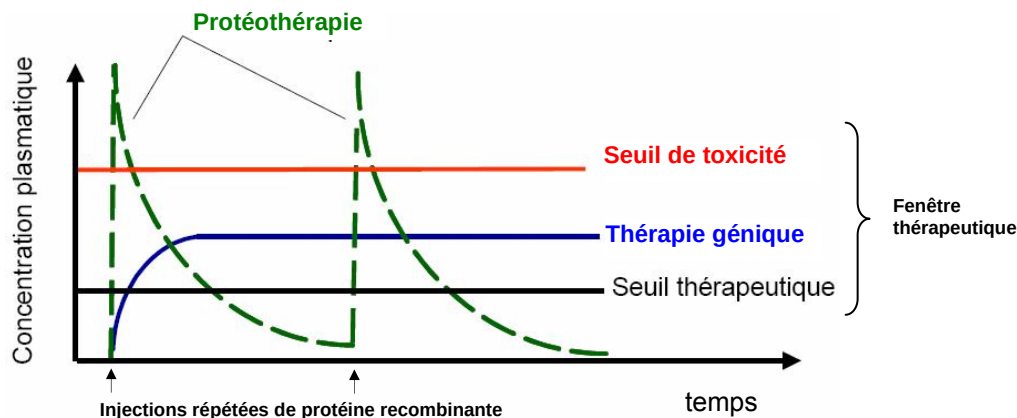


Figure 2: Avantages de la thérapie génique par rapport aux injections répétées de protéine recombinante. D'après le cours de pharmacologie génétique et thérapie génique de Daniel Scherman : <http://lcbbm.free.fr/vecto/principes.pdf>.

B. Diverses approches de la thérapie génique

Née au milieu des années 80, la thérapie génique repose sur l'introduction de matériel génétique (ADN ou ARN) dans les cellules d'un patient, afin qu'il produise ainsi un effet thérapeutique.

Différentes approches peuvent être envisagées (Friedmann 1989) :

Remplacer un gène déficient par l'ADN complémentaire correspondant fonctionnel : il s'agit alors de corriger un défaut, de fonction en apportant la protéine manquante comme dans les maladies monogéniques, telles que la mucoviscidose (dérèglement de la protéine CFTR, Cystic Fibrosis Conductance Transmembrane Regulator, due à une mutation), les myopathies (mutation du gène de la dystrophine pour la myopathie de Duchenne, par exemple) ou les déficiences immunitaires (SCID, déficit en adénosine désaminase, par exemple).

Corriger une mutation ponctuelle : lorsqu'il n'est pas possible d'ajouter un gène fonctionnel pour remplacer un gène défectueux, une approche alternative consiste à effectuer une correction du gène *in situ*. L'objectif de cette stratégie est de corriger des mutations ponctuelles dans la cellule en utilisant par exemple des oligonucléotides hybrides ARN-ADN (chiméraplastes) ou des oligonucléotides simples brins (Kren et Steer 2002).

Inhiber le fonctionnement d'un gène muté ou inactiver son produit protéique : dans

certain cas l'apport d'un gène fonctionnel ne suffit pas. En effet lorsqu'une mutation dans un gène entraîne un gain de fonction, les symptômes de la maladie sont liés à la synthèse d'une protéine anormale à effets délétères.

Corriger un épissage alternatif incorrect : en introduisant un acide nucléique «antisens» inhibant (Goyenvalle, Vulin *et al.* 2004) ou stimulant (Skordis, Dunckley *et al.* 2003) l'épissage défectueux d'un exon. Cette technique est aussi connue sous le nom d'« exon skipping ».

Introduire un gène conduisant à la mort d'une cellule malade : ceci peut être fait directement en introduisant un gène apoptotique par exemple ou indirectement en sensibilisant par exemple des cellules cancéreuses à des médicaments : on introduit dans les cellules cancéreuses un gène qui code une enzyme activant un médicament inactif administré au patient, ce médicament activé détruit alors les cellules cancéreuses (Goto, Nishi *et al.* 2004).

Stimuler une réponse immune au niveau des cellules cibles : il peut s'agir par exemple d'intégrer dans des cellules cancéreuses des gènes codant des protéines qui stimulent le système immunitaire (cytokines, molécules du CMH, antigènes tumoraux). Ce dernier détruit ainsi les cellules tumorales (immunothérapie). Cette stratégie peut être utilisée aussi dans le cas de maladies infectieuses en rendant des cellules cibles résistantes à un virus ou productrices de protéines antivirales.

Ajouter un gène au génome d'une cellule pour produire une protéine thérapeutique : les cellules cibles sont alors utilisées pour l'expression de protéines thérapeutiques pour des facteurs de croissance (maladies cardiovasculaires : VEGF) des facteurs de coagulation (facteurs VIII et IX sanguins pour l'hémophilie), des interleukines, l'érythropoïétine (pour la β -thalassémie ou l'anémie), des anticorps monoclonaux (Noel, Pelegrin *et al.* 2002) ou comme source d'antigène pour la vaccination génétique et la production d'antisérums.

Etudier la fonction d'un gène : au cours des dernières années, un nombre important de gènes ont été découverts grâce au séquençage et au décryptage progressif du génome de nombreuses espèces. Il s'agit donc maintenant de trouver les fonctions de ces gènes.

«Gene farming» : De nombreuses molécules pharmaceutiques sont des protéines complexes obtenues par culture de cellules génétiquement modifiées. Dans certains cas, le procédé de production est très coûteux et la fabrication de médicaments par ce biais est dans la pratique impossible. Pour contourner ce problème, une stratégie consiste à faire produire ces protéines complexes par des animaux (Grosse-Hovest, Muller *et al.* 2004).

La thérapie génique semble donc une alternative de choix pour lutter contre des maladies traitées actuellement de manière imparfaite ou non traitées par les approches pharmaceutiques conventionnelles.

C. Applications cliniques de la thérapie génique.

Depuis le premier essai clinique en 1989, plus de 900 essais ont été réalisés, sont en cours, ou ont été approuvés, avec plus de 100 gènes distincts transférés, dont environ 25% sont des gènes de cytokines (Edelstein, Abedi *et al.* 2004). A l'origine la thérapie génique s'adressait plutôt au traitement des maladies monogéniques héréditaires au cours desquelles le dysfonctionnement d'un gène unique est en cause (mucoviscidose, hémophilie,...), la stratégie thérapeutique consistant à apporter dans la cellule la version fonctionnelle du gène défectueux pour pallier sa fonction déficiente. Cependant le concept de la thérapie génique s'est rapidement étendu aux maladies polygéniques (cancers, maladies neurodégénératives, maladies infectieuses, maladies auto-immunes). Ainsi 66% des essais actuels visent le traitement des cancers, contre environ 10% les maladies monogéniques, les autres domaines d'application principaux étant les maladies vasculaires et infectieuses (voir figure 3).

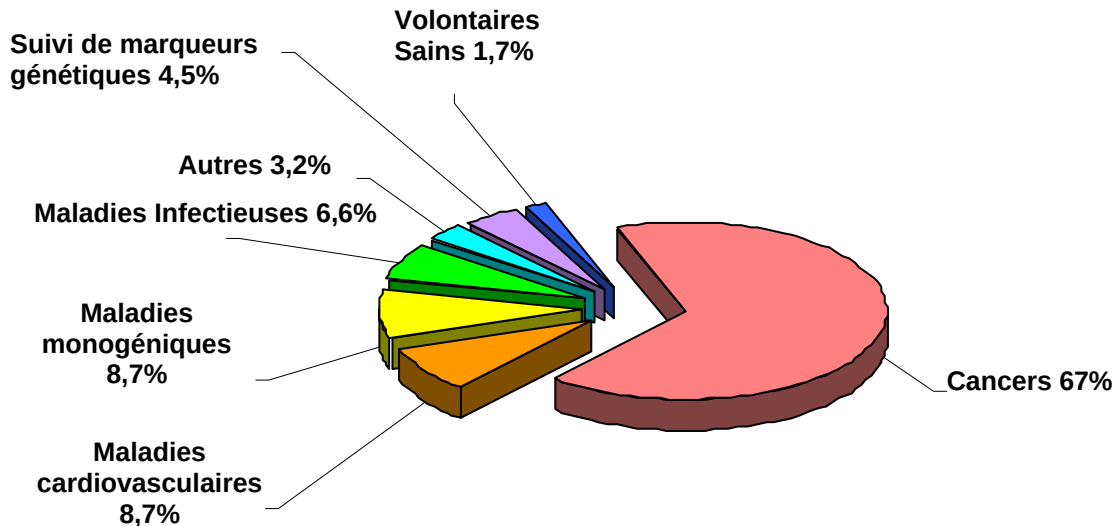


Figure 3 : Les cibles thérapeutiques du transfert de gènes. Le pourcentage indiqué correspond aux protocoles d'essais cliniques menés dans les différents domaines. D'après le site web Witey Genetic Medecine : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/> (Source 2006).

L'utilisation de la thérapie génique requiert la mise au point de méthodes efficaces pour introduire les séquences d'intérêt dans les cellules cibles, appropriées à la situation. La connaissance du défaut génétique ou de l'origine des dysfonctionnements responsables de la maladie est également indispensable pour déterminer le gène cible.

Les stratégies de thérapie génique actuelle ne doivent être réalisées, par principe éthique et légal, que sur les cellules somatiques, et non pas sur les cellules germinales, afin d'éviter la transmission des caractères modifiés à la descendance (Wadman 1998).

II. Les divers acides nucléiques transfectés dans le cadre des thérapies géniques

De manière générale le transfert d'acides nucléiques désigne la pénétration, au sein des cellules, d'acides nucléiques d'origine exogène présents dans le milieu de culture *in vitro* ou au niveau d'un tissu *in vivo*. Le transfert pouvant se faire dans des cellules procaryotes aussi bien que dans des cellules eucaryotes (animales ou végétales), mais dans le cadre de cette thèse seul le transfert dans les cellules eucaryotes animales sera traité. Lorsque rien n'est précisé, le terme « cellule » fera donc à chaque fois référence aux cellules eucaryotes animales.

Les acides nucléiques transférés peuvent être très divers en terme de structure et d'applications. Il est tout de même possible de distinguer deux grands types intéressants pour les transferts :

- les molécules généralement de poids moléculaires intermédiaires (de l'ordre de 15 000 daltons) utilisées dans les stratégies de régulation de l'expression génique par de courts acides nucléiques synthétiques (comme les oligonucléotides antisens et les siRNA)
- et les séquences d'ADN codantes beaucoup plus grosses (de l'ordre de 3,25 millions de daltons pour un plasmide classique de 5kb).

A. Les acides nucléiques utilisés dans le cadre de la régulation temporelle de l'expression des gènes

Dans le contexte du transfert de gènes *in vivo*, il est très utile voire même indispensable de disposer d'un système de régulation de l'expression de gènes, que ce soit pour appréhender leur fonction ou pour moduler leur activité à des fins thérapeutiques.

À l'heure actuelle, la connaissance de l'ensemble du génome humain a comme conséquence le clonage et la caractérisation fonctionnelle de nombreuses nouvelles protéines, qui exigeront des études fonctionnelles à la fois *in vitro* et *in vivo*. Étudier la fonction d'un gène nécessite souvent l'expression du gène à un moment bien particulier (par exemple lors du développement), d'où l'intérêt de disposer d'un système de régulation efficace. En effet, éteindre totalement ces gènes (animaux K-O) ou les surexprimer (animaux transgéniques) peut parfois conduire à une létalité embryonnaire (Yamamoto, Hen *et al.* 2001; Backman, Zhang *et al.* 2004).

Chez les eucaryotes, la plupart des gènes sont localisés dans le noyau des cellules. Leur expression ayant lieu dans le cytoplasme, il faut un intermédiaire qui permette la transmission fidèle de l'information d'un compartiment à l'autre : c'est l'ARN messager (ARNm) qui joue ce rôle pivot dans la cellule. Deux approches ont été envisagées : agir soit en amont de la synthèse de l'ARNm en modulant l'activité des promoteurs qui en contrôle la transcription, soit au niveau ou surtout en aval de la transcription, en neutralisant la molécule d'ARN messager (voir figure 4).

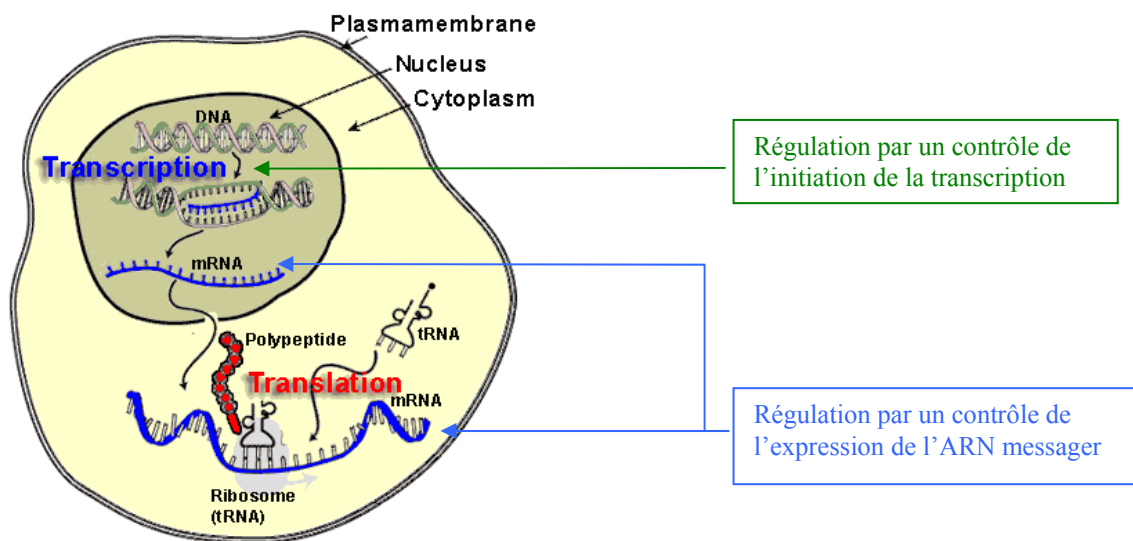


Figure 4 : Schéma général de la synthèse d'une protéine avec les différentes étapes de transcription et de traduction ainsi que les deux stratégies de régulation possibles.

Ces stratégies de régulations peuvent être appliquées sur des gènes endogènes ou des gènes hétérologues portés par des vecteurs. Ces nouvelles approches sont intéressantes pour étudier les effets pharmacologiques de l'inhibition de l'expression d'un gène et particulièrement prometteuse comme agent thérapeutique pour le traitement d'infections virales, de cancers ou de maladies inflammatoires.

Il existe de nombreuses stratégies pour éteindre le produit d'un gène : des stratégies anti-gènes et des stratégies à anti-ARN messager (voir figure 5) (pour une revue : voir (Jen et Gewirtz 2000; Achenbach, Brunner *et al.* 2003)). La méthode de choix dépendra de plusieurs paramètres parmi lesquels : la durée souhaitée de l'action inhibitrice, la stabilité et la localisation de la protéine, l'accessibilité de la cellule cible

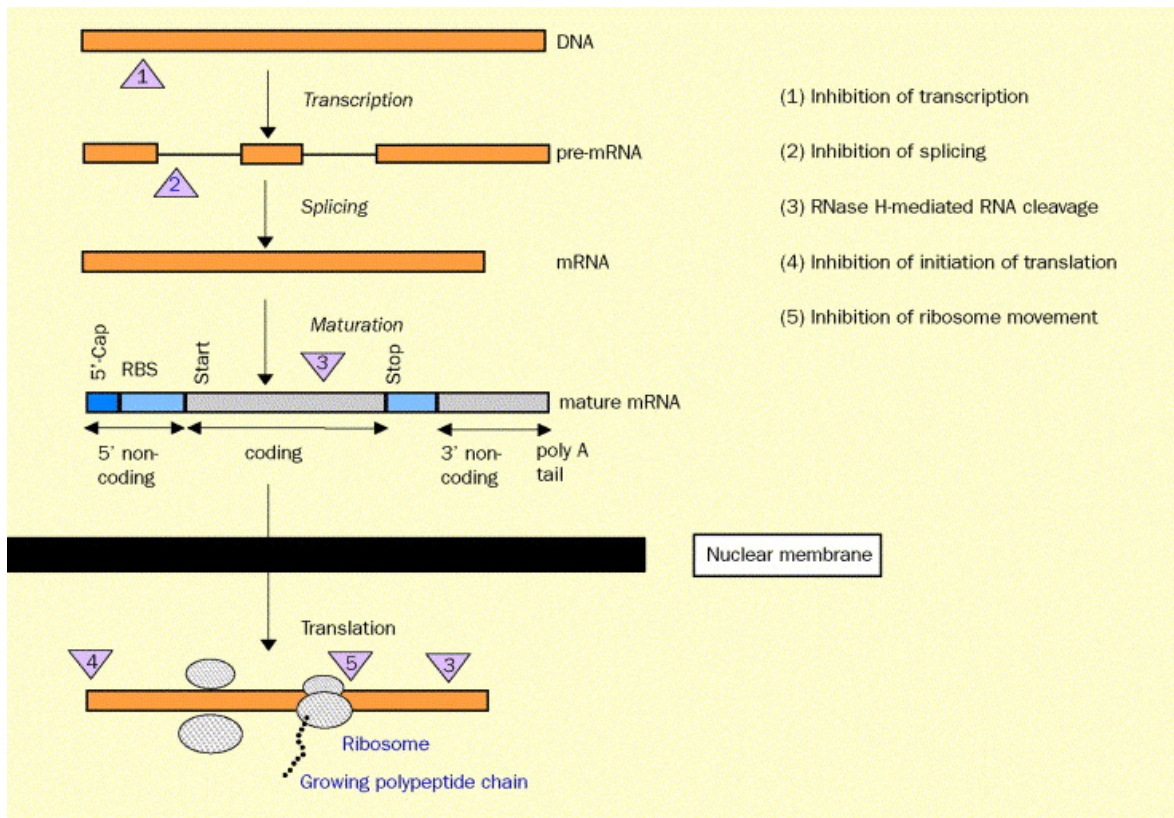


Figure 5 : Schéma général des différentes stratégies de régulation. D'après (Jansen et Zangemeister-Wittke 2002).

1. Stratégies anti-gène : ciblage direct du gène d'intérêt.

Knock-out par recombinaison homologue : interruption physique du gène cible par recombinaison homologue entre le chromosome contenant le gène cible et un vecteur contenant une version mutée du gène cible (Marth 1996). La recombinaison homologue s'effectue lors de la division cellulaire. Cette technique est cependant peu efficace (rendement de recombinaison faible) et très coûteuse. Elle reste uniquement applicable pour des lignées cellulaires ou des modèles animaux, mais en aucun cas pour des applications cliniques car elle nécessite une sélection des cellules dans lesquelles l'événement de recombinaison a eu lieu.

TFO (Triplex Forming Oligonucleotide) : utilisation d'oligonucléotides synthétiques capables de s'hybrider avec de l'ADN double brin. La formation d'une triple hélice entre l'oligonucléotide et le double brin d'ADN empêche la transcription. La formation de la triple hélice nécessite la formation de deux liaisons hydrogène entre chaque base du TFO et la séquence complémentaire dans le duplex d'ADN. Ceci contraint les TFO à pouvoir s'hybrider uniquement sur les bases purines de groupements polypurines-polypyrimidiques de l'ADN. L'efficacité de ces TFO est cependant limitée par l'accessibilité de l'ADN, compacté dans la structure chromosomique, et par la faible stabilité de la triple hélice.

Leurres (decoy) : utilisation d'ADN double brin synthétique comme leurre pour les facteurs de transcription nécessaire à l'expression d'un gène cible. En effet ces facteurs reconnaissent et se lient sur des secteurs spécifiques d'ADN. Il est donc possible d'introduire des séquences d'ADN synthétiques qui vont entrer en compétition avec les séquences d'ADN natives inhibant ainsi l'expression de l'ADN natif (Morishita, Gibbons *et al.* 1995).

2. Stratégies anti-ARNm

L'idée est dans ce cas de cibler l'ARNm d'un gène d'intérêt, prévenant ainsi la synthèse de la protéine correspondante. D'un point de vue stœchiométrique, cette stratégie peut paraître moins favorable qu'une stratégie anti-gène, mais elle est cependant attractive car l'ARNm est en définitive plus accessible, car il n'est pas sous forme de chromatine compacte.

Il existe deux approches :

Les leurres : utilisation d'oligonucléotides qui jouent le rôle d'un site de fixation alternatif ou leurres pour des éléments stabilisateurs qui interagissent normalement avec un ARNm donné. En éloignant ces protéines stabilisatrices de l'ARNm, le decoy ou leurre, induit une déstabilisation et donc une destruction de l'ARNm.

Les approches antisens : utilisation de séquences d'acides nucléiques antisens (complémentaires) entraînant la formation intracellulaire d'un hybride entre l'ARN messenger cible et la séquence en antisens par un appariement des bases complémentaires. Le duplex ainsi formé empêche la traduction de l'ARN initial et initie les mécanismes conduisant à sa destruction. Les différents types de séquences antisens, qui varient selon leur nature chimique, peuvent agir à différentes étapes de la synthèse d'une protéine mais ils ont tous comme fonction ultime d'inhiber la synthèse de cette protéine (Weiss, Davidkova *et al.* 1999).

L'approche antisens est la plus utilisée et l'acide nucléique antisens peut prendre différentes formes (voir tableau 1).

Approche	Description	Avantages	Inconvénients
ARN antisens	ARN	longue durée d'action, possibilité de promoteur tissu-spécifiques (ciblage tissulaire), possibilité de promoteurs inductibles	nécessité de parvenir au noyau pour être transcrit
ODN	ADNsb	facilité de production, ciblage des introns, modifications chimiques possibles ($\uparrow$ sélectivité, $\uparrow$ efficacité), bonne pénétration cellulaire	molécule synthétique donc délivrance exogène, activité aptamère, réponse interférons, effet non spécifique possible
RNAi	ARNdb	efficace à faible concentration, facilité de délivrance, expression tissu-spécifique possible, stabilité sans modification chimique car ARNdb	actifs uniquement dans le cytoplasme (pas de ciblage d'introns, ni d'ARN nucléaires), effet non spécifique possible, pas d'optimisation possible
Ribozyme	ARN	haute spécificité (discrimine à une base près), domaine catalytique simple, ciblage des introns ou de compartiments subcellulaires	limitations du choix de la cible (triplets GUC), activité aptamère
DNAzyme	ADNdb	facilité de production, modifications chimiques possibles	délivrance exogène, effet non spécifique possible ?
aptamère	ADN ou ARN	diversité des structures générées, sélection rapide par la méthode SELEX	nécessité du maintien de la conformation <i>in vivo</i> , délivrance exogène.

Tableau 1 : Avantages et inconvénients des différentes approches antisens.

a) ARNm antisens codé par un vecteur :

On introduit dans la cellule cible un vecteur codant le gène d'intérêt en orientation antisens. Il y aura donc transcription d'un ARNm complémentaire de l'ARNm cible. La formation intracellulaire d'un hybride entre l'ARNm naturel et la séquence antisens inhibe la synthèse de la protéine par deux mécanismes possibles. (i) en bloquant physiquement l'accès à la machinerie transcriptionnelle ou (ii) en marquant l'ARN pour une dégradation par la RNase III (la RNase III hydrolyse des ARN double-brins).

Les principaux avantages de ses longs ARN antisens sont leur grande spécificité d'hybridation et le fait qu'ils soient synthétisés en permanence par la cellule (Shi, Gumerlock *et al.* 2001).

b) Oligodésoxynucléotides antisens (ODN) :

Les oligodésoxynucléotides antisens ont été développés dans les années 80 (Zamecnik et Stephenson 1978) où il a été montré qu'un oligodésoxynucléotide antisens pouvait bloquer la réplication virale.

On introduit dans la cellule cible un cours oligonucléotide synthétique (entre 15 et 25nt en général) d'ADN, complémentaire de sites spécifiques sur la séquence de l'ARNm cible, formant ainsi un hybride ARN/ADN. Il s'ensuit différents mécanismes possibles pouvant conduire à l'extinction du gène ciblé : changement conformationnel de l'ARNm induit par la fixation de l'oligodésoxynucléotide, interruption de l'épissage de l'ARN pré-messager, interruption du transport, arrêt de l'assemblage du ribosome au début de la traduction, activation de la ribonucléase H ou perturbation de la stabilité du transcrit. Sur la base du mécanisme d'action, on peut discerner deux classes d'ODN antisens : (a) les oligonucléotides antisens dépendant de la RNase H, qui induisent la dégradation de l'ARN messager ; et (b) les oligonucléotides bloqueurs stériques, qui inhibent ou bloquent physiquement la progression de l'épissage ou la machinerie traductionnelle.

La majorité des ODN antisens utilisés fonctionnent via un mécanisme dépendant de la RNase H (voir figure 6). La RNase H est une enzyme ubiquitaire qui hydrolyse le brin d'ARN d'un hybride ARN : ADN. Ces ODN antisens peuvent être très efficaces, l'inhibition de l'expression d'un gène pouvant atteindre 80 à 95 %. De plus, contrairement aux ODN antisens bloqueurs stériques, les ODN antisens dépendants de la RNase H peuvent inhiber l'expression d'une protéine quelle que soit la région de l'ARNm ciblée, alors que les ODN bloqueurs stériques sont efficaces uniquement s'ils ciblent des régions 5' ou la région du codon initiateur AUG (Dias et Stein 2002).

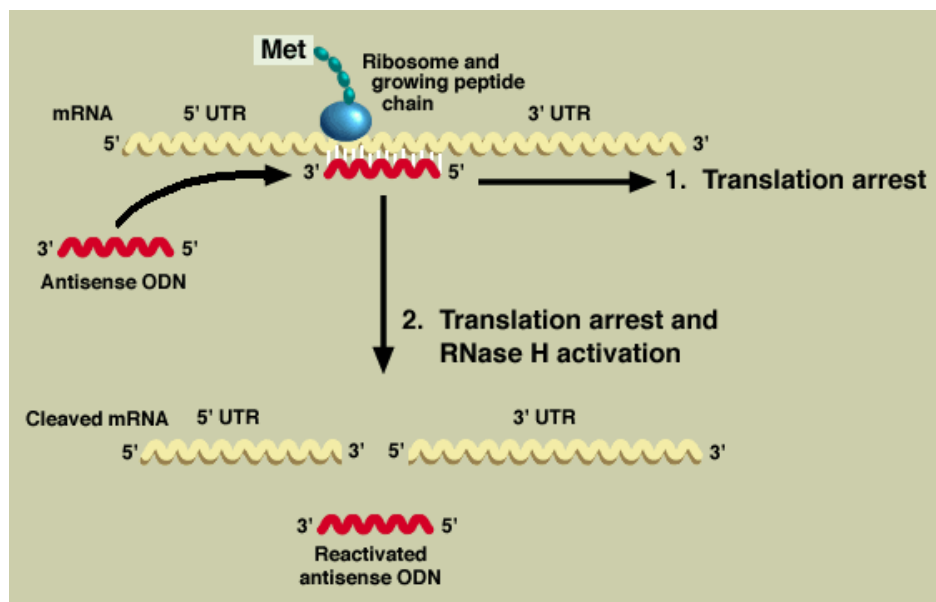


Figure 6 : Schéma du mécanisme d'inactivation de l'ARNm par un ODN antisens. Source : http://laxmi.nuc.ucla.edu:8248/M248_98/antisense/inactiv.html.

Depuis les années 90, le squelette des ODN antisens a été modifié chimiquement pour augmenter leur solubilité, leur stabilité, leur efficacité, leur résistance aux nucléases, et leur

pénétration dans les cellules (pour une revue : voir (Ravichandran, Dean *et al.* 2004)) (voir figure 7).

- **Les phosphorothioates** : sont les plus utilisés car ils sont relativement stables dans la circulation sanguine et capable d'atteindre quasiment tous les types cellulaires lors d'une injection intraveineuse, de plus ils restent des substrats de la RNase H. Cependant ils ont une haute affinité pour de nombreuses protéines cellulaires conduisant à des effets non spécifiques de la séquence. De plus, à forte dose, ils inhibent les polymérases et la RNase H pouvant ainsi les rendre inefficaces comme agent antisens. Ils sont par ailleurs toxiques.

- **Les modifications en 2'** : O-méthyl, fluoro, O-propyl, O-allyl entraînent l'augmentation de la stabilité des duplex avec l'ARNm avec des effets antisens indépendants de la RNase H. Les premiers ODN modifiés furent des méthylphosphonates, qui se révélèrent cependant inefficace lors d'essais *in vivo*.

- **Les modifications du squelette** : une nouvelle génération a vu le jour avec les PNA à (Peptide Nucleic Acids) dont le squelette est constitué d'acides aminés et sur lesquelles sont greffées les bases (Koppelhus et Nielsen 2003). Ils sont donc chimiquement plus apparentés avec les protéines que les acides nucléiques, mais peuvent former avec les acides nucléiques (ADN ou ARN) des hybrides plus stables que les hybrides nucléiques. L'introduction dans les cellules de PNAs complémentaire à une séquence cible peut ainsi conduire à l'extinction d'un gène.

Les ODN phosphorothioates et méthoxyéthyl sont déjà utilisés dans des essais cliniques (pour une revue : voir (Dove 2002), par exemple l'ODN genasens (Genta, USA) qui cible Bcl2 pour les mélanomes métastatiques, ou sont même commercialisés comme le Vitravene (Isis Pharmaceuticals, USA) qui est un ODN phosphorothioate antisens utilisé pour traiter la rétinite à CMV (cytomégalovirus) chez certaines personnes infectées par le VIH.

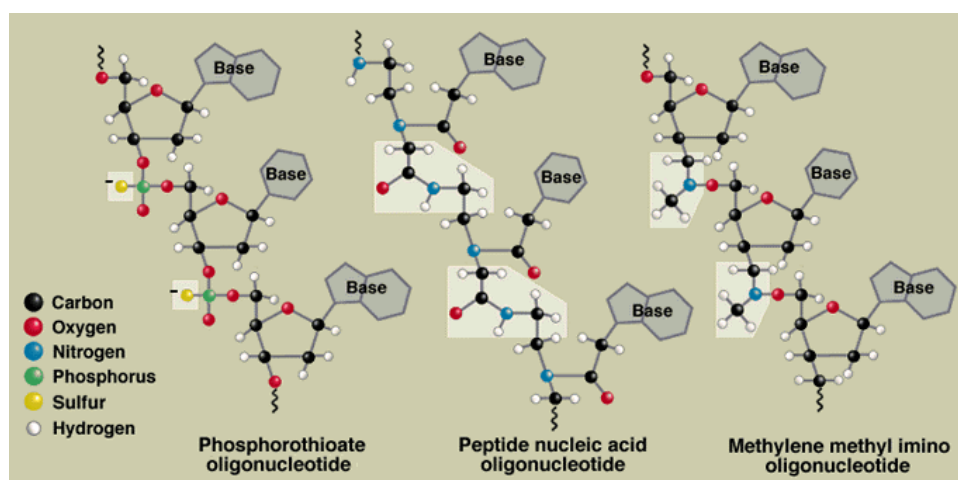


Figure 7 : Schéma de certaines des modifications structurales du squelette des ODNs. Source : http://laxmi.nuc.ucla.edu:8248/M248_98/antisense/modif_DNA.html.

A l'heure actuelle leur efficacité est moindre que celle des petits ARN interférants.

c) ARNi (ou ARN interférence) :

La technique d'ARN interférence consiste à utiliser de l'ARN double brin qui induira une extinction de l'ARNm correspondant.

L'ARNi est à la base un mécanisme de défenses naturelles, conservé chez la plupart des eucaryotes, et largement exploité pour contrôler l'expression des gènes de développement ainsi que dans la lutte antivirale de la cellule face à une invasion par des agents étrangers tels

que des rétrovirus. C'est un processus post-transcriptionnel qui est déclenché par l'introduction d'ARN double brin (ARNdb) dans la cellule et qui mène à l'inactivation d'un gène d'une manière séquence-spécifique. Ce phénomène naturel connu depuis plusieurs années a été initialement découvert dans les plantes (post-transcriptional gene silencing, PTGS) dans les années 1990 (Napoli, Lemieux *et al.* 1990). Paradoxalement, la surexpression d'un transgène y provoquait la répression des transcrits qui lui étaient homologues.

Selon le modèle actuel (voir figure 8), les ARNdb présents dans une cellule seraient reconnus par une ribonucléase III nommée DICER (Bernstein, Caudy *et al.* 2001) qui les dégraderait en petits ARN interférants d'environ 21-23 nucléotides. Ces siRNA (small interfering RNA) s'associeraient alors avec un complexe multiprotéique à activité nucléasique, le complexe RISC (« RNA-induced silencing complex », localisation cytoplasmique) de façon à cliver spécifiquement tout ARN leur étant homologue (y compris les ARNm fonctionnels), ce qui entraînerait la répression post-transcriptionnelle. Les siRNA sont incorporés dans le complexe RISC où ils sont déroulés grâce à l'activité hélicase du complexe. Une fois déroulé, le simple brin guide le complexe RISC vers l'ARNm cible de séquence complémentaire et il en résulte un clivage endonucléotique de l'ARN conduisant à une inhibition de l'expression des protéines correspondantes (Achenbach, Brunner *et al.* 2003).

Ce mécanisme a été récemment appliqué avec succès comme outil moléculaire pour éteindre l'expression de gènes. La stratégie employée consiste à court-circuiter l'enzyme Dicer, en faisant exprimer directement dans la cellule des siRNA spécifiques de l'ARNm cible. L'activation des mécanismes de défense aspécifiques et létaux, par de longs ARNdb, est ainsi évitée (Hannon 2002).

Dans la nature les ARNdb et siRNA peuvent être produits de plusieurs manières :

- l'expression de transgènes, virus ou transposons peut créer des ARNm aberrants (« abRNA ») qui sont rendus double brin par la synthèse du brin complémentaire via des ARN polymérases dépendantes de l'ARN.
- des transgènes transcrits normalement mais conduisant à des ARN à structure double brin (insertion inversée-répétée) peuvent également déclencher ce mécanisme.
- de la même façon, des locus endogènes aux eucaryotes comportent des sections menant à la production de petits ARN interférants (alors généralement appelés miRNA ou stRNA chez *C. elegans*) dirigés contre des gènes régulant le développement (Ronshaugen, Biemar *et al.* 2005).
- des ARN viraux sont également la cible de ce processus.

Plusieurs autres protéines ont un rôle en PTGS (post-transcriptional gene silencing), dont les homologues Argonaute (AGO). Ils interagissent aussi avec les siRNA et le complexe RISC.

Le PTGS n'est donc pas un mécanisme isolé, mais une voie métabolique complexe et ramifiée, ayant des implications dans plusieurs systèmes cellulaires vitaux.

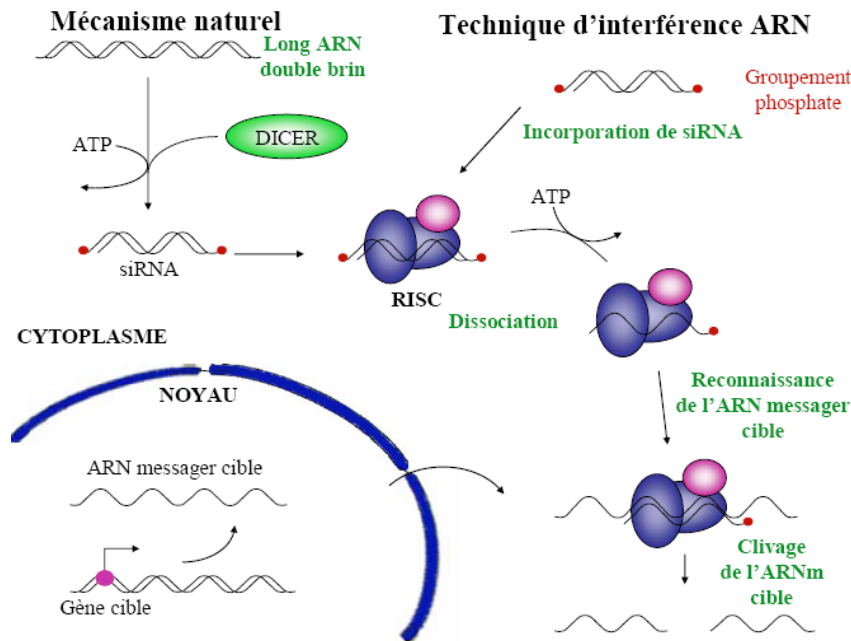


Figure 8 : Mécanisme de l'interférence ARN. La technique d'interférence ARN se fait par incorporation directe de petits ARN double brin dits siRNA (phosphatés en 5', et possédant une extrémité 3'OH sortante de deux nucléotides). Ils sont pris en charge par le complexe RISC pour être dissociés. La protéine R2D2 de RISC sélectionne l'ARN antisens qui est destiné à reconnaître le messenger cible. L'appariement parfait du siRNA du complexe RISC sur le messenger cible engendre son clivage par l'endonuclease Slicer, ce qui rend le messenger accessible aux ribonucléases cytoplasmiques qui le dégradent complètement. Source : revues de l'UE de Séminaires Bibliographiques du M2 de Virologie 2005-2006, http://www.biochimie.univ-paris7.fr/master/pdf/tot_revues_2005_2006.pdf.

La répression génétique post-transcriptionnelle présente plusieurs avantages. D'abord, cette technique est beaucoup moins fastidieuse que la mutagenèse insertionnelle. Le PTGS conduit à la répression de toutes les copies d'un même gène, à l'opposé de la mutagenèse insertionnelle qui n'affecte que la copie génomique où le T-DNA s'est inséré.

Contrairement aux dominants négatifs pour lesquels, seules se prêtent à l'utilisation les protéines multimériques dont la structure a été caractérisée en détail, le PTGS est applicable à tous les types de gènes dont la séquence a été clonée. Généralement plus efficace que les oligonucléotides antisens (Miyagishi, Hayashi *et al.* 2003; Xu, Linde *et al.* 2004), elle mène à des répressions mesurables pouvant atteindre 90 à 100% de l'expression (Xu, Linde *et al.* 2004). Pour la technique d'ARN antisens, la répression avoisine plutôt les 70 % (Forster et Schwenzer 2004). Cependant dans certains cas l'efficacité des deux approches semble similaire (Tsui, Rubenstein *et al.* 2005).

De plus, plusieurs caractères généraux font du PTGS une technique avantageuse. La variation d'intensité de répression souvent constatée d'une lignée à une autre peut permettre l'observation de phénotypes nuancés ou encore la viabilité de mutants qui seraient autrement létaux lors d'une inactivation complète. Finalement, le phénotype de répression - qui est héréditaire- demeure constant au sein des générations et ségrégue comme un caractère mendélien dominant, observable même chez l'hétérozygote (Grishok 2005).

d) Ribozyme :

Ce sont des ARN catalytiques capables de cliver et/ou de former des liaisons covalentes de très haute spécificité avec l'ARN naturel cible complémentaire auquel ils sont appariés, sans l'aide d'enzymes (Samarsky, Ferbeyre *et al.* 1999). En effet, ils sont dotés d'une activité hydrolase, portée par une courte séquence consensus dérivée des ribozymes « têtes de

marteaux » («hammerhead») et «épingle à cheveux» («hairpin») (voir figure 9). Ils ont l'avantage d'inactiver définitivement la cible. Cet outil a été largement utilisé pour inhiber de façon spécifique l'expression d'un gène cible en clivant son ARNm cible, plus spécialement pour le traitement de maladie d'origine virale, génétique ou cancéreuse. De la même façon que les ODN, les ribozymes se lient à l'ARN cible par des liaisons de type Watson-Crick ce qui entraîne un clivage spécifique de la séquence. Ces agents devraient avoir une meilleure efficacité que les ODN dépendants de la RNase H car ils font intervenir une cinétique avec deux biomolécules uniquement au lieu de trois pour les ODN (l'ODN, l'ARNm et la RNase H). De plus ces ribozymes peuvent être modifiés chimiquement comme les ODN ou peuvent être exprimés à partir d'un vecteur ce qui permet d'avoir une production en continu de ces molécules dans la cellule. Cependant pour fonctionner ces ribozymes doivent non seulement se lier à l'ARNm cible pour le cliver mais ensuite se détacher de l'ARNm pour agir sur d'autres ARNm. Cette étape de dissociation est souvent l'étape limitante. (Pour une revue : voir (Sioud 2006)).

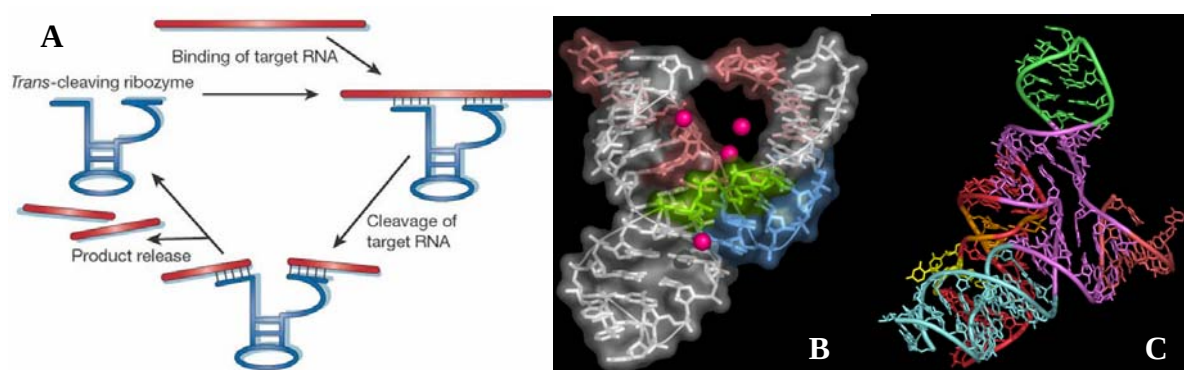


Figure 9 : (A) Application du clivage de l'ARNm par une ribozyme pour l'inhibition d'un gène. D'après (Sullenger et Gilboa 2002). (B et C) Exemples de structure d'une ribozyme de type « hammerhead » (B) et « hairpin » (C). Source : <http://www.chem.ucsb.edu/~molvisual/>.

e) DNAzyme :

Ce sont des séquences d'ADN ayant une activité catalytique (Silverman 2004) et permettant donc, tout comme les ribozymes, d'inhiber l'expression d'un gène (Bhindi, Khachigian *et al.* 2006). L'attrait des DNAzymes par rapport aux ribozymes est leur facilité de production et leur plus grande stabilité du fait que ce soit de l'ADN et non de l'ARN. De la même façon, ces DNAzymes peuvent être modifiés chimiquement.

f) Aptamères :

Contrairement aux stratégies précédentes qui faisaient appel à des inhibiteurs de séquences spécifiques, complémentaires des ARN cibles, les aptamères sont engendrés à partir d'une banque aléatoire d'oligonucléotides. Ces derniers sont sélectionnés pour leur capacité à se fixer avec une forte affinité sur la structure du substrat cible intracellulaire qui peut-être de nature très variée telle que des ARN mais aussi des ADN, des protéines ou des acides aminés. Des cycles d'amplification/sélection (méthode SELEX : systematic evolution of ligand by exponential enrichment) permettent l'identification de motifs montrant une bonne affinité pour la cible, et qui présentent ainsi un intérêt thérapeutique (Toulmé et Giegé 1998).

g) Points clés intervenant dans l'efficacité d'un antisens :

De nombreuses considérations doivent être prises en compte pour utiliser efficacement ces stratégies antisens sur des cellules :

(1) Sélection du site cible sur l'ARNm : l'ARNm dans une cellule est rarement linéaire. Il forme des structures secondaires complexes et interagit avec de nombreuses protéines cytoplasmiques. Le résultat final est une molécule d'ARNm en grande partie cachée, et seule de petites parties de la séquence totale de l'ARNm sont accessibles pour l'hybridation. Des techniques ont été mises en place pour détecter ces régions cibles : on peut citer en particulier l'utilisation de la RNase H comme indicateur des sites accessibles (un mélange d'ODN spécifiques de différentes régions de l'ARNm est mis en incubation avec l'ARNm puis l'ensemble est traité à la RNase H. On détecte ensuite par RT-PCR les sites qui ont été rendu vulnérables à la RNase H par les ODN.)

(2) Problème du transfert : une des principales limitations de l'utilisation d'oligodésoxynucléotides est le problème de leur transfert aux cellules cibles. Non complexés, ces ODN sont peu internalisés dans les cellules et rapidement dégradés : on les utilise principalement combinés à un vecteur chimique (comme par exemple des lipides cationiques, des porphyrines cationiques, des peptides fusogènes ou du PEI (Jen et Gewirtz 2000) ou associés à une méthode physique telle que l'électroporation.

(3) Localisation : il faut une colocalisation de l'ARNm et de l'agent antisens dans le même compartiment intracellulaire. Le trafic intracellulaire joue un rôle très important. De nombreux facteurs intervenant dans cette localisation de l'agent antisens : la nature de l'agent antisens lui-même, le vecteur, le type cellulaire. L'ARNm peut se situer dans différents compartiments cellulaires : le cytoplasme, le noyau, les nucléoles. Il ne semble pas y avoir de site de localisation préférentiel, le choix de la stratégie détermine le site optimal pour un effet antisens. Une étude a montré qu'en utilisant un ribozyme attaché à des petits ARN nucléolaires (snoRNA) on atteignait une efficacité de dégradation de 100 % d'un ARN cible lui aussi dirigé dans le nucléole par des snoRNA (Samarsky, Ferbeyre *et al.* 1999). Le substrat est dans ce cas artificiel mais l'idée reste intéressante.

B. Les séquences codantes d'ADN

L'autre grande catégorie d'acides nucléiques dont le transfert est intéressant est constituée par les séquences codantes d'ADN ou transgènes. Dans le cadre du transfert de gènes, la molécule d'ADN introduite, une fois la membrane plasmique passée, va devoir atteindre le noyau pour y être transcrite en ARNm. Celui-ci devra ensuite retourner dans le cytoplasme pour y être traduit en protéines, dans le cas du transfert de séquences codant pour des protéines. Les différentes techniques de transfert facilitent la réalisation de certaines de ces étapes aboutissant à la synthèse d'une protéine suite à l'apport de sa séquence codante. Selon le type de vecteur de transfection utilisé la cassette d'expression contenant le transgène sera insérée dans un plasmide ou dans une séquence virale. La cassette d'expression comporte, en plus de la séquence d'ADN codant pour la molécule d'intérêt proprement dite, des séquences permettant diverses régulations de la transcription et de la traduction (voir chapitre III. E. de l'introduction) (voir figure 10).

Plusieurs applications sont possibles pour le transfert d'ADN codant. Pour les applications thérapeutiques le gène va coder pour une protéine remplaçant, inhibant ou suppléant la fonction de la protéine endogène dont l'expression altérée est responsable de la pathologie. C'est le principe utilisé dans les thérapies géniques qui visent à soigner les maladies génétiques mais aussi les autres pathologies telles que les cancers. Le transfert d'ADN est aussi intéressant du point de vue de la recherche expérimentale. Il est ainsi possible d'étudier le rôle de certaines molécules en contrôlant leur expression grâce au

transfert de gènes, apportant alors de précieuses informations sur les mécanismes impliqués dans la physiologie et la pathologie cellulaire.



Figure 10 : Schéma des différents éléments fonctionnels contenus dans un plasmide. cDNA : séquence du gène d'intérêt ; Promoteur : séquence contrôlant l'expression du transgène dans la cellule de mammifère ; Sélection : séquence du gène permettant la sélection des bactéries transfectées (généralement un gène de résistance à un antibiotique) ; Origine de réplication : origine de réplication bactérienne permettant la multiplication du plasmide au sein de la bactérie hôte.

Au cours des différentes étapes du transfert plusieurs obstacles vont devoir être franchis afin d'obtenir un transfert efficace. Les différents points importants pour la réussite d'un transfert sont : le choix et l'obtention des acides nucléiques désirés en quantités et qualités suffisantes (purification, isolation, modification des séquences et structures, choix des promoteurs,...), ainsi que la capacité à les introduire efficacement dans les cellules in vitro ou in vivo.

Comme on l'a vu dans le chapitre précédent, il existe déjà à l'heure actuelle une très grande variété de séquences et de structures d'acides nucléiques intéressantes à transférer. Le transgène étant relativement facile à définir dans le cas des maladies monogéniques et plus délicat pour les pathologies polygéniques (nécessitant une bonne connaissance des mécanismes physiopathologiques de la maladie).

Leur purification, modification, isolation et production sont désormais des techniques largement maîtrisées au sein de nombreux laboratoires permettant d'obtenir les quantités et qualités requises. Cependant, les outils utilisés pour faire pénétrer ces acides nucléiques au sein des cellules, s'ils sont suffisamment efficaces in vitro, restent l'enjeu technique essentiel du transfert d'acides nucléiques et des applications qui en découlent in vivo.

Le succès de l'introduction d'acides nucléiques dans des cellules va dépendre de très nombreux paramètres, surtout in vivo. Outre le passage de la membrane et l'accès au noyau, l'efficacité du transfert repose aussi sur la proportion et le nombre de cellules transfectées, le nombre de molécules introduites par cellule et enfin la régulation et le maintien de l'effet recherché par le transfert (expression, extinction, réactions immunitaires si les produits possèdent des néoépitopes,...).

III. Les étapes du transfert d'acides nucléiques

Pour introduire des acides nucléiques exogènes dans une cellule, outre la production des dits acides, il faut d'abord réussir à les emmener au contact des cellules cibles, puis à leur faire passer la barrière de la membrane plasmique, ensuite à les faire circuler au sein du cytoplasme vers le noyau, passer l'enveloppe nucléaire pour enfin les faire accéder au noyau

qui est souvent le lieu principal de leur action. Au cours de ces différentes étapes les acides nucléiques devront faire face à d'autres phénomènes limitant tels que les dégradations et les réactions immunitaires. Afin de faciliter ces différentes étapes, divers vecteurs ont été développés, basés sur des virus ou des constructions chimiques ou des méthodes physiques, ils sont présentés dans le chapitre IV de cette introduction.

A. Amener les acides nucléiques à proximité de la cellule cible

In vitro le problème ne se pose pas vraiment, il suffit de mettre les acides nucléiques à transférer dans le milieu contenant les cellules. Il existe cependant un processus permettant d'augmenter très fortement les probabilités d'interaction *in vitro* entre les acides nucléiques à transférer et les cellules cibles : c'est la « magnétofection » (voir paragraphe III.A.5. et IV.B.3.g. de l'introduction de cette thèse) qui est également utilisée *in vivo*.

In vivo la situation est plus complexe car les cellules cibles sont incluses dans des tissus plus ou moins faciles d'accès. Selon les cellules ciblées différentes méthodes sont utilisables pour amener les acides nucléiques au contact des cellules, les deux principales étant l'injection locale et l'injection intraveineuse. Une fois les acides nucléiques à proximité des cellules, une barrière peut encore limiter l'accès direct à la membrane plasmique : la matrice extracellulaire.

1. Injection locale

Une des méthodes les plus simples consiste à injecter les molécules directement dans le tissu contenant les cellules cibles.

C'est une technique qui a l'avantage d'être très simple à mettre en œuvre et rapide. L'administration locale présente l'avantage de concentrer l'ADN thérapeutique dans le tissu cible et d'éviter ainsi une trop grande dilution et des pertes notamment par dégradation enzymatique des acides nucléiques par les nucléases présentes dans le plasma, ou comme dans le cas de l'utilisation de certains vecteurs chimiques qui seront reconnus dans le sang par le complément et dégradés.

Le liquide injecté reste donc très localisé ce qui est à la fois un avantage et une limite de cette technique. En effet la solution injectée est peu diluée et l'étendue de la zone transfectée est ainsi bien contrôlée, mais il est, du coup, difficile de traiter de grands volumes de cellules, sans recourir à de très nombreuses injections et sans injecter de grands volumes (le volume à injecter étant dans ce type d'injections directement proportionnel au volume à transfecter). De plus cette technique n'est pratique que pour les cellules relativement faciles d'accès telles que les cellules de la peau ou de tissus relativement proches du milieu extérieur (comme les muscles qui se trouvent juste sous la peau), mais dans le cas de cellules contenues dans des tissus internes comme le foie, la rate, ..., l'injection locale directement dans le tissu cible nécessite le recours à des procédés chirurgicaux ou de localisation assistée par imagerie beaucoup plus contraignants.

Enfin le recours à l'injection locale pose aussi le problème de la bonne distribution du liquide et des acides nucléiques au sein du tissu. Lors d'une injection locale la solution injectée ne se distribue pas toujours de manière homogène au sein du tissu ciblé et certaines zones ne sont pas du tout atteintes par le liquide et ne seront donc pas transfectées (voir figure 11). Qui plus est, même si la solution contenant les acides aminés arrive au contact de toutes les cellules ciblées, les acides nucléiques eux, selon leur taille et selon le tissu, diffuseront plus ou moins bien au sein de la solution vers les cellules cibles.

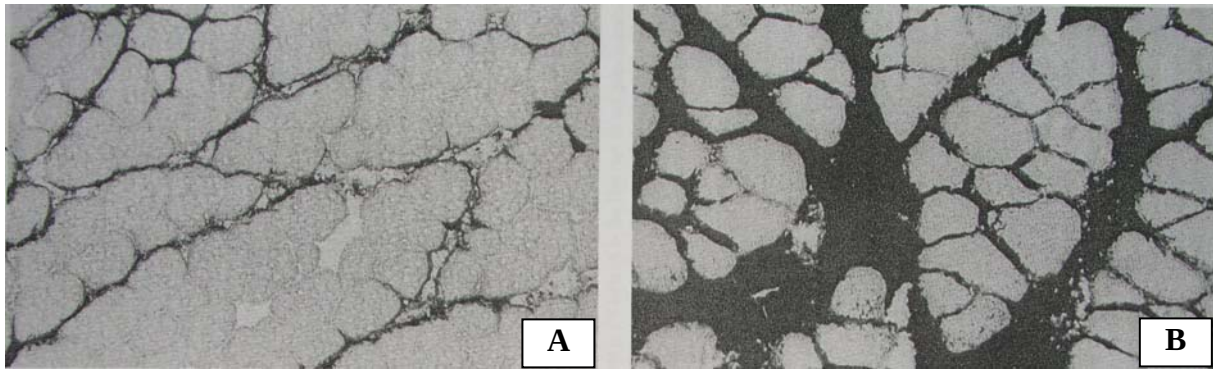


Figure 11 : Photomicrographies de muscles tibialis cranialis de souris injectés avec de l'encre de chine, montrant (A) une distribution uniquement intrafasciculaire du liquide injecté et (B) une bonne distribution entourant individuellement chacune des cellules musculaires. D'après (Davis, Whalen *et al.* 1993).

Les divers paramètres importants de l'injection sont : la vitesse, le volume, la concentration en acides nucléiques et la composition de l'excipient (pH, osmoticité,...). Tous ces paramètres peuvent jouer sur l'efficacité du transfert en le favorisant ou en le limitant et sont à adapter en fonction de la méthode de transfert choisie (conductivité de la solution pour l'électrotransfert par exemple, voir chapitre V.E.2.a. de cette introduction). Ils peuvent même être la méthode de transfert en elle-même. Ainsi la pression lors de l'injection (déterminée par la vitesse et le volume) peut permettre le transfert des cellules comme dans le cas de la « jet injection » (voir chapitre IV.B.3.b de cette introduction).

2. Injection intraveineuse

L'autre méthode d'injection classiquement utilisée est l'injection intraveineuse. Légèrement plus compliquée à mettre en œuvre que l'injection locale, elle consiste à injecter la solution d'acides nucléiques directement dans le sang. Son principal intérêt est de bénéficier du réseau vasculaire : le liquide injecté est donc distribué dans tout l'organisme et à toutes les cellules, ce qui présente aussi quelques inconvénients.

Le système sanguin alimentant chacune des cellules de l'organisme, une seule injection intraveineuse (quel que soit le volume injecté) permet d'atteindre presque toutes les cellules (à l'exception de celles situées derrière certaines barrières biologiques). Contrairement à l'injection locale, il n'y a presque aucune limite dans le volume de tissu traitable, et ce sans recourir à des injections multiples ou à de grands volumes d'injection. De plus, quel que soit l'endroit du système vasculaire où a eu lieu l'injection, il n'est pas nécessaire d'avoir recours à la chirurgie pour distribuer les acides nucléiques aux cellules des organes internes. De même il y a moins de problèmes de distribution au sein même du tissu puisque chaque cellule du tissu est alimentée par le système sanguin.

Cependant, l'un des inconvénients de cette méthode est justement qu'elle ne permet absolument aucun contrôle des cellules atteintes par les acides nucléiques. Le fait que presque toutes les cellules de l'organisme soient à chaque fois mises en présence des acides nucléiques injectés peut présenter un souci en terme de sécurité dans le cadre d'applications à l'homme, notamment si le vecteur utilisé pour le transfert est un virus.

Dans le même ordre d'idées, l'administration systémique, bien que distribuant la substance injectée dans tout l'organisme, conduit à une localisation préférentielle dans le foie, les poumons ou les reins, suivant le vecteur utilisé, et présente aussi des risques de toxicité au niveau des organes non ciblés (Mahato, Takakura *et al.* 1997).

De plus, selon le vecteur utilisé pour le transfert, l'injection intraveineuse pose certains problèmes spécifiques, comme dans le cas de certaines méthodes chimiques. Ainsi une

administration par voie intraveineuse peut conduire à la formation d'agrégats inhibant la transfection et pouvant conduire à une embolisation. L'ADN véhiculé peut aussi être rapidement dégradé dans la circulation, s'il n'est pas protégé (Mahato, Takakura *et al.* 1997).

Certaines cellules sont particulièrement difficiles à atteindre par la voie intraveineuse ; c'est le cas notamment des cellules du cerveau situées derrière la barrière hématoencéphalique ou des cellules embryonnaires situées derrière la barrière hémato-placentaire qui nécessitent de réussir à faire passer ces barrières aux acides nucléiques (selon leur taille). De même dans certaines pathologies les cellules sont mal irriguées (ischémies et certaines tumeurs présentant une nécrose centrale due à une angiogénèse insuffisante) donc plus difficiles à atteindre par voie intraveineuse.

Il est à noter aussi que selon le vecteur utilisé pour faciliter le transfert, le passage de l'endothélium vasculaire, afin de sortir du système sanguin pour atteindre les cellules ciblées, peut représenter une difficulté supplémentaire (Ishida, Maruyama *et al.* 1999).

Un autre des problèmes posés par l'injection intraveineuse est le fait que la solution injectée soit diluée assez rapidement dans tout le volume sanguin. La faible concentration en acides nucléiques qui en résulte peut présenter un inconvénient en termes d'efficacité de transfert pour certaines techniques.

Contrairement à l'injection locale où les acides nucléiques sont presque immédiatement au contact des cellules cibles, dans le cadre de l'injection systémique, la distribution auprès des cellules est assurée par la circulation sanguine. Ainsi le temps mis pour distribuer les acides nucléiques va dépendre du rythme cardiaque mais aussi de la place du site d'injection par rapport aux cellules ciblées. De plus selon la vitesse et le volume injecté, l'arrivée au contact des cellules cibles peut se faire de manière très progressive et diluée (dilution à la fois dans le temps et du point de vue volume, comme dans les cas des cathéters) ou sous forme de « bolus ». Ces paramètres sont à adapter en fonction de la méthode de transfert utilisée et de l'effet désiré.

Afin de réduire certains des inconvénients de l'injection systémique distale, il est possible de pratiquer une injection systémique « locale », c'est-à-dire directement dans les vaisseaux afférents au tissu cible en posant un clamp sur les veines efférentes (Budker, Zhang *et al.* 1998). De cette manière la plupart des problèmes de l'injection intraveineuse distale sont résolus, comme par exemple celui la dilution du volume injecté dans tout le volume sanguin, du temps de latence entre l'injection et l'arrivée auprès des cellules ciblées et le problème du contrôle de la distribution de la solution injectée. Cependant cette méthode « semi-locale » est beaucoup plus contraignante et nécessite le recours à des techniques de chirurgie. Il est aussi possible de pratiquer une perfusion de membre isolé comme c'est le cas dans le traitement de certains cancers : pour éviter l'amputation du membre on pratique une perfusion d'agents anti-cancéreux sur le membre atteint isolé.

Comme dans le cas des injections locales les paramètres que sont la vitesse, le volume, la concentration en acides nucléiques et la composition de l'excipient (pH, osmoticité,...), peuvent jouer sur l'efficacité globale du transfert. La pression peut même être la méthode de transfert en elle-même comme dans le cas de la méthode « hydrodynamique » (voir dans la partie IV. B.3.c. les méthodes physiques).

3. Autres voies d'administration

De manière générale il existe de nombreuses formes d'administration pour une molécule. A l'heure actuelle les plus couramment utilisées pour le transfert de gènes sont les injections locales et intraveineuses, en partie parce que le transfert d'acides nucléiques en est

encore au stade de la recherche expérimentale et qu'un certain nombre d'autres méthodes vise seulement au confort du patient.

Ainsi parmi les différentes voies d'administration, en plus de la voie parentérale (administration par injection intraveineuse ou locale), il est possible de distinguer :

- La voie orale (comprimé, dragée, gélule, poudre, sirop) ou l'administration rectale (suppositoire, lavement). Après la dissolution du produit dans l'estomac ou l'intestin, les principes actifs sont absorbés par la muqueuse digestive soit par simple diffusion à travers les membranes cellulaires, soit par des mécanismes cellulaires de transport spécialisés qui les acheminent vers le sang. La voie rectale permet d'éviter l'estomac, en effet le produit peut être toxique pour l'estomac, et les molécules administrées risquent d'y être dégradées. Enfin, la richesse en vaisseaux sanguins de la muqueuse rectale permet une résorption efficace et l'effet désiré est obtenu rapidement. Dans le cadre du transfert d'acides nucléiques, ces méthodes demandent un certain développement en terme de galénique. L'injection intraveineuse permettant souvent le même résultat, il est évident que cette voie d'administration ne sera intéressante que dans le cas de traitement d'affections gastro-intestinales ou du point de vue du confort du patient dans le cadre d'une application à l'homme (Sheu, Rothman *et al.* 2003; Rothman, Tseng *et al.* 2005).
- La voie transdermique (pommade, crème, onguent, lotion, patches,...). Les pommades peuvent contenir de nombreux produits. Leur résorption au niveau de la peau humaine se fait au travers des cellules et leur passage dans le sang peut donner lieu à des effets généraux favorables en plus des effets locaux attendus. En sus des systèmes transdermiques classiques d'administration il existe aussi l'iontophorèse. L'iontophorèse consiste à appliquer un courant électrique de faible intensité pendant quelques minutes ou quelques heures. Elle favorise la pénétration principalement par répulsion électrique et induit peu d'effets indésirables (érythème). La voie transdermique a été étudiée pour le transfert d'acides nucléiques pour son application chez l'homme (plus pratique que les injections) (Sakamoto, Miyazaki *et al.* 2004). Cependant l'efficacité des systèmes transdermiques classiques et de l'iontophorèse pour l'administration des acides nucléiques s'est révélée limitée, essentiellement vis-à-vis de la taille des acides nucléiques transportables (Davies, Ciavatta *et al.* 2003).
- L'administration par voie respiratoire/aérienne (aérosol, sprays, inhalations, gouttes). Elle consiste à faire pénétrer le produit dans les poumons, la taille des gouttes utilisées (nébulisation) déterminant la profondeur atteignable dans les poumons (les grosses gouttes se propageant plus difficilement que les petites). Pour le transfert d'acides nucléiques visant spécifiquement les cellules pulmonaires cette méthode est souvent préférée à l'injection intraveineuse. (Pour une revue : voir (Densmore 2006)).

4. La matrice extracellulaire : une barrière à l'apport des acides nucléiques au contact des cellules cibles

En terme de progression des acides nucléiques vers les cellules, il convient de distinguer les tissus conjonctifs des autres tissus, surtout dans le cadre d'une injection locale. En effet, dans le tissu conjonctif, la matrice extra-cellulaire est abondante, contrairement aux autres tissus où les cellules sont directement jointes entre elles et donc plus facilement accessibles pour les acides nucléiques. Les tissus conjonctifs sont variés (tendons, derme, os, cartilage, ...), mais dans tous ces tissus la masse est principalement constituée par la matrice

extra-cellulaire, les cellules produisant cette matrice étant dispersées sporadiquement au sein du tissu (voir figure 12).

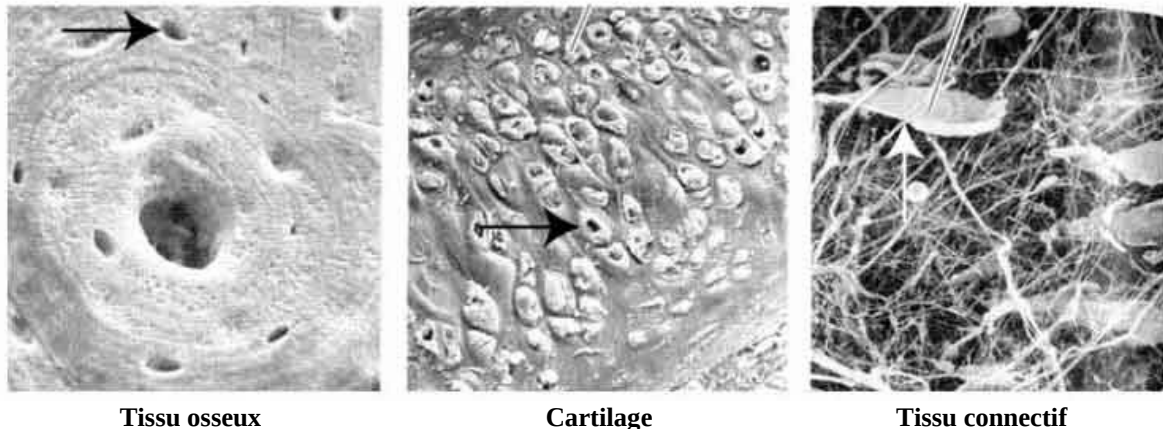


Figure 12 : Exemples de microscopies de diverses structures de matrices extracellulaires. Les flèches désignent une cellule caractéristique du tissu considéré.

Source : <http://bio-www.tamu.edu/COURSES/biol213/05a/figureslecture22.html>.

Les différents types de tissus conjonctifs doivent leurs caractères spécifiques à une protéine fibreuse, le collagène. En fonction du type de collagène, de sa quantité, et des autres molécules (protéoglycanes entre autres) qui s'entrecroisent avec lui dans diverses proportions, le tissu aura des propriétés différentes. Dans le cadre du transfert d'acides nucléiques il est important de retenir que dans les tissus conjonctifs les cellules ne sont pas autant directement accessibles que dans les autres tissus, éparpillées qu'elles sont dans la matrice extra-cellulaire. En fonction de la densité du maillage de cette matrice et de sa composition la progression des acides nucléiques (ou du vecteur utilisé) vers les cellules sera plus ou moins aisée à cause de la barrière physique que constitue ce maillage.

De plus au sein d'un tissu conjonctif les espaces compris entre les mailles de collagène sont remplis par les protéoglycanes, protéines extra-cellulaires liées à une classe spéciales de polysaccharides complexes chargés négativement, les glycosaminoglycanes (GAG). Les protéoglycanes sont extrêmement divers dans leur taille, leur forme et leur chimie. Typiquement, de nombreuses chaînes de GAG sont attachées à un noyau protéique unique, qui peut être lui-même lié par l'une de ses extrémités à un autre GAG, créant une énorme macromolécule dont le poids moléculaire se chiffre par millions de daltons. Cette macromolécule vient se rajouter au maillage de collagène gênant elle aussi la progression des molécules injectées (voir figure 13).

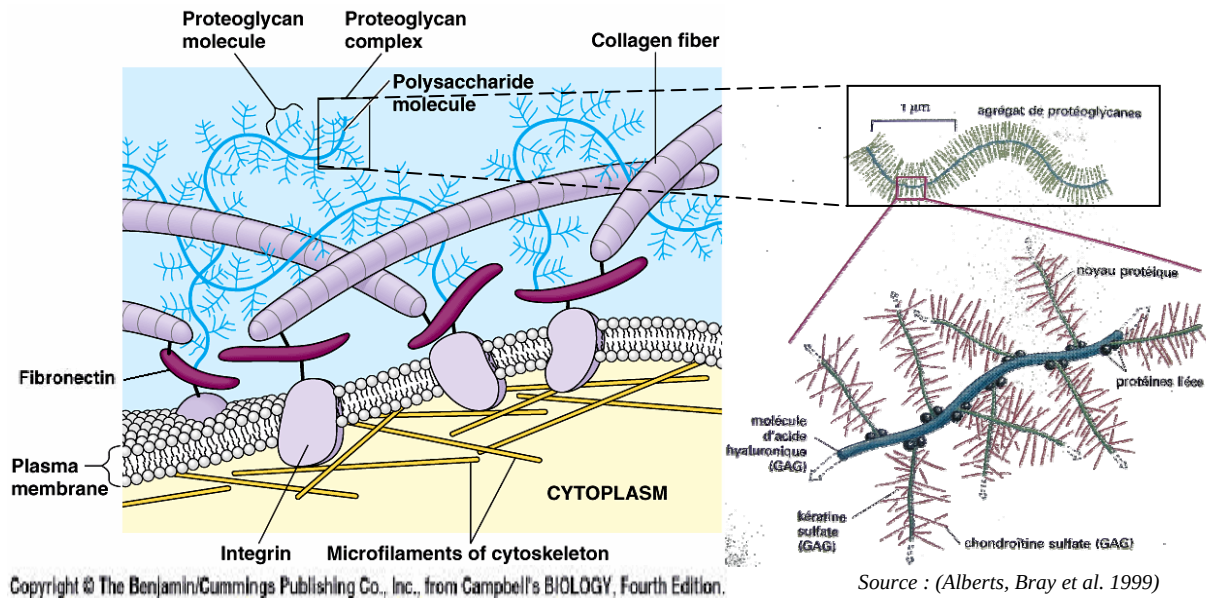


Figure 13 : Schéma montrant la structure de la matrice extracellulaire entourant les cellules animales.

A la barrière physique constituée par cet enchevêtrement de molécules il faut ajouter la présence de nombreuses charges négatives au niveau du maillage qui peut également perturber le déplacement des molécules au sein du tissu. En effet les acides nucléiques sont chargés négativement et auront tendance à être repoussés, à l'inverse des acides nucléiques enveloppés dans un vecteur chargé positivement (comme des lipides cationiques) auraient tendances à être fixées sur place empêchant toute progression.

Dans les tissus conjonctifs denses, compacts, tels que le tendon et l'os, la proportion de GAG est faible et la matrice est faite presque entièrement de collagène (avec des cristaux de phosphate de calcium dans le cadre de l'os). A l'opposé, le corps vitré de l'œil est presque entièrement fait d'un type particulier de GAG plus de l'eau, avec peu de collagène. En général les GAG sont fortement hydrophiles, et ils tendent à adopter des conformations très étendues qui occupent un énorme volume par rapport à leur masse. Ils forment des gels même à faible concentration, leurs multiples charges négatives attirant un nuage de cations osmotiquement actifs tels que Na^+ , amenant la pénétration d'une grande quantité d'eau dans la matrice. Cela crée une pression de gonflement contrebalancée par la tension des fibres de collagènes entrecroisées avec les protéoglycanes. Quand la matrice est riche en collagène et que de grandes quantités de GAG sont piégées dans ces mailles, la pression de gonflement et la tension qui la contrebalance sont alors toutes deux énormes. Une telle matrice est solide, élastique et résistante à la compression. La matrice cartilagineuse qui borde l'articulation du genou par exemple, a ce caractère : elle peut supporter des pressions de centaines de kilogrammes par centimètre carré. Il est donc à noter que selon les tissus conjonctifs l'injection intratissulaire sera plus ou moins aisée due à la plus ou moins forte pression interne.

Biologiquement, les protéoglycanes peuvent former des gels dont les pores, de taille et de densité de charges variables, jouent le rôle de filtres contrôlant le passage de molécules dans le milieu extra-cellulaire. Ce rôle de filtre s'appliquera aussi aux molécules injectées localement.

(pour un aperçu général sur la matrice extracellulaire, voir le livre « L'essentiel de la biologie cellulaire. Introduction à la biologie moléculaire de la cellule » (Alberts, Bray *et al.* 1999)).

Ainsi certaines particularités des tissus conjonctifs limitent-elles l'accès aux cellules. La progression des acides nucléiques (ou du vecteur utilisé) sera gênée à la fois d'un point de vue physique par le maillage formé par la matrice extracellulaire, mais aussi d'un point de vue

électrostatique par la présence de nombreuses charges négatives. Enfin la pression interstitielle du tissu peut, elle aussi, être un problème lors de l'injection locale. Les tissus conjonctifs présentant une grande variabilité ces différents paramètres poseront plus ou moins de problème en fonction du tissu conjonctif considéré et de la forme (vecteur) utilisée pour administrer les acides nucléiques.

Il est à noter qu'un tissu composé uniquement de cellules avec peu ou pas de matrice extracellulaire pourra poser lui aussi des problèmes d'accessibilité si les cellules sont fortement jointives.

Enfin il est à noter que si la matrice extracellulaire limite le déplacement des acides nucléiques vers les cellules elle limite aussi leur fuite et peut donc aussi jouer le rôle de « réservoir » (Bureau, Naimi *et al.* 2004).

Au cours de ce cheminement vers la membrane de la cellule cible les molécules administrées vont également subir l'influence de la composition de la solution dans laquelle elles sont injectées, et elles vont aussi être potentiellement soumises à un certain nombre de dégradations et/ou de réactions immunitaires. Ces aspects seront traités au cas par cas selon la méthode de transfert utilisée car les problèmes rencontrés à ce niveau sont très différents selon la vectorisation employée.

5. La magnétofection : une technique pour concentrer les acides nucléiques au niveau des cellules cibles.

Une des composantes de la magnétofection est l'usage des forces magnétiques pour faciliter l'apport des acides nucléiques aux cellules cibles. Cette technique a permis *in vitro* d'augmenter jusqu'à plusieurs centaines de fois l'efficacité de transfection aussi bien dans le cas de l'utilisation de vecteurs de transfert basés sur des virus que pour les méthodes non virales (Scherer, Anton *et al.* 2002; Krotz, Sohn *et al.* 2003). Une augmentation de l'efficacité de transfert de divers vecteurs viraux et non viraux a également été observée *in vivo* dans la zone gastro-intestinale et dans les vaisseaux sanguins (Scherer, Anton *et al.* 2002) mais aussi dans l'épithélium des voies aériennes (Xenariou, Griesenbach *et al.* 2006).

D'un point de vue pratique le vecteur utilisé est associé à des nanoparticules superparamagnétiques et le transfert est ciblé en appliquant un champ magnétique qui va permettre de concentrer le vecteur dans une zone d'intérêt.

Il a été montré *in vitro*, sur différentes lignées cellulaires, et en utilisant un vecteur à base de PEI couplé à des nanoparticules superparamagnétiques (magnétofectin), que la magnétofection agit en accélérant la sédimentation des magnétofectins à la surface des cellules et non en agissant sur l'endocytose qui est le mécanisme d'entrée dans la cellule des vecteurs à base de PEI (Huth, Lausier *et al.* 2004).

B. Passage de la membrane cellulaire

Une fois les acides nucléiques mis en présence des cellules, la membrane plasmique est la première barrière à franchir.

Les membranes sont des limites qui permettent de séparer « l'intérieur » de la cellule de « l'extérieur » (membranes plasmiques), mais elles servent aussi à diviser le cytoplasme en compartiments internes (membranes internes). Les membranes sont des éléments indispensables aux cellules qui rendent leur vie possible en leur permettant de créer des environnements internes aux conditions contrôlées et propices aux divers phénomènes nécessaires à leur fonctionnement, ces conditions étant bien souvent très différentes de celles régnant dans le milieu extérieur. Les membranes internes créent des compartiments intracellulaires ayant des fonctions distinctes. Ces compartiments sont les organelles ou

organites (noyau, réticulum cytoplasmique, appareil de golgi, mitochondries, lysosomes, peroxysomes) et ils peuvent être les cibles du transfert d'acides nucléiques (essentiellement le noyau et les mitochondries). Ainsi des mitochondries isolées ont pu être transfectées par électroporation (Collombet, Wheeler *et al.* 1997; Farre et Araya 2001; Yoon et Koob 2003). Les organelles peuvent aussi être simplement des étapes lors du transfert, par exemple dans le cas d'entrée des acides nucléiques dans la cellule par endocytose les acides nucléiques doivent réussir à sortir des endosomes.

Le passage de la membrane plasmique est une étape obligatoire au cours du transfert d'acides nucléiques, mais la méthode de passage utilisée doit laisser cette membrane fonctionnelle après le passage sous peine de tuer les cellules transfectées.

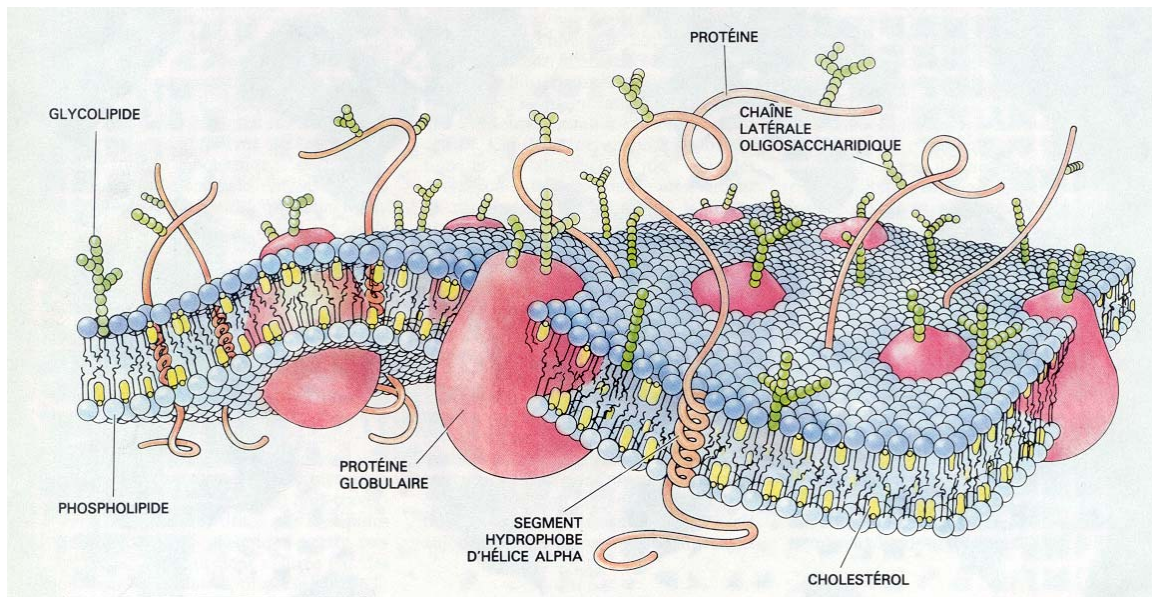


Figure 14 : Modèle de membrane en mosaïque fluide. D'après (Bretscher 1985).

1. Barrière physique

Les membranes sont des bicouches lipidiques, la membrane plasmique étant une membrane unique alors que les divers organites intracellulaires sont entourés soit d'une membrane unique, soit de deux membranes (cas du noyau et des mitochondries).

La majorité des lipides de la membrane sont des phospholipides, mais il y a aussi des stérols et des glycolipides (voir figure 14). Toutes les membranes cellulaires contiennent des protéines enchâssées dans la bicouche de lipides et elles possèdent une structure générale commune.

L'intérieur de la bicouche lipidique est donc hydrophobe et constitue donc une barrière au passage des molécules les plus hydrophiles. De plus la vitesse de diffusion d'une molécule au travers d'une bicouche lipidique dépend à la fois de ses propriétés de solubilité (hydrophilie ou hydrophobicité) mais aussi de la taille de la molécule.

Or les plus petits acides nucléiques généralement transfectés sont les oligonucléotides antisens qui font déjà une vingtaine de paires de bases (voir chapitre II.A.2. de cette introduction). De plus les acides nucléiques étant des molécules polaires, ils sont hydrophiles. Ainsi la membrane plasmique est fortement imperméable au passage des acides nucléiques par simple diffusion à travers les bicouches lipidiques.

La bicouche lipidique constitue la structure fondamentale de toutes les membranes cellulaires, mais la plupart des fonctions membranaires sont portées par les protéines membranaires. Chez les animaux les protéines représentent environ 50% de la masse de la

plupart des membranes plasmiques, le reste étant des lipides plus des quantités relativement petites d'hydrates de carbone sous forme de chaînes polysaccharidiques attachées aux protéines. Comme les molécules lipidiques sont plus petites que les molécules protéiques, il existe typiquement 50 fois plus de molécules lipidiques que de molécules protéiques dans une membrane cellulaire (voir figure 14). Les protéines sont donc suffisamment présentes au niveau de la membrane pour que leur présence puisse affecter le passage des acides nucléiques.

Beaucoup de lipides de la couche externe de la membrane sont liés de manière covalente à des glucides. La même chose est vraie pour la plupart des protéines de la membrane plasmique. La grande majorité de ces protéines est liée à de courtes chaînes glucidiques (oligosaccharides) : elles constituent les glycoprotéines. D'autres protéines membranaires possèdent une ou plusieurs longues chaînes polysaccharides attachées à elles : ce sont les protéoglycanes. Tous les hydrates de carbone des glycoprotéines, des protéoglycanes et des glycolipides sont situés sur le côté externe de la membrane plasmique. Ils forment un manteau glucidique : le glycocalyx (voir figure 15). Le glycocalyx permet de protéger la surface cellulaire des lésions mécaniques et chimiques. Comme les oligosaccharides et les polysaccharides du glycocalyx adsorbent l'eau ils rendent visqueuse la surface de la membrane. Le glycocalyx constitue donc une couche supplémentaire à traverser avant même de devoir passer la membrane proprement dite.

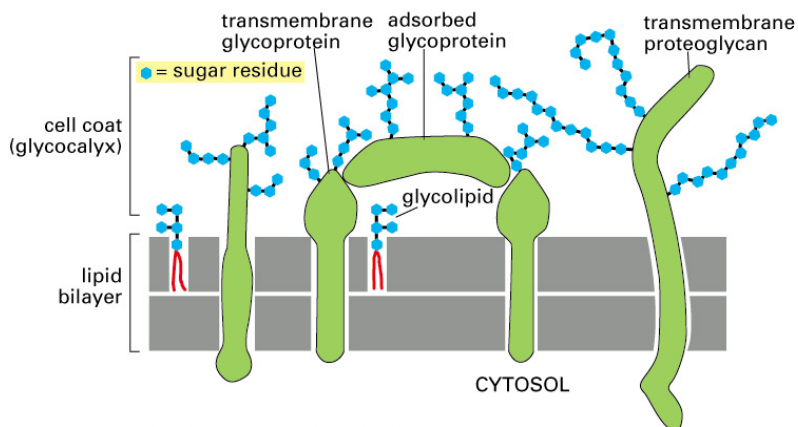


Figure 15 : Schéma montrant la structure du glycocalyx à la surface de la membrane cellulaire. Source : phy.asu.edu/phy598-bio/Class/D5%20Notes.htm.

2. Barrière électrostatique

Les protéines membranaires peuvent subir des modifications post-traductionnelles, comme la glycosilation. Ces protéines glycosilées polyanioniques confèrent une charge globale négative à la face externe de la membrane. Etant donné que les acides nucléiques sont globalement chargés négativement, membrane biologique et acides nucléiques ont donc une tendance naturelle à se repousser.

Il faut noter aussi l'existence d'un potentiel transmembranaire natif ou potentiel de repos de la cellule qui aura un rôle important dans le cadre de l'électrotransfert. Ce potentiel est maintenu de manière active, entre autres par la pompe $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ et il varie d'une cellule à l'autre entre -20 et -150 millivolts. Il est exprimé par une valeur négative car l'intérieur de la cellule est négatif par rapport à l'extérieur.

Ainsi la membrane constitue-t-elle aussi une barrière électrostatique.

3. Une possibilité de passage naturel de la membrane par les acides nucléiques ?

Plusieurs protéines de la membrane plasmique ont été identifiées comme pouvant s'associer avec des oligonucléotides, suggérant que les oligonucléotides pourraient être internalisés par la cellule *via* un mécanisme d'endocytose médiée par récepteur (voir figure 16). Ces protéines ont notamment été trouvées à la surface de cellules impliquées dans la réponse immunitaire (Siess, Vedder *et al.* 2000). Toutefois l'existence d'un récepteur membranaire à l'ADN, proposée dans certains travaux, reste à démontrer (Levy, Barron *et al.* 1996; Budker, Budker *et al.* 2000; Satkauskas, Bureau *et al.* 2001).

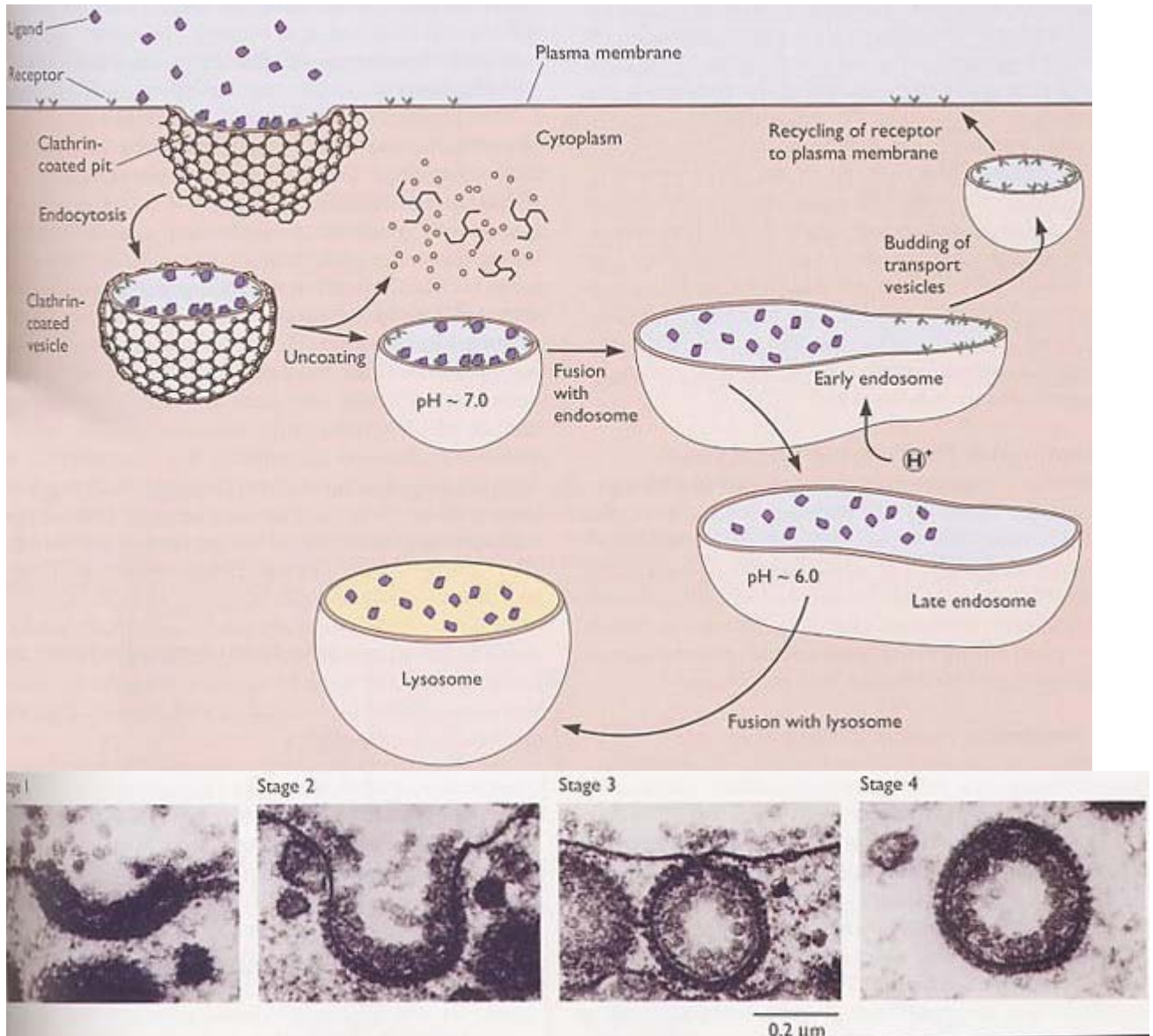


Figure 16 : Schéma illustrant les mécanismes de l'endocytose médiée par récepteur (en haut). Différentes étapes de la formation d'une vésicule d'endocytose observé par microscopie électronique (en bas). Source : <http://csm.jmu.edu/biology/virology/Viral%20growth%20cycle/receptor%20mediated%20endocytosis.jpg>.

Un des tissus étudiés dans le cadre de cette thèse mais qui est aussi un des tissus le plus souvent transfecté et le plus aisément transfectable est le muscle. C'est un des tissus dans lesquels les acides nucléiques seuls (sans vectorisation virale ou chimique) peuvent entrer de manière spontanée mais en faible quantité dans les cellules. Une particularité de la cellule musculaire pourrait avoir une influence sur sa capacité à internaliser de l'ADN seul,

couramment appelé ADN nu. Les cellules musculaires striées squelettiques présentent des invaginations de la membrane plasmique sur toute leur longueur et le système de tubules transverses pourrait servir de conduit de diffusion ou de conduits électriques favorisant la pénétration de l'ADN nu dans la cellule (Manthorpe, Cornefert-Jensen *et al.* 1993). L'ADN pourrait être internalisé à ce niveau grâce à la vacuolisation des tubules transverses (Wolff, Dowty *et al.* 1992; Krolenko, Amos *et al.* 1998). Il a par ailleurs été montré que de l'ADN double brin était capable d'interagir avec une protéine située au niveau du récepteur à la ryanodine présent sur le réticulum sarcoplasmique au niveau des tubules transverses (Hagstrom, Rybakova *et al.* 1996). Cette protéine, la triadine, pourrait être impliquée dans l'internalisation de l'ADN nu par des cellules musculaires striées squelettiques ou cardiaques.

C. Transport et dégradation intracellulaire

Une injection intra cytoplasmique du gène codant pour la β -galactosidase à proximité du noyau conduit à une efficacité de transfection 8 fois supérieure à celle obtenue lorsque l'injection est réalisée en position éloignée du noyau (Dowty, Williams *et al.* 1995). Le trafic intracellulaire constitue donc une autre limite à l'efficacité d'un transfert d'acides nucléiques. En effet lors de la micro injection *in vitro* d'ADN dans le cytoplasme, seule une copie sur 1000 du plasmide atteint le noyau (Pollard, Remy *et al.* 1998; Pollard, Toumaniantz *et al.* 2001). Il a été démontré *in vitro* que le plasmide ADN était séquestré ou rapidement dégradé dans le cytoplasme avant sa pénétration intranucléaire (Dowty, Williams *et al.* 1995; Zabner, Fasbender *et al.* 1995; Hagstrom, Ludtke *et al.* 1997; Neves, Escriou *et al.* 1999; Pollard, Toumaniantz *et al.* 2001). Lorsqu'il est injecté directement dans le cytoplasme de cellules HeLa ou COS, un plasmide d'environ 6000 pb codant pour la luciférase sous la dépendance du promoteur du virus de singe 40 (SV40), possède une demi-vie de 90 min lorsqu'il est sous forme circulaire double brin et de 50 min lorsqu'il est sous forme circulaire simple brin (Lechardeur, Sohn *et al.* 1999).

1. Transport

La migration d'une molécule d'ADN est d'autant plus lente que la taille de la molécule est grande. Alors que les petits oligonucléotides (21pb) sont capables de rejoindre le noyau en 5 min, des molécules d'une taille de 6000pb s'éloignent peu du site d'injection en 60 min (Lukacs, Haggie *et al.* 2000). La viscosité du cytoplasme et la présence des différents organites peuvent gêner la progression de l'ADN, mais il semblerait que ce soit principalement les filaments d'actine qui entravent le déplacement de l'ADN (Dauty et Verkman 2005). L'utilisation d'un signal de localisation nucléaire (NLS, voir paragraphe III.D. de l'introduction de cette thèse) pourrait faciliter la migration de l'ADN le long des microtubules vers le noyau (Mesika, Kiss *et al.* 2005).

2. Dégradations

La durée de ce trajet détermine aussi le temps d'exposition de l'ADN à l'action des différentes nucléases cytoplasmiques, pouvant expliquer la faible durée de vie du plasmide dans le cytoplasme. Une étude sur l'instabilité métabolique de l'ADN dans le cytosol a montré que les nucléases cytosoliques étaient impliquées dans la dégradation de l'ADN (Lechardeur, Sohn *et al.* 1999). Des endonucléases Ca^{2+} - dépendantes (DNases I), des endonucléases acides (DNases II) et quelques exonucléases ont été isolées dans le cytoplasme de cellules issues de différents tissus chez la souris. Elles sont principalement retrouvées dans

la rate, le rein, le foie, la peau et de façon moindre dans le myocarde et le muscle strié squelettique (Barry, Pinto-Gonzalez *et al.* 1999), ce qui pourrait être un élément supplémentaire permettant d'expliquer la plus grande efficacité de transfert dans les muscles. Les plasmides d'ADN transfectés étant la plupart du temps de nature circulaire double brin, les exonucléases ne devraient pas avoir une importance majeure dans la dégradation du plasmide suite à sa pénétration. D'autre part, compte tenu que le pH du milieu intracellulaire est neutre et que la présence de Ca^{2+} , Mg^{2+} et Mn^{2+} favorise la dégradation de l'ADN, les arguments bibliographiques penchent plutôt en faveur d'une action des endonucléases Ca^{2+} dépendantes (Barry, Pinto-Gonzalez *et al.* 1999; Pollard, Toumaniantz *et al.* 2001).

3. Piégeage dans des compartiments

Lorsque que l'acide nucléique pénètre dans la cellule par un mécanisme de type endocytose, l'ADN peut rester bloqué dans des endosomes (Zhou et Huang 1994; Zabner, Fasbender *et al.* 1995). Ces endosomes peuvent par la suite fusionner avec des lysosomes contenant des nucléases (Coonrod, Li *et al.* 1997; Ross, Bruno *et al.* 1998). Les enzymes lysosomales pourraient donc aussi être impliquées dans l'instabilité de l'ADN au cours de son trafic intracellulaire.

D. Passage de l'enveloppe nucléaire

Remarque : premièrement il est à noter que le problème du passage de l'enveloppe nucléaire ne se pose plus lorsque la cellule est en division, cette membrane n'étant plus là. Ensuite, dans le cadre des stratégies antisens, la plupart du temps la cible de l'antisens est l'ARNm qui se trouve dans le cytosol et il n'y a donc pas non plus nécessité de pénétrer dans le noyau.

Le plasmide ADN nu doit atteindre le noyau pour donner lieu à la synthèse d'ARNm. Or la membrane nucléaire constitue une barrière importante à l'entrée d'acides nucléiques dans le noyau, malgré l'existence de pores nucléaires. En effet, si l'injection de plasmide nu en position intra cytoplasmique ne conduit pas nécessairement à l'expression du transgène, celle-ci est observée si le plasmide est injecté directement dans le noyau (Capecchi 1980). Des acides nucléiques d'une taille allant jusqu'à 200 pb peuvent diffuser passivement au travers des pores nucléaires.

Des acides nucléiques de taille supérieure sont toutefois capables de pénétrer à l'intérieur du noyau en mettant en jeu un mécanisme actif (Dowty, Williams *et al.* 1995; Hagstrom, Ludtke *et al.* 1997; Ludtke, Zhang *et al.* 1999). Ce mécanisme d'importation nucléaire fait intervenir un complexe protéique hétérodimérique constitué des protéines importine- α et importine- β qui permettent la pénétration intranucléaire acides nucléiques ou de protéines porteuses d'un signal de localisation nucléaire (nuclear localization signal, NLS). L'importine- α interagit directement avec le NLS, le complexe NLS-importine- α se lie alors à l'importine- β . Ce complexe ternaire peut alors interagir avec le complexe de pore nucléaire (nuclear pore complex, NPC) pour pénétrer dans le noyau. Cette pénétration fait intervenir un mécanisme énergie-dépendant grâce à l'intervention d'une phosphatase GTP-dépendante (pour une revue des données de littérature : voir (Whittaker et Helenius 1998))(voir figure 17).

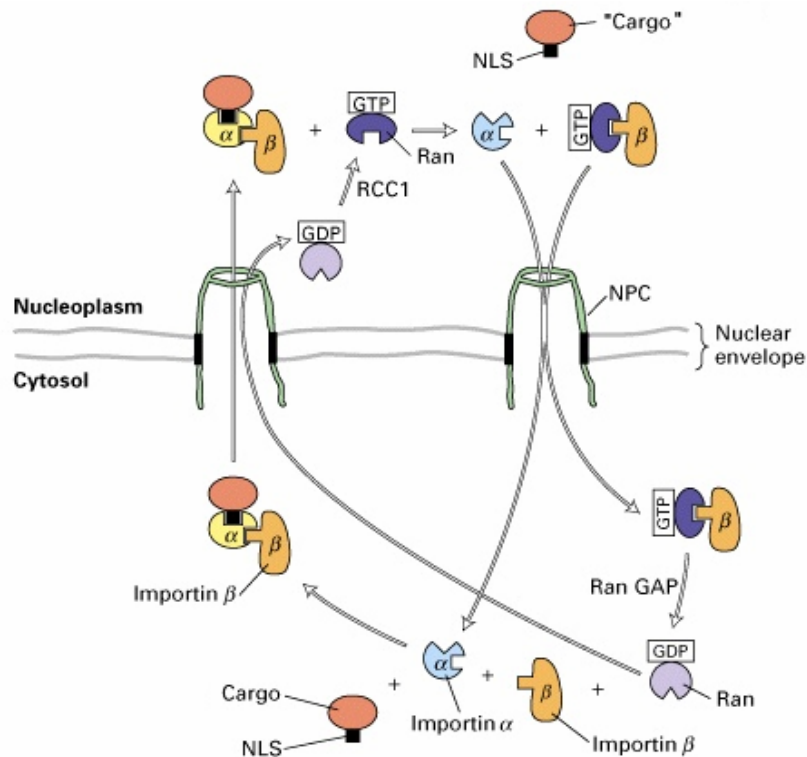


Figure 17 : Mécanisme proposé pour le transport, du cytoplasme dans le noyau, d'un « cargo » (séquence d'acides nucléiques ou protéine) fixé à un signal de localisation nucléaire (NLS). Source : <http://bioweb.wku.edu/courses/biol22000/23NuclearTransport/images/F11-37.JPG>.

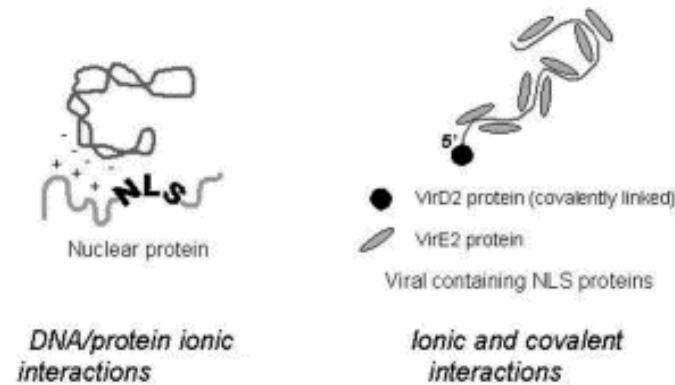
La fixation des signaux NLS sur le plasmide transfecté permet d'améliorer l'efficacité de transfection et de favoriser la migration jusqu'au noyau. Si le NLS est absent ou muté, l'apparition de l'expression du transgène est retardée (Neves, Escriou *et al.* 1999; Zanta, Belguise-Valladier *et al.* 1999). La nature et le nombre de NLS nécessaires restent sujets à discussion. Un seul NLS fixé covalamment sur le plasmide serait suffisant pour améliorer l'efficacité de transfection, alors qu'un nombre trop important de NLS peut conduire à l'effet inverse (Zanta, Belguise-Valladier *et al.* 1999).

Le promoteur SV40 est un promoteur souvent utilisé pour induire une forte expression constitutive d'un transgène. Il présente en plus la particularité de porter des séquences qui vont favoriser la pénétration du plasmide dans le noyau (Dean 1997). Il a été suggéré que ces séquences étaient riches en éléments de liaison à des facteurs de transcription, eux-mêmes porteurs de NLS. La fixation des facteurs de transcription sur les éléments SV40 du transgène va donc favoriser sa pénétration nucléaire (Dean, Byrd *et al.* 1999). En revanche, ce type de séquences n'a pas été retrouvé sur les autres promoteurs forts communément utilisés comme le promoteur du cytomégalo virus (CMV) et du virus du sarcome de Rous (RSV). Ceci pourrait expliquer le plus grand délai nécessaire à l'apparition de l'expression du transgène conduite par ces deux promoteurs (Wilson, Dean *et al.* 1999). En revanche, l'ajout des séquences du promoteur SV40 dans le promoteur CMV permet d'augmenter le niveau d'expression dirigé par le promoteur CMV dans le muscle (Li, MacLaughlin *et al.* 2001).

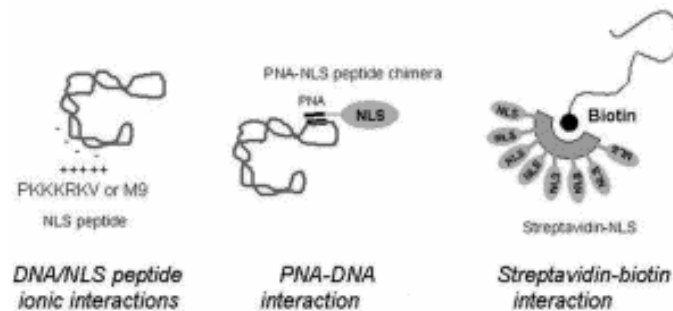
De nombreuses approches utilisant les NLS ont été envisagées pour augmenter l'efficacité de pénétration de l'ADN dans le noyau en jouant sur la nature du NLS. En plus des séquences spécifiques du SV40, d'autres peptides et protéines peuvent assurer le rôle de transporteur d'ADN en direction du noyau. Parmi ces molécules sont retrouvées des protéines dérivées de virus, des protéines nucléaires, et des protéines connues pour interagir directement avec l'ADN comme les protéines histones ou des facteurs de transcription (pour une revue des

données : voir (Hebert 2003)). Il existe différents modes d'interaction non covalente ou covalente entre le peptide NLS et le plasmide (voir figure 18). Les NLS peuvent être associés de façon non covalente *via* des interactions électrostatiques entre le peptide et l'ADN. Il existe également des possibilités de fixation covalente par le couplage chimique ou photochimique, ce qui limite les risques de dissociation du plasmide et du NLS au cours du trafic intracellulaire (Munkonge, Dean *et al.* 2003).

1. Association of plasmid DNA with nuclear proteins



2. NLS bioconjugates non covalently associated with DNA



3. NLS bioconjugates covalently associated with DNA

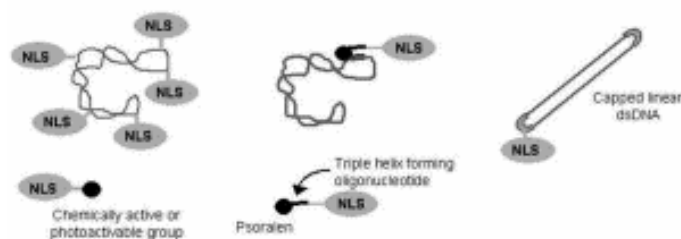


Figure 18 : Représentation schématique des diverses stratégies employées pour conjuguer des NLS à une séquence d'ADN plasmidique. D'après (Escriou, Carriere *et al.* 2003).

Des structures appelées acides nucléiques peptides (peptide nucleic acid, PNA) ont également été développées. La structure des PNA est similaire à celle de l'ADN sauf que le nucléoside a été remplacé par un squelette polyamide (voir figure 19 et aussi figure 7). Ils ne contiennent donc pas de phosphates. Les PNA possèdent une forte affinité pour l'ADN simple brin sur lequel ils se fixent par complémentarité des bases.

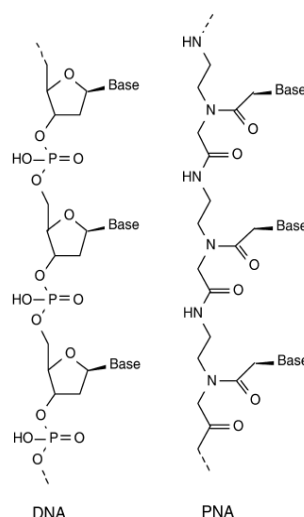


Figure 19 : Comparaison entre la structure de l'ADN et celle d'un acide nucléique peptide (PNA). Le squelette phosphodiester de l'ADN est remplacé dans le PNA par un squelette polyamide (répétition d'unités N-[2-aminoéthyl] glycine). Les résidus purines et pyrimidines sont attachés sur ce squelette et présentent une conformation spatiale et géométrique similaire à celle de l'ADN. D'après (Dean 2000).

Les PNA peuvent être utilisés pour fixer des séquences NLS sur des plasmides à transfecter. La liaison est forte mais non covalente et se fait au niveau de zones spécifiques de l'ADN, il n'y a donc pas d'interférence avec la transcription du gène. Par ailleurs, les PNA peuvent servir à fixer des marqueurs permettant de suivre la bio distribution de l'ADN dans le milieu avant et/ou après son internalisation cellulaire, mais ils peuvent aussi servir à la fixation de drogues ou de peptides favorisant le transfert de gènes et le ciblage tissu spécifique (Zanta, Belguise-Valladier *et al.* 1999; Dean 2000; Svahn, Lundin *et al.* 2004).

E. Contrôle de l'action du transgène

L'expression d'un transgène peut être contrôlée à la fois dans le temps et dans l'espace. Le contrôle dans l'espace se fait par l'utilisation d'un promoteur tissu spécifique, par opposition à l'emploi d'un promoteur ubiquitaire qui permettra une expression du transgène quel que soit le tissu. Quant au contrôle dans le temps il se fait par l'utilisation de promoteurs inductibles selon le besoin, par opposition aux promoteurs constitutifs qui expriment le transgène en permanence.

Le plus souvent une expression forte et permanente est recherchée et ce sont donc des promoteurs forts, ubiquitaires et constitutifs tels que les promoteurs SV40, CMV, RSV mais aussi CAG (chicken beta-actin/cytomegalovirus enhancer), qui sont utilisés. Cependant dans certains cas une expression tissu spécifique ou contrôlée dans le temps peut être désirée, par exemple uniquement dans les tumeurs avec des promoteurs comme l'alphafoetoprotéine de rat ou humaine (AFPr ou AFPh) ou dans le muscle avec le promoteur CK6.

Selon le promoteur utilisé et le tissu cible l'efficacité d'expression ne sera pas la même (Yue et Dongsheng 2002).

Le développement de systèmes d'induction de l'expression du transgène sûrs et efficaces fait l'objet de nombreuses recherches. En effet, dans certains cas il est indispensable de développer des systèmes inductibles de régulation. Ainsi, pour certaines pathologies, pour assurer une efficacité biologique optimale, la quantité de protéines exprimées dans les cellules cible ou dans la circulation sanguine doit se situer dans la fenêtre thérapeutique de la maladie à traiter. Si la transfection permet une très bonne expression du transgène, il y a alors un risque de toxicité par surexpression de la molécule d'intérêt.

De plus, en terme de sécurité pour un développement clinique de traitements par thérapie génique, il est également souhaitable de contrôler le moment où le « gène médicament » est exprimé et l'arrêt du traitement si nécessaire.

1. Contrôle de l'initiation de la transcription du transgène : développement de systèmes inductibles

Si certains facteurs de transcription sont exprimés de façon ubiquitaire, d'autres, par contre, ne sont exprimés ou fonctionnels que dans certains types cellulaires et dans certaines situations physiologiques. Fondée sur ces observations, deux familles de systèmes de régulation de l'expression génétique ont été développées :

- les systèmes endogènes, qui utilisent des séquences régulatrices connues de promoteurs endogènes pour activer la transcription en réponse à des signaux intracellulaires spécifiques d'un état physiologique ou d'un composé chimique.
- les systèmes exogènes, qui sont basés sur un facteur de transcription chimérique qui se lie sur des sites de fixation spécifiques placés en amont du promoteur du gène d'intérêt, et active/réprime la transcription en réponse à un inducteur exogène. Le facteur de transcription est inactif à l'état de base et n'est activateur/répresseur que par fixation d'un ligand exogène inducteur/répresseur. Idéalement, l'administration du ligand conditionne l'expression du gène d'intérêt.

a) Exigences d'un bon système inductible.

Pour être utilisable dans différents domaines d'applications, et particulièrement pour une utilisation en thérapie génique, il est important de sélectionner un système de modulation de l'expression qui permet une induction rapide, précise et réversible des gènes d'intérêts. Ainsi on peut définir le système de régulation idéale comme celui qui répond aux critères suivants (Fussenegger 2001; Toniatti, Bujard *et al.* 2004) :

- **spécificité** : le système ne doit pas interférer avec les réseaux de régulation endogène et ne doit pas être activable par un ligand endogène.
- **sélectivité** : l'induction doit se faire uniquement par un inducteur exogène non toxique.
- **inductibilité** : le système doit avoir un niveau d'expression basale constitutif faible et une induction rapide et élevée.
- **bio disponibilité** : l'inducteur doit être une drogue biodisponible par voie orale et capable de pénétrer tous les types tissulaires.
- **réversibilité** : un inducteur doit avoir une cinétique d'élimination rapide dans tous les tissus pour permettre des cycles répétés et rapides d'induction/répression.
- **immunogénicité** : l'activateur de transcription et l'inducteur doivent avoir un faible potentiel immunogène.
- **dose-dépendance** : la réponse du système doit être modulable par variation de la concentration de l'inducteur.
- **« ON » switch** : l'inducteur doit activer la transcription («ON» switch) plutôt que l'inhiber («OFF» switch). Les systèmes « OFF » posent en effet plusieurs problèmes : il nécessite pour éteindre le système une exposition prolongée à la drogue réductrice et les cinétiques d'induction dépendent fortement des cinétiques d'élimination de la drogue.
- **flexibilité** : les composants de système de régulation doivent pouvoir être facilement modulables (mutations ponctuelles par exemple) pour une optimisation éventuelle ou une adaptation du système à différentes configurations thérapeutiques ou tissus spécifiques.

Les premiers systèmes de régulation de l'expression génétique développés reposaient sur des éléments de réponse endogène (promoteurs, séquences activatrices de transcription (« enhancers »)) qui répondaient à des changements physiologiques ou environnementaux exogènes tels que la chaleur avec un promoteur Hsp70 (Wurm, Gwinn *et al.* 1986), l'hypoxie (Ratcliffe, O'Rourke *et al.* 1998), des cytokines (Varley, Geiszler *et al.* 1997) ou des métaux lourds avec un promoteur Hsp70 ou des promoteurs métallothionines (Mayo, Warren *et al.* 1982) par exemple.

Ces systèmes présentent cependant un risque d'interférence avec les réseaux endogènes de régulation des cellules cibles, répondant aux mêmes inducteurs. Ces phénomènes pleiotropiques peuvent conduire à des effets secondaires non contrôlés (Fussenegger 2001). C'est pourquoi de nouvelles approches de régulation basées sur des séquences exogènes (non mammifères ou des versions mutées d'éléments endogènes) ont été développées.

b) Systèmes régulables par la tétracycline.

Système suppressible par la tétracycline : Tet-Off.

Le système régulable à la tétracycline a été développé initialement par Gossen et Bujard en 1992 sous le nom de système Tet-Off. Ce système est basé sur les éléments de régulation de l'opéron du gène de résistance à la tétracycline du transposon Tn10 d'*Escherichia coli* (Gossen et Bujard 1992). Chez la bactérie, la résistance à la tétracycline est assurée par une protéine dont l'expression est induite par l'antibiotique. L'induction se fait au niveau transcriptionnel en déplaçant par changement conformationnel une protéine répresseur de la transcription (tetR), normalement fixés sur un opérateur tetO (voir figure 20).

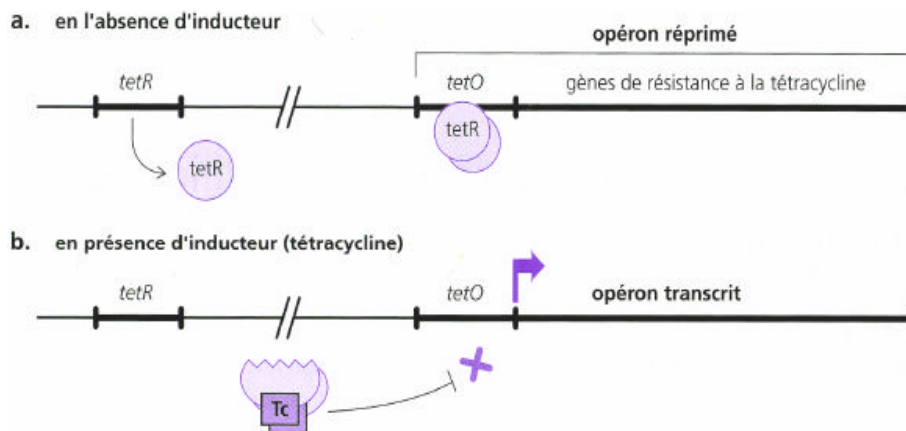


Figure 20 : Schéma de l'induction du gène de la résistance à la tétracycline chez la bactérie. Source : http://www-cbd.ups-tlse.fr/formation/AFGO6%5Cexercices%5CAFG06CM5.pdf?bcsi_scan_4A1387148CCC9DBD=0&bcsi_scan_filename=AFGO6%5Cexercices%5CAFG06CM5.pdf.

Pour créer le système initial Tet-Off suppressible par la tétracycline, une protéine de fusion activatrice artificielle, sensible à la tétracycline : tTA, a été construite. Sept copies de la séquence de *tetO* ont été placées en amont du promoteur minimum du CMV. Ainsi, en l'absence de tétracycline, la protéine de fusion tTA se fixe sur *tetO* et active la transcription. Par contre en présence de tétracycline, la protéine *tetA* subit un changement de conformation ce qui diminue son affinité pour *tetO* et inactive ainsi indirectement l'initiation de la transcription (voir figure 21).

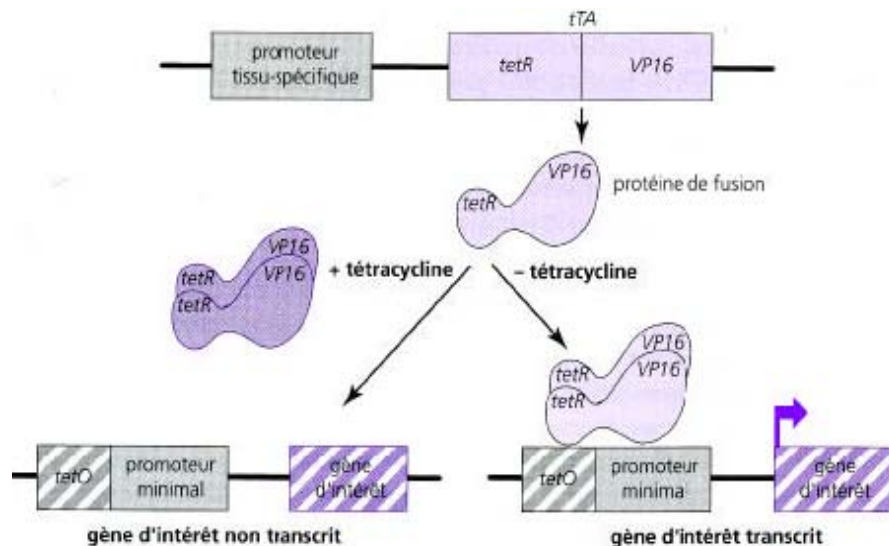


Figure 21 : Schéma du système Tet-Off suppressible par la tétracycline. Source : http://www-cbd.upstlse.fr/formation/AFGO6%5Cexercices%5CAFG06CM5.pdf?bcsi_scan_4A1387148CCC9DBD=0&bcsi_scan_filename=AFGO6%5Cexercices%5CAFG06CM5.pdf.

Une induction d'un facteur 10^5 a été reportée dans les cellules HeLa exprimant tTA constitutivement en passant de 1mM à une absence totale de tétracycline dans le milieu de culture (Gossen et Bujard 1992). Chez des souris transgéniques, des facteurs d'induction allant de 1 à 5000 ont été mesurés en fonction du tissu étudié (Furth, St Onge *et al.* 1994). Ce système de régulation a également été utilisé avec succès *in vivo* avec le gène de l'érythropoïétine (Bohl, Naffakh *et al.* 1997) ou celui d'immunoglobulines permettant la production régulée d'anticorps monoclonaux (Perez, Bigey *et al.* 2004).

Système inductible par la tétracycline : Tet-On.

Le système Tet-Off implique d'administrer l'antibiotique inhibiteur pour annuler l'expression du gène d'intérêt. Ceci risque, dans certains cas, de nécessiter des traitements assez longs avec l'antibiotique. C'est pourquoi, à partir de ce système Tet-Off, le groupe de Bujard a développé en 1995 un système inductible par la tétracycline appelée Tet-On (Gossen, Freundlieb *et al.* 1995). Quatre acides aminés du tetR ont été modifiés pour créer le rtetR (reverse tetR). La protéine transactivatrice rtTA qui contient cette séquence n'a de forte affinité pour tetO qu'en présence de tétracycline ou de ses analogues (tels que la doxycycline) (voir figure 22).

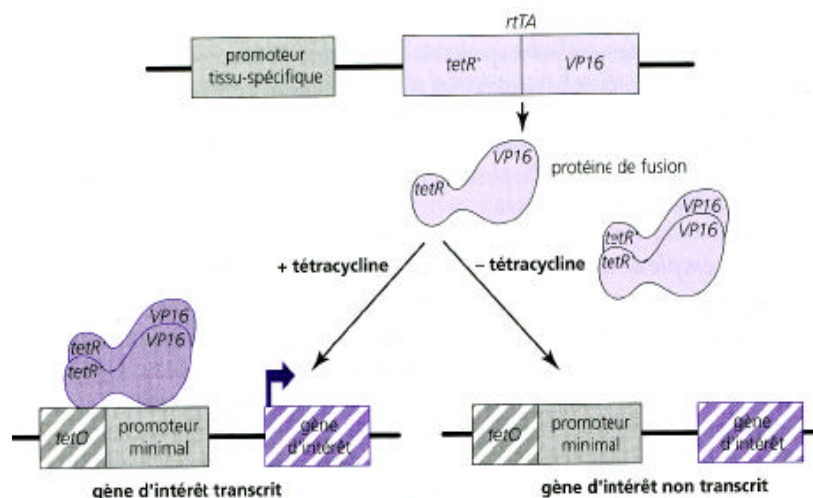


Figure 22 : Schéma du système Tet-On inductible par la tétracycline. Source : http://www-cbd.upstlse.fr/formation/AFGO6%5Cexercices%5CAFG06CM5.pdf?bcsi_scan_4A1387148CCC9DBD=0&bcsi_scan_filename=AFGO6%5Cexercices%5CAFG06CM5.pdf.

Ce système a montré une bonne inductibilité en réponse à la tétracycline ou son analogue la doxycycline : un facteur de plus de 1000 fois a été observé dans des cellules HeLa exprimant le rtTA de manière constitutive en ajoutant de la doxycycline dans le milieu de culture. Chez des souris doublement transgéniques, une régulation positive induite par la doxycycline a été observée et les facteurs d'induction varient de 1 à 7000 selon les tissus (Kistner, Gossen *et al.* 1996). Bien qu'efficace, les applications *in vivo* de ce système inductible ont été moins nombreuses que celle du système Tet-Off car de grandes quantités de doxycycline doivent être administrées et ce système de régulation Tet-On originel présente plus d'expression basale que le système Tet-Off, probablement due à une légère fixation résiduelle du rtTA au tetO en absence d'inducteur. Quelques-unes sont relatées dans la littérature (Bohl, Naffakh *et al.* 1997; Bohl, Salvetti *et al.* 1998; Serguera, Bohl *et al.* 1999).

Améliorations du système Tet-On. Deux nouveaux variants de rtTA, nommés rtTA2^s-S2 et rtTA2^s-M2 ont été isolés : ils sont toujours sensibles à la doxycycline mais ont un niveau d'activité basale beaucoup plus faible dans l'état non induit que le Tet-On originel (Urlinger, Baron *et al.* 2000). De plus, leur séquence a été optimisée, permettant une meilleure expression et une plus grande stabilité. rtTA2^s-S2 présente un niveau basal légèrement plus faible que rtTA2^s-M2, ce dernier présentant néanmoins l'avantage d'être environ dix fois plus sensible à la doxycycline (Urlinger, Baron *et al.* 2000; Lamartina, Roscilli *et al.* 2002). Plusieurs études ont prouvé que ces deux transactivateurs étaient capables de contrôler efficacement *in vivo* la transcription de nombreux transgènes après transfert dans différents tissus et ce avec une grande variété de vecteurs (Aurisicchio, Bujard *et al.* 2001; Lamartina, Roscilli *et al.* 2002; Koponen, Kankkonen *et al.* 2003). Néanmoins des études de dose/réponse semblent montrer que la robustesse du contrôle est perdue aux fortes doses de vecteurs.

Un contrôle plus strict du bruit de fond résiduel du système Tet-On a également été obtenu en rajoutant un répresseur de transcription, ou « silencer » tTS (tétracycline transcriptional silencer) sous contrôle également de la tétracycline. Le tTS est le résultat d'une fusion avec le répresseur de la transcription tetR initial (Freundlieb, Schirra-Muller *et al.* 1999). La co-expression du rtTA et d'un tTS permet une régulation très sensible : en absence de doxycycline, le tTS se lie au TetO et inhibe la transcription basale ; en rajoutant la doxycycline, le tTS se dissocie de sa cible ADN pendant que le rtTA devient actif et active la transcription.

Plusieurs études semblent montrer effectivement qu'un tel système dual rtTA/tTS réduit de façon significative le bruit de fond basal de l'expression d'un transgène *in vivo* (McGee Sanftner, Rendahl *et al.* 2001; Salucci, Scarito *et al.* 2002; Lamartina, Silvi *et al.* 2003). Les versions les plus évoluées du système Tet-On combinent même rtTA2s-S2 et rtTA2s-M2, avec le répresseur tTS (Salucci, Scarito *et al.* 2002; Lamartina, Silvi *et al.* 2003; Mizuguchi, Xu *et al.* 2003).

Remarque : les systèmes Tet sont de loin les systèmes de régulation les plus utilisés actuellement. Une de leurs originalités repose sur l'origine procaryote des séquences tetR/tetR et tetO qui assurent une réponse spécifique et l'absence d'effets pléiotropiques. De plus, la doxycycline est un antibiotique non toxique pour les cellules de mammifères, dont la pharmacologie est bien connue et dont l'administration semble bien tolérer par les patients. La doxycycline est disponible par voie orale, à une demi-vie de 14 à 22 heures et à l'avantage de bien pénétrer dans les tissus. Les dernières versions du système Tet-On ont fonctionné chez les rongeurs et les singes avec des doses de doxycycline du même ordre de grandeur que celles couramment utilisées dans un but antibiotique (Lamartina, Silvi *et al.* 2003). La doxycycline est bien tolérée au moins à court et moyen terme (quelques mois) ; son seul inconvénient est que des traitements *in vivo* prolongés peuvent conduire à son accumulation dans les os ce qui a pour conséquence une libération lente de la drogue et donc une extinction

du système Tet-On plus lente. Ceci représente une limitation pour des utilisations sur de longues périodes. Il faut également noter une possible résistance à cet antibiotique au cours du temps bien que cet antibiotique soit de moins en moins utilisé, et une possible immunogénicité du transactivateur de part son origine procaryote.

c) Systèmes basés sur des récepteurs aux hormones stéroïdes.

Système inductible par l'ecdysone.

Chez les insectes, l'ecdysone active une série d'événements transcriptionnels via un récepteur hétérodimérique (EcR/UPS). En présence de l'hormone, ce récepteur se lie à des éléments de réponse et permet une transactivation de la transcription. Ce système naturel de régulation a été modifié pour être utilisable chez les mammifères (No, Yao *et al.* 1996) : un récepteur chimérique (VP16-EcR/RXR) a été construit par fusion avec une version mutée d'une partie du récepteur originel (EcR) (conservant sa sensibilité pour l'ecdysone et son site de liaison à l'ADN). L'autre partie du récepteur formée par le gène ultraspirale (UPS) étant remplacée par son homologue chez les mammifères : le récepteur alpha au rétinoïde X. (RXR α) car il a été montré que les facteurs d'induction étaient supérieurs en sa présence (Thomas, Stunnenberg *et al.* 1993). Ainsi, en présence d'ecdysone ou de son analogue synthétique la muristérone A, le complexe hétérodimérique (VP16-EcR/RXR) se lie à des séquences spécifiques situées en amont du promoteur basal du gène d'intérêt et active la transcription.

Ce système présente l'inconvénient de nécessiter l'expression simultanée de ses trois composants dans les cellules cibles. De plus, la surexpression du récepteur RXR risque d'entraîner des interactions avec d'autres voies de signalisation endogènes. Néanmoins, le système ecdysone donne des résultats très encourageants *in vitro* (Christopherson, Mark *et al.* 1992) et *in vivo* (No, Yao *et al.* 1996) et présente de nombreux avantages par la nature de l'inducteur. En effet, la muristérone A est une molécule non toxique, dont la durée de vie est très courte, elle coûte cependant très cher. La diffusion dans les tissus est très efficace, par son caractère lipophile.

Système inductible par la mifepristone/RU486.

Ce système utilise une version mutée du récepteur à la progestérone humaine (hPR). Une délétion dans le domaine de liaison au ligand a été effectuée, supprimant la réponse à la progestérone mais conservant le site de liaison au RU486, qui agit alors comme un agoniste. Une protéine transactivatrice chimère GLVP a été construite en fusionnant le domaine de fixation du ligand de hPR avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal-4 et le domaine d'activation de VP16 (Wang, O'Malley *et al.* 1994; Delort et Capecchi 1996). Le promoteur inductible est constitué de plusieurs sites de fixation de Gal-4 en amont du promoteur basal du gène d'intérêt. Ce système, transfecté transitoirement dans des cellules permet une induction d'un facteur 50 en présence de 1nM de RU486. Utilisé chez les souris transgéniques avec le gène de l'hormone de croissance humaine (hGH) sous son contrôle, ce système permet d'observer des facteurs d'induction de 1500 à 3500 fois variant en fonction des doses de RU486 administrées (Wang, DeMayo *et al.* 1997). Dans le but d'éliminer la protéine VP16 potentiellement immunogène, un laboratoire a substitué le domaine d'activation VP16 par la partie transactivatrice de p65 (Burcin, Schiedner *et al.* 1999). La très lente désinduction *in vivo* du système liée à la longue demi-vie de RU486 et à sa diffusion lente dans les tissus (Serguera, Bohl *et al.* 1999) constitue un obstacle à son développement. Un inconvénient supplémentaire de ce système est les propriétés abortives du composé RU486 ce qui rend impossible son utilisation clinique.

Système inductible par la rapamycine.

Ce système repose sur le contrôle de la dimérisation de deux protéines chimériques, inactive à l'état de monomère, et qui constituent un facteur de transcription en hétérodimère. L'une des protéines contient le domaine de liaison à l'ADN et la seconde le domaine d'activation de la transcription. Les deux contiennent des domaines de liaison au ligand. La fixation de la rapamycine ou de son analogue FK506 entraîne donc la formation de l'hétérodimère qui active le promoteur inductible comportant des sites de fixation du domaine de liaison à l'ADN choisit.

Ce système, introduit dans des vecteurs AAV (voir chapitre IV.A.4. de cette introduction), a permis après injection dans des muscles squelettiques de souris une régulation dose-dépendante de la sécrétion d'érythropoïétine (Ye, Rivera *et al.* 1999) ou d'hormone de croissance humaine pendant plusieurs mois (Rivera, Ye *et al.* 1999). Ce système est très efficace. Il présente l'avantage que les protéines chimères qui le composent sont d'origine humaine et donc susceptibles d'être bien tolérées chez l'homme. La seule limitation du système est liée aux propriétés immunosuppressives de la rapamycine ou de son analogue FK506 qui pourraient ainsi conduire à des effets pleiotropiques dans les cellules cibles. L'utilisation de dérivés non-immunosuppresseur s'impose pour une application thérapeutique. La synthèse de certains d'entre eux a déjà été publiée (Liberles, Diver *et al.* 1997). Une autre contrainte du système est la nécessité d'exprimer simultanément dans les cellules les trois éléments qui le composent.

D'autres systèmes de régulation basés sur la formation d'un dimère ont également été décrits (voir la revue de Pollock *et al.* (Pollock et Clackson 2002)).

2. Durée d'expression

Quel que soit l'acide nucléique transfecté le transfert peut être un phénomène aussi bien transitoire (l'information transgénique ne s'incorporant pas au génome de l'hôte et les oligonucléotides étant progressivement dégradés) que stable (incorporation au génome ou autoréplication ou transferts répétés à intervalles réguliers) en fonction de l'effet recherché. Seuls certains virus possèdent une capacité naturelle d'intégration au génome (voir chapitre IV.A. de cette introduction). Cependant il est possible de rajouter dans la cassette d'expression diverses séquences permettant soit l'intégration au génome de la cellule, soit une autoréplication, soit une ségrégation au cours des mitoses.

En fonction des approches envisagées, qu'elles soient thérapeutiques ou physiologiques, l'expression du transgène doit être connue et contrôlée. La stabilité d'expression du transgène au cours du temps, déterminée sur la base de la quantité d'ARNm ou de la protéine, est extrêmement variable en fonction du type cellulaire, du transgène et du vecteur de transfert de gènes, allant de quelques jours (Li, MacLaughlin *et al.* 1999) à plusieurs mois (Wolff, Ludtke *et al.* 1992; Vicat, Boisseau *et al.* 2000). Souvent le niveau d'expression est élevé dans les quelques semaines qui suivent le transfert, puis l'expression chute et se stabilise pour disparaître ensuite progressivement dans les mois suivants (Hartikka, Sawdey *et al.* 1996; Doh, Vahlsing *et al.* 1997; Hartikka, Bozoukova *et al.* 2000).

a) Origines de la perte d'expression.

La nature transitoire de l'expression pourrait s'expliquer par la dégradation du transgène, l'arrêt de la transcription du transgène par régulation de l'activité du promoteur, l'arrêt de la synthèse de la protéine et/ou par le déclenchement d'une réponse immunitaire. Le

fait que le muscle strié squelettique soit plus pauvre en endonucléases que les autres tissus (Barry, Pinto-Gonzalez *et al.* 1999) peut contribuer à une meilleure stabilité de l'expression du transgène au cours du temps en permettant à une plus grande quantité d'ADN d'échapper à la dégradation intracellulaire. Toutefois, il semblerait que le faible taux d'endonucléases dans le muscle jouerait plutôt sur l'efficacité de transfection (Barry, Pinto-Gonzalez *et al.* 1999).

La perte d'expression au cours du temps pourrait être liée à une extinction du promoteur. En effet, il a été démontré que des cytokines inflammatoires (TNF- α et interféron- γ) inhibaient l'activité transcriptionnelle de promoteurs d'origine virale (Qin, Ding *et al.* 1997). Cet effet est peu ou pas observé lorsque le transgène est sous la dépendance d'un promoteur cellulaire. Cette inactivation du promoteur résulterait d'une inhibition de la transcription sans dégradation du transgène, sans altération de la synthèse protéique totale et avec maintien de l'intégrité cellulaire (Qin, Ding *et al.* 1997). Il est à noter que les promoteurs tissus-spécifiques déterminent un niveau d'expression du transgène plus faible que les promoteurs viraux, mais que celui-ci sera maintenu plus longtemps (Herweijer, Zhang *et al.* 2001; Weeratna, Wu *et al.* 2001).

L'implication de la réponse immunitaire dans la réduction de la durée d'expression du transgène est démontrée par le fait que des animaux immunodéprimés ont une durée d'expression du transgène plus longue que celle d'animaux immunocompétents (Vilquin, Guerette *et al.* 1995; Davis, Millan *et al.* 1997; Wells, Maule *et al.* 1997; Liu, Nishikawa *et al.* 2001; Zhang, Budker *et al.* 2001; Molnar, Gilbert *et al.* 2004). La transfection du gène codant pour la β -galactosidase chez des animaux transgéniques rendus tolérant à cette protéine ne montrait pas de réduction de l'expression 64 jours après le transfert de gènes, alors que celle-ci était nulle chez des animaux sauvages après 7 jours (Aubert, Menoret *et al.* 2002). La reconnaissance du transgène en tant que protéine exogène peut donc conduire à une perte de son expression due à la destruction des cellules transfectées (Davis, Millan *et al.* 1997).

Une autre des sources de la perte d'expression du transgène au cours du temps est la perte du plasmide lui-même. Cette perte se fait soit par un phénomène de division du nombre de copies du plasmide dans les différentes cellules filles lors des mitoses, soit par une perte du plasmide dans la cellule au cours du temps, même en l'absence de divisions cellulaires. Cette perte en l'absence de mitoses a lieu si le plasmide n'est pas intégré ou ne possède pas de mécanisme de rétention nucléaire. Ainsi la nature post-mitotique de certaines cellules (telles que les cellules musculaires) favorise une expression à long terme en comparaison avec des tissus possédant un fort taux de renouvellement.

Il semble donc que la perte d'expression du transgène avec le temps soit multifactorielle. Toutefois, deux phases peuvent être distinguées : une phase précoce où la perte d'expression serait essentiellement liée à la suppression de la transcription, et une phase plus tardive où la perte d'expression serait plutôt liée à une réaction immunitaire dirigée contre la protéine exogène (Herweijer, Zhang *et al.* 2001).

b) Augmentation de la durée d'expression.

La durée d'expression peut être augmentée en rajoutant dans la cassette d'expression des séquences permettant soit l'intégration au génome de la cellule, soit une autoréplication, soit une ségrégation au cours des mitoses.

Systèmes d'intégrations.

L'intégration permet d'augmenter la durée d'expression en permettant la transmission du gène à toutes les cellules filles lors des mitoses, mais aussi en diminuant les réactions immunitaires contre la séquence bactérienne du plasmide puisque seule la séquence d'intérêt

est intégrée. Il existe deux systèmes couramment utilisés d'intégration chromosomique d'un transgène contenu dans un plasmide : l'intégrase *phic31* et la Sleeping Beauty transposase. L'intégrase *phic31* peut diriger l'intégration site-spécifique à l'intérieur d'un chromosome hôte. Cependant il a été récemment démontré que cette séquence provoque de nombreuses anomalies chromosomiques telles que des translocations, suggérant que l'enzyme agit elle-même comme un mutagène (Liu, Jeppesen *et al.* 2006).

La Sleeping Beauty transposase est également utilisée pour l'intégration semi-aléatoire d'un gène d'un plasmide donneur dans un chromosome d'une cellule de mammifère hôte. Bien que l'intégration par la Sleeping Beauty transposase soit semi-aléatoire, ce qui est considéré comme augmentant sérieusement les risques d'insertion mutagène, à l'heure actuelle aucune expérience n'indique que l'utilisation de cette transposase représente un risque.

Systèmes de réplication.

L'intérêt d'un système d'expression qui permet une réplication et/ou une conservation extrachromosomale (épisomale) du plasmide lors des mitoses, est qu'il évite le risque de mutagenèse lié aux systèmes utilisant une intégration dans le chromosome.

Les premiers systèmes de réplication utilisés étaient basés sur des virus qui se répliquent naturellement de manière extrachromosomale durant l'infection de la cellule, comme le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus du singe 40 (SV40), le virus du papillome bovin (BPV) et d'autres (Van Craenenbroeck, Vanhoenacker *et al.* 2000). Une des limitations de ces vecteurs est qu'il requiert l'action d'une protéine virale : l'Epstein Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA-1), dans le cas des vecteurs basés sur l'EBV ou le large T antigen dans le cas des vecteurs basés sur le SV40.

Ainsi des plasmides contenant l'origine de réplication latente du virus d'Epstein Barr (OriP) et la séquence de la protéine virale EBNA-1 du même virus, se maintiennent de manière stable dans des cellules humaines, même après divisions cellulaires. Cette stabilité est due à la capacité d'EBNA-1 d'activer la réplication de l'ADN plasmidique à partir de OriP et de faciliter la ségrégation du plasmide durant la division cellulaire. Le système EBNA-1/OriP peut aussi être utilisé dans des plasmides pour la transfection stable de certaines cellules de porc (Min, Oh *et al.* 2003) ou d'embryons de primates (Wolfgang, Marshall *et al.* 2002), voir même dans des cellules de souris si elles contiennent l'EBP2 humaine (Habel, Drouin *et al.* 2004).

Un petit vecteur circulaire, pEPI-1, a également été développé, il est basé sur une origine de réplication SV40 et des régions d'attachement à la matrice nucléaire (MARs). Il présente l'avantage d'être capable d'une expression épisomale stable sans coder pour aucune protéine d'origine virale (Piechaczek, Fetzer *et al.* 1999). Les MARs sont des séquences d'ADN ayant une forte affinité pour les protéines de la matrice nucléaire. Ces MARs seraient capables de recruter des facteurs cellulaires qui seraient responsable à la fois de sa stabilité mitotique et de sa réplication épisomale. Il a été par exemple démontré *in vivo* que le pEPI-1 est associé de manière spécifique par ses MARs à la matrice nucléaire (Baiker, Maercker *et al.* 2000) et cette interaction permet sa coségrégation avec les chromosomes lors des mitoses. De plus les MARs du pEPI-1 interagissent probablement avec d'autres protéines nucléaires permettant la déstabilisation de l'hélice et autorisant ainsi l'assemblage de la machinerie de réplication. Ainsi la ségrégation et la réplication sont-elles assurées par des facteurs endogènes. Cependant les MARs ne semblent pas fonctionner dans tous les types cellulaires (Chancham, van Ijperen *et al.* 2003).

D'autres systèmes permettent l'amplification autonome du plasmide au sein de la cellule sans intégration ni ségrégation lors des mitoses. Ainsi l'origine Py (PyOri) est utilisée en combinaison avec le gène de l'antigène large du Polyomavirus (PyLT) pour une amplification autonome du plasmide au sein de la cellule. Un tel système d'expression transitoire qui permet une amplification extrachromosomale des plasmides autorise un plus grand nombre de copies à persister dans la cellule transfectée tout au long de la phase d'expression induisant une augmentation significative de l'expression du transgène. Ce

système à été utilisé en combinaison avec le système EBNA-1/OriP pour obtenir une forte production du transgène *in vitro* (Kunaparaju, Liao *et al.* 2005).

3. Effets indésirables de l'acide nucléique dus à des réactions immunitaires contre la protéine exprimée ou l'ADN

Lorsque le transfert est réalisé *in vivo*, des réponses inflammatoires et immunitaires peuvent être déclenchées. Ceci peut être dû à la reconnaissance du transgène en tant qu'ADN exogène et/ou à la reconnaissance du produit de ce gène en tant que protéine étrangère à l'organisme.

a) Réaction immunitaire contre l'ADN : les motifs CpG non méthylés

L'amplification bactérienne permet de produire puis purifier rapidement et en grande quantité le plasmide à transfecter. Toutefois, le plasmide ADN amplifié sera biochimiquement différent de l'ADN des mammifères. Notamment, l'absence de méthylation des résidus cytosines (CpG non méthylés) pourra conduire à l'activation de la réponse immunitaire. Il est à noter que les risques de contaminations par les lipopolysaccharides bactériens fortement immunogènes sont considérablement réduits par la préparation de l'ADN à l'aide de kits commerciaux appropriés « EndotoxinFree® ». Le système immunitaire des mammifères répond à l'infection bactérienne en initiant rapidement une réaction inflammatoire qui limite la propagation précoce des agents pathogènes et facilite l'émergence d'une réponse immunitaire antigène spécifique. Les motifs moléculaires conservés et présentés par les micro-organismes aux cellules de l'immunité sont appelés « pathogen associated molecular pattern » (PAMP). Les PAMP regroupent les lipopolysaccharides, les peptidoglycanes, et les motifs CpG non méthylés de l'ADN bactérien.

Les motifs CpG sont 4 fois moins nombreux dans le génome des vertébrés et sont généralement méthylés (Bird 1986). Cette différence structurale entre l'ADN bactérien et celui des vertébrés permet la reconnaissance de l'ADN bactérien en tant qu'élément étranger. Par ailleurs, ces dinucléotides doivent se présenter dans un contexte de séquence particulier (5'-Purine-Purine-C-G-Pyrimidine-Pyrimidine-3') pour induire une réponse inflammatoire maximale. La capacité immunostimulatrice de l'ADN bactérien a été mise en évidence par Tokunaga *et al.* en 1984, qui ont montré que l'ADN bactérien activait les cellules « natural killer » (NK) et induisait la production d'interféron, alors que l'ADN de mammifères ne l'induisait pas (Tokunaga, Yamamoto *et al.* 1984). De la même façon, l'ADN bactérien induit également la prolifération de cellules B de souris et la production d'immunoglobulines, alors que l'ADN de mammifères ne le fait pas (Messina, Gilkeson *et al.* 1991). C'est seulement en 1995 que les motifs CpG non méthylés ont été identifiés comme étant à l'origine de l'activation des cellules B et de la production d'immunoglobulines (Krieg, Yi *et al.* 1995). De plus, les lymphocytes B assurent la production de certaines cytokines telles que l'interleukine-6, l'interleukine-12 et l'interféron- γ (Klinman, Yi *et al.* 1996). Les monocytes et les macrophages vont également produire de l'interleukine-12 en réponse à la reconnaissance des motifs CpG non méthylés (Stacey, Sweet *et al.* 1996). De façon similaire, les cellules dendritiques conduiront à la production de l'interleukine-6 et-12, mais aussi d'interféron- γ et de TNF- α (Jakob, Walker *et al.* 1998). Les cellules dendritiques seront aussi capables de promouvoir l'activation des cellules T. Enfin, la reconnaissance des motifs CpG non méthylés pourra activer des cellules NK (Klinman, Yi *et al.* 1996) (pour une revue : voir (Krieg 2001)) (voir figure 23).

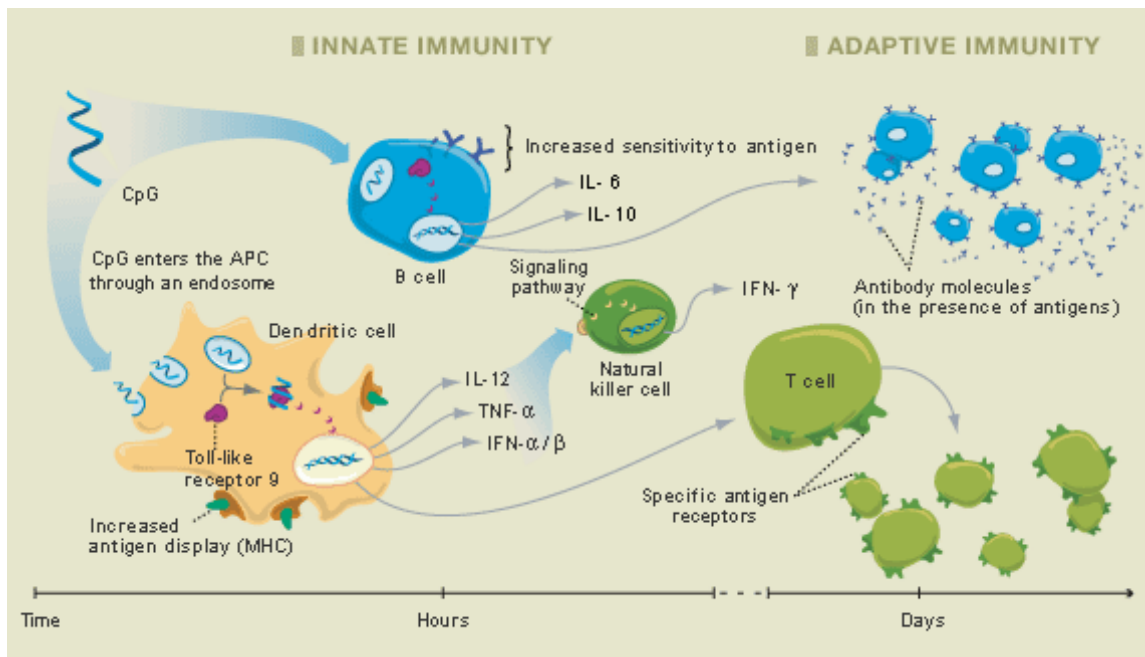


Figure 23 : Représentation schématique de la cascade d'activation de cellules du système immunitaire suite à une stimulation par de l'ADN comportant des motifs CpG non méthylés. Source : http://www.coleypharma.com/coley/tlr9_agonists.

Les PAMP peuvent être reconnus par des récepteurs présents sur les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules endothéliales. Ces récepteurs permettent une réponse rapide à l'infection bactérienne. Parmi ces récepteurs, le récepteur 9 de la famille des « toll-like » récepteurs (TLR-9), présent sur les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B permet la reconnaissance des motifs CpG non méthylés (Hemmi, Takeuchi *et al.* 2000; Imler et Hoffmann 2001; Takeshita, Leifer *et al.* 2001; Chuang, Lee *et al.* 2002). Le récepteur TLR-9 n'est pas exprimé dans toutes les cellules, par exemple il n'est pas présent au niveau des cellules musculaires (Frost, Nystrom *et al.* 2006).

Plusieurs approches ont été proposées pour réduire la réponse immunitaire induite par les motifs CpG non méthylés. La première consiste à méthyler les motifs CpG. Dans ce cas, l'expression du transgène est initialement plus faible, mais continue à augmenter dans les 2 semaines qui suivent le transfert de gènes, alors que l'expression diminue lorsque le plasmide contient des motifs CpG non méthylés (McMahon, Wells *et al.* 1998). La réduction initiale de l'expression du transgène pourrait être expliquée par une réduction de l'activité du promoteur en relation avec la méthylation du plasmide. En effet, la méthylation des motifs CpG est associée à une condensation de la chromatine qui gêne la fixation de facteurs de transcription (Tate et Bird 1993). La baisse d'activité du promoteur peut être compensée par une augmentation de la quantité d'ADN injectée, puisque celui-ci n'induit alors plus de réponse inflammatoire. D'autres solutions ont été envisagées pour réduire le nombre de motifs CpG non méthylés, comme la mutation des régions flanquantes du motif pour faire perdre le contexte de séquence (Yew, Zhao *et al.* 2000), l'excision des zones non indispensables au bon fonctionnement du plasmide (Yew, Zhao *et al.* 2002) ou l'inversion de l'ordre du motif (GC au lieu de CG) (Tan, Li *et al.* 1999). Dans tous les cas, la réduction de la production de cytokines qui en résulte permet d'améliorer la durée d'expression du transgène. De même, l'injection intrapéritonéale de dexaméthasone, un glucocorticoïde anti-inflammatoire, permet également d'améliorer l'efficacité de transfection (Malone, Hickman *et al.* 1994; Tan, Li *et al.* 1999).

b) Réaction immunitaire contre la protéine exogène

La nature de la protéine codée par le transgène est importante. En effet, il a été démontré que 2 protéines couramment utilisées pour leur facilité à être détectée, β -galactosidase et luciférase, sont à l'origine de la production d'anticorps (Doh, Vahlsing *et al.* 1997; Wells, Maule *et al.* 1997). Elles possèdent cependant des immunogénicités différentes. Ainsi, la protéine luciférase conduit à une production d'anticorps plus modérée que celle induite par la protéine β -galactosidase, dont l'expression diminue alors plus rapidement (Davis, Millan *et al.* 1997). La localisation de la luciférase dans les peroxyssomes pourrait expliquer cette différence (Distel, Gould *et al.* 1992). Lorsque la β -galactosidase est exprimée dans le cytoplasme, aucune réaction immunitaire n'est observée dans les 4 semaines qui suivent la transfection, alors qu'une réponse est observée dès le 12^{ème} jour si la β -galactosidase est exprimée à la surface de la cellule transfectée (Sarukhan, Soudais *et al.* 2001). D'autre part, chez des souris *mdx*, modèle de la myopathie de Duchenne, dont la membrane sarcoplasmique est fragilisée par l'absence de la protéine dystrophine, la β -galactosidase pourrait quitter le cytoplasme et induire une réponse immunitaire plus importante que chez des souris saines (Yuasa, Sakamoto *et al.* 2002).

Des expériences de transfection de la protéine érythropoïétine (EPO) ont également montré l'importance du choix de l'espèce d'origine du transgène et de la cellule hôte. Ainsi, il a été montré que l'expression d'EPO humaine chez la souris conduisait à une expression plus courte que celle observée lorsque le gène était d'origine murine (Tripathy, Black *et al.* 1996). Il en est de même chez la souris *mdx* où l'expression de la dystrophine est mieux tolérée quand le gène est d'origine murine que lorsqu'il est d'origine humaine (Ferrer, Wells *et al.* 2000).

La nature du promoteur contrôlant l'expression du transgène revêt également une grande importance. L'utilisation préférentielle de promoteurs tissus-spécifiques par rapport aux promoteurs viraux permet une expression spécifique à un type de tissu, mais elle permet aussi de limiter la réponse immunitaire et d'améliorer la durée d'expression du transgène (Cordier, Gao *et al.* 2001; Weeratna, Wu *et al.* 2001). Il a été suggéré que cette réponse immunitaire était provoquée par l'expression du transgène par des cellules présentatrices d'antigènes qui auraient été transfectées (Davis, Millan *et al.* 1997). En effet, l'utilisation d'un promoteur muscle-spécifique ne permet pas l'expression du transgène dans les cellules présentatrices d'antigènes, contrairement aux promoteurs viraux (Cordier, Gao *et al.* 2001; Weeratna, Wu *et al.* 2001; Yuasa, Sakamoto *et al.* 2002).

Il est à noter que l'utilisation de vecteurs viraux pour le transfert de gènes peut conduire au recrutement de cellules immunitaires du fait de la reconnaissance des protéines virales par l'organisme hôte, pouvant ainsi amplifier la réponse immunitaire comparativement à celle obtenue lors d'un transfert de gènes par injection de plasmide ADN nu (Brown et Lillicrap 2002) (voir chapitre IV.A. de cette introduction).

IV. Les différentes méthodes de transfert

Comme nous l'avons vu dans les chapitres précédents, les acides nucléiques ont de nombreuses barrières biologiques à franchir. Pour améliorer l'efficacité de transfert, divers systèmes ont donc été développés afin de faciliter le passage de ces barrières. La principale limite de la thérapie génique réside en effet actuellement dans le développement de systèmes efficaces de transfert des acides nucléiques.

Le transfert de gènes en clinique peut se faire par deux approches conceptuellement différentes : « *ex vivo* » et « *in vivo* ». Un traitement *ex vivo* implique un prélèvement des cellules du patient, leur modification par transfert de gènes *in vitro* puis leur réinjection chez

le patient. Un traitement *in vivo* implique l'injection des acides nucléiques directement aux patients. Quelle que soit l'approche, l'utilisation de vecteurs "transporteurs" du gène thérapeutique, capables de surmonter les diverses barrières biologiques mentionnées précédemment, est nécessaire pour favoriser l'entrée dans la cellule cible ou le noyau.

Le vecteur idéal pour le transfert de gènes devra avoir les critères suivants: (1) spécifique vis-à-vis des cellules cibles, (2) sans dissémination du gène dans tout l'organisme, (3) résistant aux dégradations métaboliques et/ou aux attaques par le système immunitaire, (4) sûr, c'est à dire avoir le moins d'effets secondaires, et (5) capable d'exprimer suffisamment et de manière régulable le gène d'intérêt thérapeutique aussi longtemps que nécessaire. Il existe diverses méthodes de transfert de gènes (voir figure 24) qui sont en général classées en deux catégories : (a) le transfert par des vecteurs biologiques viraux, (b) le transfert par des approches chimiques ou physiques qualifiées de non virales.

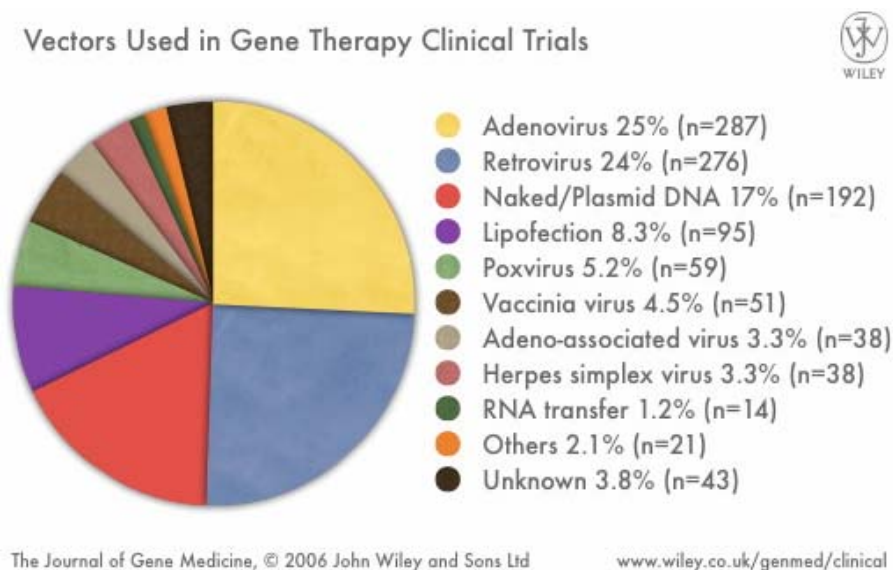


Figure 24 : Les vecteurs de transfert de gènes utilisés en essai clinique. Le pourcentage indiqué correspond au nombre de protocoles d'essais cliniques menés avec les différents vecteurs. D'après le site web de Witey Genetic Medecine : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/> (Source 2006).

A. Les méthodes virales

Les virus, de part leur longue évolution et leur tropisme cellulaire naturel, représentent des outils de choix pour la thérapie génique en terme d'efficacité de pénétration intracellulaire et éventuellement de persistance du matériel génétique (pour revue générale, voir (Kay, Glorioso *et al.* 2001)). Ce sont donc naturellement les premiers vecteurs à avoir été utilisés ce sont aussi les plus utilisés notamment les rétrovirus et adénovirus.

Les virus pénètrent spécifiquement et efficacement dans de multiples cellules en utilisant divers mécanismes pour accéder au compartiment nucléaire (Whittaker 2003). Ensuite, ils s'approprient la machinerie cellulaire pour exprimer leur patrimoine génétique et se multiplier afin d'infecter d'autres cellules. C'est pourquoi, ces dernières années, la plupart des protocoles de thérapie génique ont fait appel à ce genre de vecteur (pour un récapitulatif global non exhaustif <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/PROTOCOL.pdf>, voir aussi figure 24) Cependant les virus sauvages ne peuvent servir directement à des expériences de thérapie génique, car la plupart d'entre eux sont pathogènes et dangereux pour l'homme. Afin de devenir un vecteur, le virus est modifié par génie génétique. De façon simplifiée, le principe du transfert de gènes par des vecteurs viraux est le suivant :

- (1) les virus sont rendus inaptes à la réplication par délétion des séquences responsables de sa virulence et de sa réplication. Toutefois, le virus conserve les nombreuses structures qui lui permettent d'infecter une cellule (protéines de l'enveloppe, protéine fusogène, etc.). Le virus modifié conserve ainsi sa capacité de pénétration dans les cellules, il permet la production de la protéine d'intérêt thérapeutique, mais sans production de particules virales
- (2) la cassette d'expression contenant un promoteur et le gène d'intérêt est insérée au niveau de ces délétions (la taille maximale de la cassette d'expression dépend du virus considéré).
- (3) ce virus recombinant est transfecté dans une lignée cellulaire d'encapsidation qui contient les gènes viraux indispensables,
- (4) les cellules d'encapsidation permettent ainsi la production de virus recombinants incapables de se répliquer ensuite dans les cellules cibles.

Ces particules virales non-pathogènes ont été utilisées pour de nombreuses applications *in vivo* et suivant le type de tissus ou de cellules ciblés, différents vecteurs ont été utilisés. Les vecteurs viraux sont classés en deux grands groupes : ceux qui intègrent leur patrimoine génétique à l'ADN de la cellule hôte (lentivirus et rétrovirus) et ceux qui ne l'intègrent pas (virus adénoviraux, adénoassociés et herpétiques). Les différents types de vecteurs viraux utilisés sont représentés dans le tableau 2.

Vecteur	Génome	Taille de l'insert	Immunogénicité	Intégration dans le génome	Durée d'expression	Cellules cibles	Avantages	Inconvénients
Rétrovirus	ARN simple brin	≤ 8 kb	Faible	Oui	Pendant toute la durée de vie de la cellule	En division	Adapté pour des applications <i>ex vivo</i> , faible immunogénicité, expression à long terme	Risques d'effets liés à l'insertion aléatoire dans le génome, faible titre de production, faible efficacité de transfection <i>in vivo</i>
Lentivirus	ARN simple brin	≤ 8 kb	Faible	Oui	Pendant toute la durée de vie de la cellule	En division et quiescentes	Expression à long terme et infection de cellules quiescentes	Risques d'effets liés à l'insertion dans le génome, titre de production un peu faible, pathogène
Adénovirus	ADN double brin	≤ 8 kb	Forte	Non	6 semaines	En division et quiescentes	Adapté pour une expression à court terme <i>in vivo</i> , production à haut titre, tropisme naturel pour les voies aériennes, efficacité de transfection	Immunogène et inflammatoire (capside), plus de 50% de la population humaine a des anticorps pré-existants; n'infecte pas les lymphocytes, stabilité moyenne
Gutless Adénovirus	ADN double brin	37 kb	Faible	Non	> 1 an	En division et quiescentes	Adapté pour une expression à long terme	Difficile à produire; nécessite un vecteur auxiliaire pour l'apport des protéines permettant la réplication
AAV	ADN simple brin	≤ 5 kb	Faible	?	Jusqu'à 1 an	En division et quiescentes	Large tropisme, non inflammatoire, non pathogène, adapté pour une expression à long terme	Taille de l'insert limitée, 30% de la population humaine a des anticorps pré-existants (selon les sérotypes), faible titre de production, effet cytopathique
Herpes virus simplex	ADN double brin	≤ 40 kb	Forte	Non	> 6 mois	En division et quiescentes	Peut exprimer plusieurs gènes; principalement "neurotropique" <i>in vivo</i> , bon titre de production	Induit une toxicité cellulaire et une inflammation, expression transitoire dans les cellules autres que neurones
Plasmide	ADN double brin	Illimitée	Faible (peut être augmentée par la présence de CpG)	Non	> 2 ans dans le muscle; court terme dans les autres tissus	En division et quiescentes	Facile à produire; peu cher, efficacité de transfection peut être améliorée par des vecteurs physiques ou chimiques	Mécanismes intrinsèques d'entrée dans la cellule mal connus

Tableau 2 : Propriétés des différents vecteurs utilisés en thérapie génique.

1. Rétrovirus

Ils sont impliqués dans de graves pathologies humaines (leucémies, SIDA) et possèdent un patrimoine génétique particulier sous forme de double brin d'ARN, ainsi qu'une enzyme spécifique, la transcriptase reverse (TR), qui permet le passage de l'ARN à l'ADN proviral.

Ils sont capables de transduire une grande fraction de cellules cibles en mitose et de permettre une intégration stable du matériel génétique dans le génome des cellules cibles. Les gènes transférés sont ainsi transmis aux générations successives de cellules filles, permettant ainsi une expression stable à long terme. Ils ont été les premiers virus testés, dès 1981 (Wei, Gibson *et al.* 1981).

Cependant leur emploi reste limité au transfert de gènes dans des cellules en division et également à des cellules facilement prélevables pour des stratégies *ex vivo*. En effet ils sont rapidement inactivés par le système du complément lorsqu'ils sont injectés par voie systémique. Les essais menés *in vivo* ont ainsi montré une efficacité de transfection réduite. De plus l'obtention des quantités de virus nécessaires à des essais cliniques est difficile et coûteuse. Ils possèdent encore d'autres inconvénients comme la faible capacité d'incorporation d'un exogène (≤ 8 kb) et le manque de spécificité cellulaire. En effet, les protéines de l'enveloppe sont capables de se lier à de nombreux récepteurs portés par différents types de cellules. Enfin, l'intégration aléatoire de leur génome peut engendrer une mutagenèse conduisant à une anomalie du cycle cellulaire, et activer des oncogènes et, comme dans le cas de certains des "enfants bulles", aboutir à des leucémies. Ce risque de mutation insertionnelle est la principale restriction à l'utilisation clinique de ces vecteurs (Brenner et Malech 2003).

2. Lentivirus

Actuellement de gros progrès sont faits pour développer d'autres vecteurs rétroviraux : les lentivirus (virus à ARN, capacité d'insert ≤ 8 kb) et plus particulièrement les virus de l'immunodéficience (HIV, SIV, FIV). Ils ont eux, la capacité de transduire des cellules qui ne se divisent pas (Kafri, Blomer *et al.* 1997) (voir figure 25). Leur supériorité pour l'application directe *in vivo* (cerveau, rétine, muscle, foie) a été démontrée (Kafri, Blomer *et al.* 1997; Zufferey, Nagy *et al.* 1997). Cependant le risque de mutation insertionnelle demeure (Woods, Muessig *et al.* 2003).

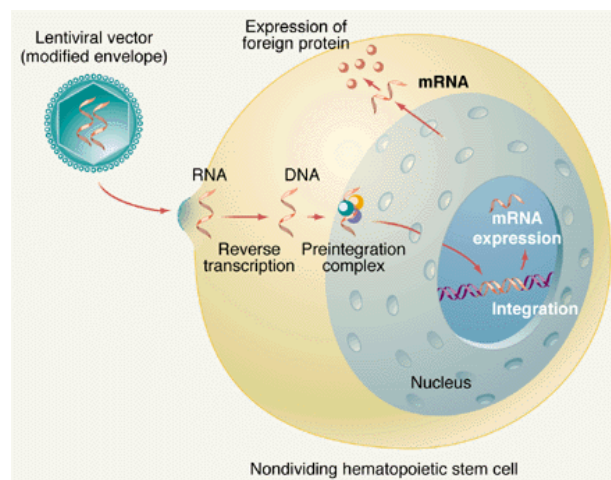


Figure 25 : Transfert de gènes par un vecteur lentiviral. Après avoir infecté une cellule, l'ARN du vecteur, contenant le gène d'intérêt est reverse transcrit en ADN. Cet ADN forme un complexe de préintégration avec la protéine accessoire Vpr, l'enzyme intégrase et la protéine codée par le gène gag du virus. Ce complexe comporte un signal de localisation nucléaire qui lui permet de passer l'enveloppe nucléaire. Une fois à l'intérieur du noyau l'ADN est inséré dans le génome de l'hôte par l'action de l'intégrase. D'après (Amado et Chen 1999).

3. Adénovirus

Les adénovirus sont particulièrement adaptés aux protocoles de thérapie génique. Ils sont responsables chez l'homme d'infections bénignes (conjonctivites, gastro-entérites...) et sont peu pathogènes. Actuellement, ces virus sont parmi les outils les plus prometteurs et aussi les plus utilisés en thérapie génique, malgré le décès d'un jeune patient en 1999 (Carmen 2001; St George 2003). Ce sont des virus non enveloppés de forme icosaédrique possédant un double brin d'ADN de 36 kb. Après fixation et pénétration par endocytose dans la cellule, le génome viral migre vers le noyau mais ne s'intègre pas au patrimoine génétique de l'hôte (voir figure 26), ne provoquant qu'une expression transitoire du gène thérapeutique (ce qui est à la fois un avantage et un inconvénient), mais évitant les risques de mutagenèse. Par ailleurs, ces virus sont capables d'infecter de nombreux types de cellules quiescentes ou en division (Ragot, Vincent *et al.* 1993) et possèdent un tropisme naturel pour les voies aériennes supérieures.

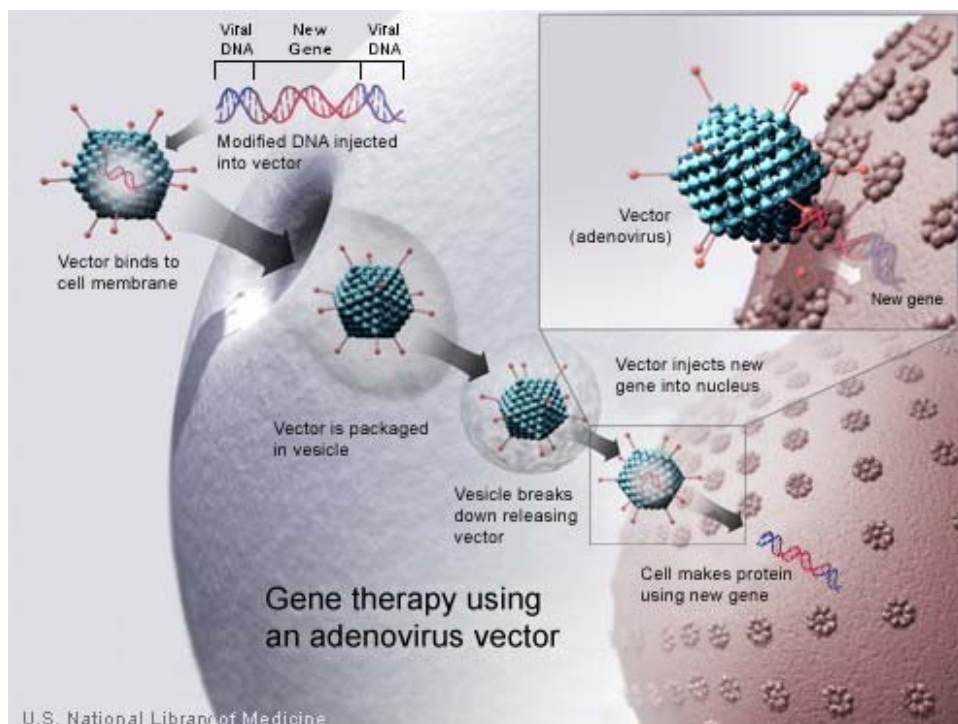


Figure 26 : Transfert de gènes par un adénovirus modifié. Source : http://ghr.nlm.nih.gov/info=gene_therapy/show/alltopics.

L'inconvénient majeur à l'utilisation de ces vecteurs est lié à la forte réaction immunogène de l'hôte (due à l'expression résiduelle de protéines virales), qui développe des anticorps anti-adénovirus empêchant ainsi une administration répétée de ces vecteurs. L'autre limitation réside dans la faible capacité d'incorporation d'un exogène (≤ 8 kb).

Mais récemment, une nouvelle génération d'adénovirus a vu le jour (Ad. gutless), ce sont des adénovirus qui ont été développés en délétant toutes les régions virales. Il en résulte un gain de place et ces virus possèdent une capacité d'incorporation allant jusqu'à 35 kb. Autre avantage, la réponse immunitaire est fortement réduite *in vivo*. Etant dépourvus de toute séquence virale, les Adénovirus « gutless » nécessitent l'apport des protéines virales par un virus « helper ». Le niveau de contamination des préparations finales par des virus « helper » est encore 0,1 à 1% trop élevé pour être utilisées en clinique (Alba, Bosch *et al.* 2005).

Des vecteurs adénovirus sont actuellement testés en phase II et III d'essais cliniques pour des applications angiogéniques et pour le cancer (St George 2003). En Chine, l'adénovirus modifié H101 a même déjà reçu l'autorisation de la Chinese State Food and Drug

Administration (SFDA) pour être utilisé en combinaison avec la chimiothérapie comme traitement clinique anti tumorale.

4. Les virus associés aux adénovirus (AAV)

Les vecteurs issus de virus associés aux adénovirus (AAV pour Adeno Associated Virus) sont des membres défectueux de la famille des parvovirus. Ils tirent leur nom du fait qu'ils ont besoin de l'aide d'autre virus (adénovirus ou HSV) pour accomplir leur cycle complet de réplication. Ils possèdent un simple brin d'ADN et sont non pathogènes pour l'homme, mais une contamination potentielle par le virus helper est possible pendant la préparation. L'avantage de ces virus est leur capacité à intégrer leur patrimoine dans la cellule hôte, permettant une expression prolongée du gène (voir figure 27). Par ailleurs, ils sont capables d'infecter à la fois des cellules en division et quiescentes.

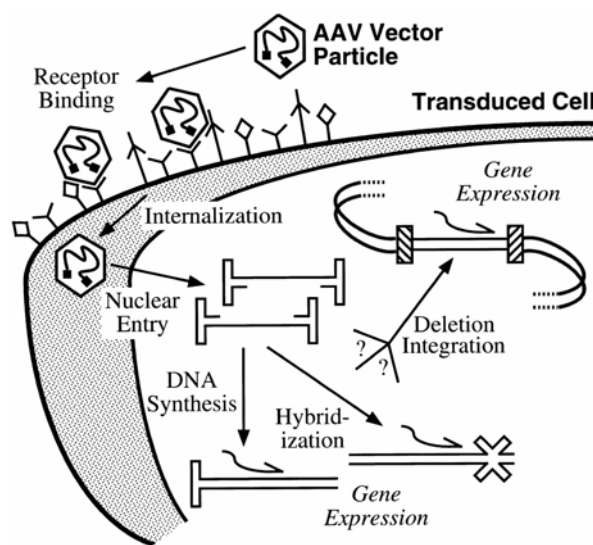


Figure 27 : Transfert de gènes par un vecteur AAV. Les différentes étapes requises pour le transfert par un AAV sont indiquées, incluant une interaction initiale avec divers récepteurs et corécepteurs possibles à la surface de la cellule, l'internalisation de la particule virale, l'entrée et la libération dans le noyau du génome simple brin du vecteur, suivi soit par la synthèse du brin d'ADN complémentaire, soit par une hybridation avec un brin complémentaire, et ou par l'intégration chromosomale. Une fois qu'une séquence double brin a été formée, l'expression peut avoir lieu. Les structures secondaires potentielles du génome viral épisomale sont montrées, ainsi que les molécules d'ARN encodées par le vecteur (demi-flèches courbes). Les points d'interrogation indiquent un manque de compréhension détaillée des étapes impliquées. D'après (Russell et Kay 1999).

De plus ils possèdent une bonne efficacité de transfection *in vivo*. En effet, les premiers essais *in vivo* ont montré une expression stable pendant plusieurs années chez la souris (Donahue, McArthur *et al.* 1999) et plusieurs mois chez les gros animaux (Linden et Woo 1999) après injection et même après administration orale (During, Xu *et al.* 1998). Les vecteurs AAV semblent donc conjuguer les avantages des rétrovirus et des adénovirus. C'est pourquoi leurs applications en thérapie génique n'ont cessé d'augmenter ces dernières années. Cependant, ces virus souffrent d'inconvénients majeurs, comme leur capacité de stockage d'un matériel génétique exogène limitée à 6 kb (Grieger et Samulski 2005) et la difficulté de produire de tels vecteurs en lots cliniques et en grande quantité.

5. Herpes virus simplex (HSV)

Le virus herpétique est un virus à ADN neurotropique peu pathogène pour l'homme. Ce sont des virus humains ayant déjà probablement infecté 80% de la population. Les vecteurs utilisant ce virus sont capables d'infecter de nombreuses cellules, grâce aux multiples récepteurs reconnaissant les protéines de l'enveloppe. De plus, le virus modifié perd sa capacité répliquative et peut accepter des cassettes allant jusqu'à 25 kb. Son neurotropisme est particulièrement attractif pour le traitement des cancers cérébraux., en effet les vecteurs dérivés du virus de l'herpès simplex (HSV-1), après injection directe, ont la capacité d'infecter les neurones (Breakefield et DeLuca 1991; Latchman 1994) et offrent un espoir de transfert de gènes dans le cas des neuroblastomes (Miyatake, Martuza *et al.* 1997). Le principal avantage de ces virus est leur grande capacité d'insert. Une des versions modifiées de ce virus peut véhiculer des inserts de plus de 100 kb, ce sont les amplicons, une version déletée du virus nécessitant l'emploi d'un virus helper.

En conclusion, les vecteurs viraux possèdent de nombreux avantages pour le transfert de gènes et leur succès dans les protocoles de thérapie génique repose sur leur important potentiel de transfection in vivo. Cependant, ils souffrent de sévères inconvénients :

- *l'intégration d'un transgène de grande taille est souvent difficile,*
- *certains virus engendrent des réactions immunitaires,*
- *d'autres peuvent poser des problèmes de toxicité ou redevenir pathogènes après mutagenèse ou recombinaison avec un virus parent infectieux,*
- *enfin, leur manipulation et la production de lots cliniques sont compliquées et coûteuses.*

*De plus, un problème majeur est le risque d'intégration aléatoire dans le génome de la cellule transfectée. Cette complication a été rencontrée par l'équipe d'Alain Fischer lors de l'utilisation d'un rétrovirus dérivé du MLV (murine leukemia virus) chez des enfants atteints d'immunodéficience sévère liée au chromosome X (Hacein-Bey-Abina, von Kalle *et al.* 2003). En effet, les rétrovirus utilisés ne s'intègrent pas totalement de manière aléatoire dans le génome, mais préférentiellement proche des sites d'initiation de la transcription de gènes actifs. Dans ce cas l'intégration a eu lieu dans une région d'activation du proto-oncogène LM02, qui code un facteur de transcription impliqué dans le contrôle de l'hématopoïèse. Cette intégration a entraîné la surexpression pathogène de LM02, et une leucémie. Ces complications ont conduit à l'arrêt de cet essai.*

Ces problèmes ont incité les chercheurs à développer des vecteurs non viraux de transfert de gènes, plus sûrs.

B. Les méthodes physico-chimiques

Ces vecteurs présentent l'avantage d'être peu immunogènes, et donc de permettre des administrations répétées, de ne pas avoir de taille limite théorique de la cassette d'expression, et d'être facile et peu cher à produire. Ces méthodes sont actuellement en plein essor, et depuis l'injection d'ADN plasmidique nu, de nombreuses méthodes chimiques, physiques ou cellulaires se sont développées.

1. ADN nu

L'injection d'ADN nu plasmidique est le système d'administration le plus simple, et le moins cher, mais il n'était pas du tout évident qu'une simple injection d'ADN permette la transfection de cellules *in vivo*. En 1990, Wolff *et al.* ont montré qu'un ADN nu injecté directement dans le muscle permet une expression efficace et pendant plusieurs mois du transgène par les fibres musculaires (Wolff, Malone *et al.* 1990). On ne connaît encore pas à ce jour le mécanisme d'entrée de l'ADN nu dans les cellules de l'organe injecté *in vivo*.

Cette découverte a ouvert la voie à de nombreuses applications dont l'utilisation du muscle pour produire des protéines secrétées (Levy, Barron *et al.* 1996) ou la vaccination. En effet, l'injection directe d'ADN plasmidique dans le muscle ou la peau permet la production d'antigènes protéiques *in situ* et l'induction de réponses immunitaires protectrices, humorales et cellulaires, sans l'aide d'adjuvant (Davis, Michel *et al.* 1993; Selmaj, Kowal *et al.* 2000) (Montgomery, Shiver *et al.* 1993). La vaccination constitue ainsi une des applications majeures de l'injection d'ADN nu. L'ADN nu, en tant que molécule, ne provoque pas de réponses immunitaires spécifiques, mais la présence sur les plasmides de séquences bactériennes riches en motifs CpG non méthylés (voir chapitre III.E.3.a de cette introduction) favorise *in vivo* les réponses inflammatoires et immunitaires (Krieg 1999). Ceci est donc très intéressant pour la vaccination, mais devient un inconvénient pour le traitement de maladies, encore plus pour le traitement de maladies inflammatoires.

Le muscle squelettique n'est pas le seul organe cible pour l'injection d'ADN nu ; en effet, l'expression du transgène suite à une injection d'ADN nu a été démontrée dans de nombreux organes ou tissus : la peau (Hengge, Chan *et al.* 1995), les articulations (Yovandich, O'Malley *et al.* 1995), le foie (Hickman, Malone *et al.* 1994), la thyroïde (Sikes, O'Malley *et al.* 1994), le muscle cardiaque (Tio, Tkebuchava *et al.* 1999), le cerveau (Schwartz, Benoist *et al.* 1996), le rein (Kuemmerle, Lin *et al.* 2000), le thymus (Li, Bartlett *et al.* 1997), les tumeurs (Vile et Hart 1993).

Les organes prometteurs pour cette approche restent le muscle et la peau; on note ainsi un essai clinique de phase I-II par injection i.m. d'ADN nu codant le VEGF dans le traitement des neuropathies diabétiques.

Le transfert de gènes par injection de plasmide ADN nu est bien une technique simple, rapide et peu coûteuse mais qui souffre également de nombreux inconvénients.

En premier lieu elle possède une faible efficacité de transfection, dans le muscle par exemple, celle-ci est généralement de 1 à 5% des fibres musculaires totales (Wolff, Malone *et al.* 1990; Doh, Vahlsing *et al.* 1997). D'autre part, la transfection est généralement limitée au site d'injection du plasmide ADN nu. Ainsi, malgré les résultats positifs de transfert de gènes observés par injection d'ADN nu dans la peau ou le muscle, les niveaux d'expression obtenus sont trop faibles pour produire un effet thérapeutique (Davis, Whalen *et al.* 1993) pour des applications autres que vaccinales.

L'injection d'ADN nu est une approche très prometteuse de transfert de gènes dans le muscle ou la peau mais elle est plus difficilement envisageable pour des approches systémiques (administrations par voie intraveineuse), car l'ADN plasmidique nu, s'il n'est pas protégé des protéines du sérum subit une dégradation très rapide par les nucléases (Mahato 1999) et à une demi-vie plasmatique très courte (Houk, Martin *et al.* 2001) (Mahato, Takakura *et al.* 1997).

Certaines améliorations ont donc été apportées par la modification d'éléments de la séquence du plasmide comme le promoteur, le signal de polyadénylation, la séquence de terminaison ou la nature du transgène (Hartikka, Sawdey *et al.* 1996). Des plasmides particuliers, appelés « minicercles », ont également été développés. Ceux-ci comportent ni origine de répllication bactérienne, ni gène de résistance aux antibiotiques, et de ce fait possèdent une taille totale inférieure aux plasmides couramment utilisés (Darquet, Cameron *et*

al. 1997; Darquet, Rangara *et al.* 1999). Les minicercles sont produits en réalisant une recombinaison site-spécifique au moyen de séquences de l'intégrase du phage lambda encadrant le transgène, la cassette d'expression étant excisée de la séquence bactérienne indésirable. Ainsi l'efficacité de transfection est améliorée *in vitro* et *in vivo* non seulement par la suppression des séquences constitutives du plasmide qui limitaient l'expression du transgène, mais aussi en favorisant la pénétration cellulaire et la migration vers le noyau du fait de la réduction de la taille du plasmide.

Par ailleurs, l'induction d'un cycle de dégénérescence-régénération 3 à 5 jours avant le transfert de gènes s'accompagne aussi d'une amélioration de l'efficacité de transfection (Wells 1993; Vitadello, Schiaffino *et al.* 1994; Davis, Millan *et al.* 1997). Enfin, l'efficacité de transfection par ADN nue est meilleure chez des animaux jeunes par rapport à des animaux adultes (Doh, Vahlsing *et al.* 1997). Dans ces deux derniers cas, une déstabilisation de la membrane plasmique et de son environnement peuvent contribuer à une meilleure pénétration de l'ADN dans la cellule.

La nécessité d'améliorer cette technique simple de transfert non virale a conduit au développement de divers types de vecteurs non viraux :

- 1) les vecteurs synthétiques qui sont des molécules capables d'interagir avec le plasmide ADN nu en modifiant ses propriétés physico-chimiques ;
- 2) les vecteurs physiques qui utilisent des moyens physiques pour propulser l'ADN contre la cellule (Li et Ma 2001; Niidome et Huang 2002; Herweijer et Wolff 2003).

Chacun de ces vecteurs apporte des avantages par rapport à l'injection d'ADN nu, le choix du vecteur se faisant essentiellement en fonction du but recherché et de son efficacité (Nishikawa et Hashida 2002).

2. Les vecteurs synthétiques

Les deux types de vecteurs synthétiques les plus développés sont les lipides cationiques et les polymères cationiques. Ils forment des complexes avec l'ADN chargé négativement par interactions électrostatiques (appelé respectivement lipoplexes ou polyplexes). Ces complexes chargés positivement favorisent le transfert d'ADN à l'intérieur de la cellule (Scherman, Bessodes *et al.* 1998). Cependant, les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus. Deux hypothèses dominent, la principale étant la voie de l'endocytose (Zhou et Huang 1994; Zabner, Fasbender *et al.* 1995; Labat-Moleur, Steffan *et al.* 1996). L'autre hypothèse suggère que le complexe fusionne avec la membrane plasmique, libérant l'ADN dans le cytoplasme (Felgner, Gadek *et al.* 1987).

Le mécanisme d'entrée dans la cellule influe sur le relargage, le trafic intracellulaire et le temps de vie de l'ADN dans la cellule. L'endocytose est un procédé en plusieurs étapes comprenant une liaison avec la membrane cellulaire, une internalisation du complexe, la formation d'endosomes, la fusion avec les lysosomes est finalement la lyse. Le faible pH et la présence d'enzymes dans les endosomes et les lysosomes entraînent une dégradation de l'ADN encapsulé et des complexes associés. L'ADN qui a échappé à ces dégradations doit ensuite se dissocier des complexes avant ou après son entrée dans le noyau. Cette entrée se fait vraisemblablement par les pores nucléaires ($\varnothing \approx 10\text{nm}$) ou pendant la division cellulaire (Luo et Saltzman 2000).

L'utilisation de ces vecteurs représente environ 10% des essais de thérapie génique actuels.

a) Polymères cationiques

Les polymères cationiques sont des molécules riches en amines (comme les polyéthylèneimines (PEI) branchées ou linéaires) (voir figure 28), en lysines (poly(L-lysine)) ou encore en arginines, groupements protonés à pH physiologique, ce qui permet une association à l'ADN par des interactions électrostatiques multiples.

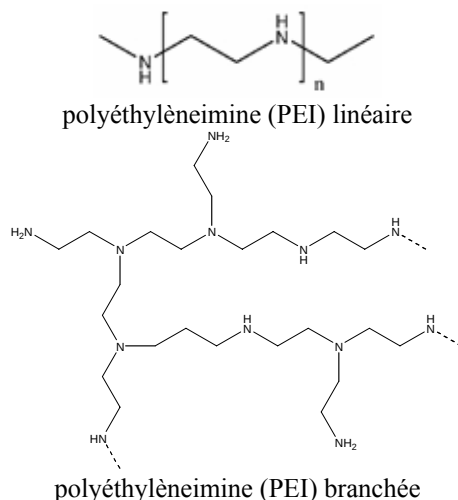


Figure 28 : Structure d'un polyéthylèneimine linéaire ou branché.

Les polymères cationiques assurent la condensation de l'ADN (les complexes ainsi formés sont appelés polyplexes) (Dunlap, Maggi *et al.* 1997) et favorisent l'interaction avec la membrane plasmique notamment par l'interaction avec les protéoglycanes présents sur la face externe de la membrane (Mislick et Baldeschwieler 1996; Ruponen, Yla-Herttuala *et al.* 1999). La pénétration des polyplexes semble se faire par endocytose non spécifique (Godbey, Wu *et al.* 1999; Thomas et Klibanov 2003).

Les lipides cationiques sont faiblement protonés à pH neutre. Lorsque le pH diminue, comme dans les vésicules endosomales, les polyamines, définissant un large spectre de protonation, sont les plus efficaces pour sortir des vésicules. Les complexes polyamines/ADN sont en effet encore capables de se protoner lorsqu'ils sont emprisonnés dans les endosomes. Cet effet tampon expliquerait l'activité endosomolytique qui favorise le passage transmembranaire de l'ADN vers le cytosol (Boussif, Delair *et al.* 1999). En effet dans les vésicules endosomales, la protonation des groupements amines restant se produit, conduisant à un influx d'ion Cl^- dans la vésicule et donc à une entrée d'eau, causant finalement une turgescence de la vésicule contenant le polyplexe. Ce mécanisme est décrit sous le terme « proton-sponge effect » c'est-à-dire un effet éponge à protons. Au final, il se produit une rupture des vésicules et donc une libération du polyplexe dans le cytoplasme (Boussif, Lezoualc'h *et al.* 1995; Thomas et Klibanov 2002). (Abdallah, Hassan *et al.* 1996) (voir figure 29).

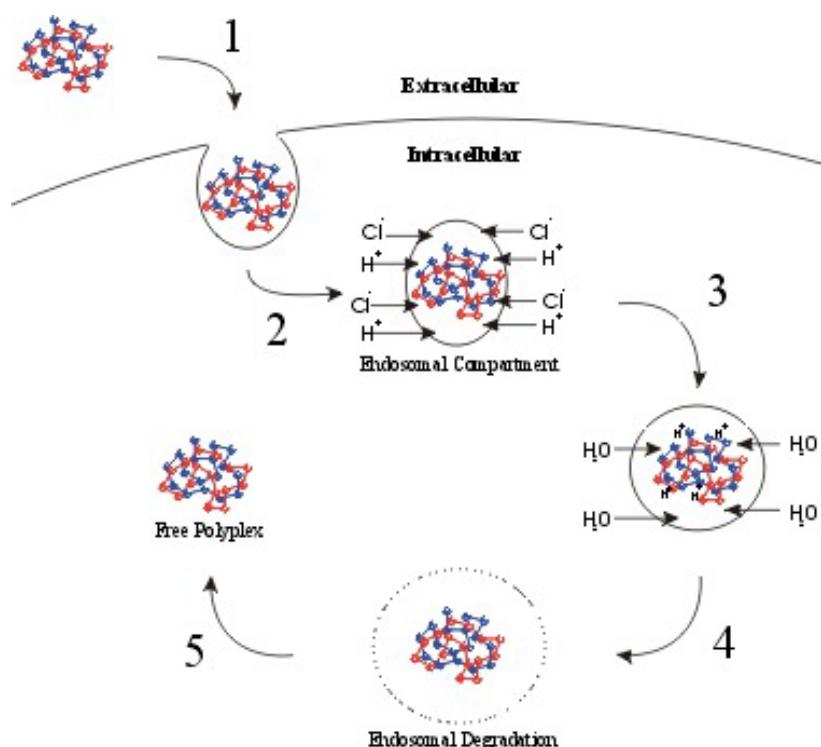


Figure 29 : Représentation schématique des étapes conduisant au transfert de gènes grâce aux polymères cationiques. L'ADN est condensé grâce aux interactions électrostatiques avec le polymère cationique puis ont lieu les 5 étapes illustrées sur le schéma. 1. le polyplexe interagit avec la membrane plasmique puis est internalisé par endocytose. 2. Le compartiment endosomal est acidifié par les pompes à protons situées dans la membrane de l'endosome. Le polyplexe peut aussi se dissocier. 3. Augmentation de l'osmolarité à l'intérieur de la vésicule endosomale entraînant un afflux d'eau. 4. L'endosome gonfle avec l'arrivée d'eau provoquant sa lyse. 5. Le polyplexe et l'ADN sont alors libérés dans le cytoplasme. Le polyplexe sera ensuite transloqué dans le noyau où il sera disloqué libérant ainsi l'ADN. La transcription puis la traduction conduisent alors à l'expression du produit du transgène.

Source http://www.nanochem.bham.ac.uk/gene_delivery/protonsponge.htm.

La poly(L-Lysine) était à l'origine le polymère cationique le plus utilisé. Depuis, il a été montré que les dendrimères et le PEI (Boussif, Lezoualc'h *et al.* 1995) sont capables de former des complexes très efficaces pour le transfert de gènes *in vitro* et *in vivo* dans différents types cellulaires (Boussif, Lezoualc'h *et al.* 1995). Ainsi, le PEI a été utilisé dans le cerveau, le rein et le poumon par voie intraveineuse ou en instillation intratrachéale (Boussif, Delair *et al.* 1999). Les PEI linéaires sont plus efficaces pour le transfert de gènes notamment parce qu'ils sont capables de se dissocier de l'ADN dans le cytoplasme (Itaka, Harada *et al.* 2004). Les PEI branchés, sortis de l'endosome, restent fixés à l'ADN et peuvent même le rester jusque dans le noyau (Godbey, Wu *et al.* 1999). Une fois dans le noyau, ADN et polymères se séparent pour permettre la transcription du gène (Pollard, Remy *et al.* 1998). La transfection avec les PEI linéaires ne dépend pas de la phase du cycle dans laquelle la cellule se trouve au moment de la transfection (Brunner, Furtbauer *et al.* 2002), contrairement aux PEI branchés où l'efficacité de transfection est meilleure lorsque les cellules sont en phase S/G2 (Brunner, Sauer *et al.* 2000). L'absence de membrane nucléaire favoriserait en effet la pénétration de l'ADN. Compte tenu de la faible durée de vie de l'ADN dans le cytoplasme, la transfection en phase G1 se fait trop longtemps avant la disparition de la membrane nucléaire pour que l'ADN atteigne le noyau.

L'injection de complexes de lipides cationiques ou de polymères cationiques dans la circulation systémique est décevante. En effet, ils activent souvent le complément et sont rapidement détruits par le système phagocytaire-mononuclé (Plank, Mechtler *et al.* 1996). Une autre limitation à l'utilisation de ces vecteurs est la possibilité d'interaction non

spécifique avec n'importe quelle surface chargée négativement. Ainsi une administration par voie intraveineuse peut conduire à l'interaction des polyplexes avec les protéines sériques ou les cellules sanguines circulantes ce qui entraîne la formation d'agrégats qui inhibent la transfection et peuvent conduire à une embolisation au niveau de la microcirculation des organes. Les polyplexes sont alors immédiatement neutralisés, conduisant à une accumulation de ces derniers dans les premiers tissus perfusés comme les poumons, le foie et la rate (Thomas et Klibanov 2003).

D'autres formulations ont donc été proposées, avec utilisation de polyéthylène glycol (PEG) afin de masquer les charges positives des complexes (Meyer, Kirpotin *et al.* 1998). Cependant, la diminution du nombre de charges positives à la surface des complexes diminue nettement leurs interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires, et donc l'efficacité de transfection (Wheeler, Palmer *et al.* 1999). L'ajout d'une tête de ciblage exposée à la surface des complexes constitue alors une approche intéressante pour obtenir à nouveau des complexes transfectants et dirigés vers des cellules cibles plus ou moins spécifiques. La stratégie de ciblage la plus employée est la reconnaissance d'un récepteur spécifique d'un type cellulaire. Les ligands utilisés sont par exemple des motifs RGD (Janssen, Schiffelers *et al.* 2003), des folates, des sucres ou encore des fragments d'anticorps. Ce ciblage permet l'interaction des complexes ADN/vecteur avec les membranes cellulaires, cependant l'ADN doit encore atteindre le noyau, et dans ce but, de nombreuses barrières biologiques restent à franchir (Brown, Schatzlein *et al.* 2001).

b) Dendrimères

Les dendrimères sont des structures semblables aux polymères cationiques mais présentant de nombreux branchements (voir figure 30). Les dendrimères sont capables d'interagir avec plusieurs molécules d'ADN par interaction de charges pour former des complexes stables (Kukowska-Latallo, Bielinska *et al.* 1996; Bielinska, Kukowska-Latallo *et al.* 1997) (voir figure 31). Ils possèdent une bonne solubilité dans les milieux aqueux et présentent une faible cytotoxicité (Kukowska-Latallo, Bielinska *et al.* 1996). Une fois dans le cytoplasme, la condensation va conférer à la molécule d'ADN une résistance à la digestion par les nucléases sans empêcher la transcription du gène (Chiou, Tangco *et al.* 1994; Bielinska, Kukowska-Latallo *et al.* 1997).

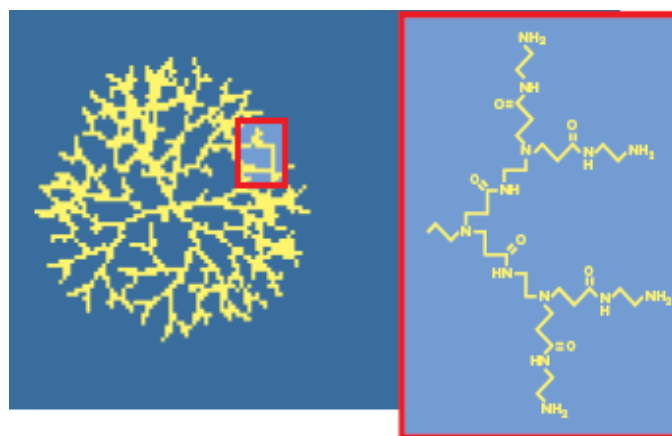


Figure 30 : Diagramme schématique d'un dendrimère. Une portion du dendrimère est élargie pour montrer la structure chimique des branchements moléculaires. Source : http://www1.qiagen.com/literature/brochures/tfbr/1020182_BRO_TF_0302WW.pdf.

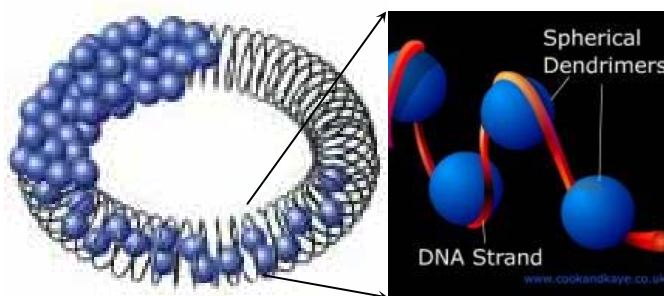


Figure 31 : Modèle de complexe dendrimère–ADN. Les dendrimères (sphères bleues) interagissent avec l’ADN (en noir à gauche et en rouge sur le modèle élargit de droite) pour former une structure circulaire. La partie supérieure droite du complexe montre de l’ADN seule, la partie basse à gauche montre l’interaction entre l’ADN et les dendrimères à l’intérieur du complexe et la partie supérieure gauche montre la structure finale complète couvrant entièrement l’ADN à l’intérieur du complexe.

Sources : http://www1.qiagen.com/literature/brochures/tfbr/1020182_BRO_TF_0302WW.pdf et <http://www.cookandkaye.co.uk>.

c) Lipides cationiques

Les lipides cationiques sont des molécules monomériques amphiphiles comportant 3 parties : une tête polaire chargée positivement (permettant la liaison à l'ADN), une ou plusieurs chaînes hydrophobes et un domaine de liaison séparant les deux éléments (appelé aussi espaceur) (voir figure 32).

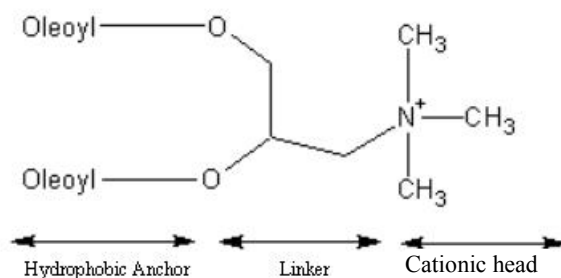


Figure 32 : Représentation schématique d'un lipide cationique. D'après (Chesnoy et Huang 2000).

Le premier lipide cationique utilisé en 1987, est un lipide cationique monovalent : le DOTMA (chlorure de dioléoyloxypropyl-triméthylammonium) (Felgner, Gadek *et al.* 1987). Outre le DOTMA, les lipides cationiques les plus fréquemment utilisés sont : le DOTAP (dioléoyloxypropyltriméthylammonium propane) qui est un autre lipide cationique monovalent, le DOSPA (trifluoroacétate de dioléoyloxy [(spermine-carboxyamido) éthyl] diméthylpropanaminium) qui est un lipide cationique multivalent tout comme la DOGS (acide trifluoroacétique dioctadécylamidoglycylspermine) (voir figure 33). (pour une revue : voir (Han, Mahato *et al.* 2000; Li et Ma 2001; Tranchant, Thompson *et al.* 2004)).

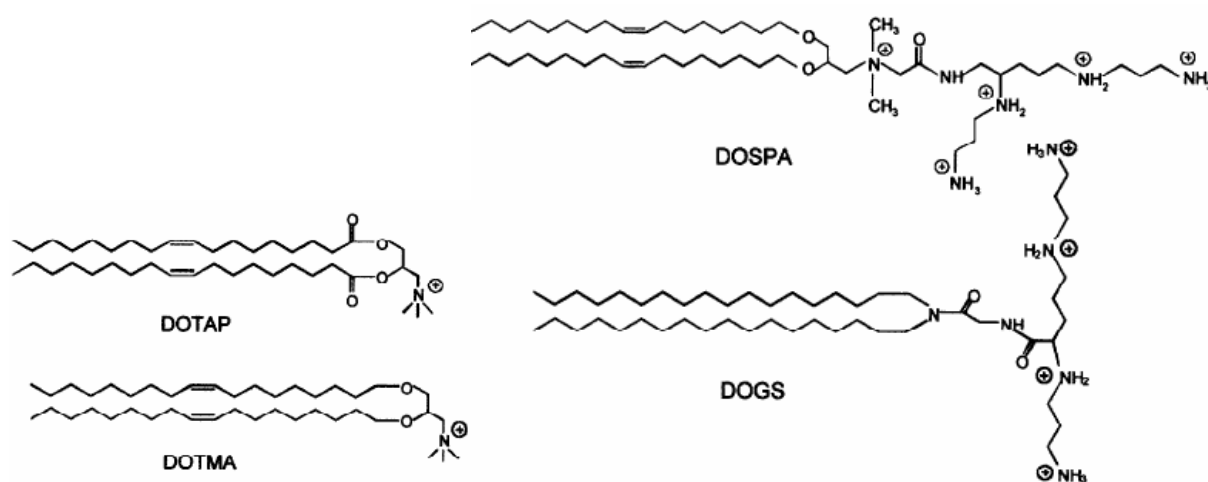


Figure 33 : Structure de lipides cationiques monovalents (DOTAP et DOTMA) et multivalents (DOSPA et DOGS).

La préparation des lipides cationiques implique souvent l'ajout de co-lipides neutres pour favoriser la formation de complexes avec l'ADN et sa fusion avec les membranes cellulaires puis sa dissociation en milieu acide, dans la cellule (Farhood, Serbina *et al.* 1995). Les co-lipides neutres généralement utilisés sont du dioléoylphosphatidyl éthanolamine (DOPE) ou du cholestérol en quantité équimolaire par rapport au lipide cationique (Felgner, Kumar *et al.* 1994).

Il existe de nombreuses similitudes entre le principe de fonctionnement des lipides cationiques et celui des polymères cationiques. Les charges positives des lipides cationiques vont interagir spontanément avec les charges négatives de l'ADN qui est alors condensé (Felgner, Gadek *et al.* 1987). Ce complexe est désigné sous le terme de lipoplexe (voir figure 34).

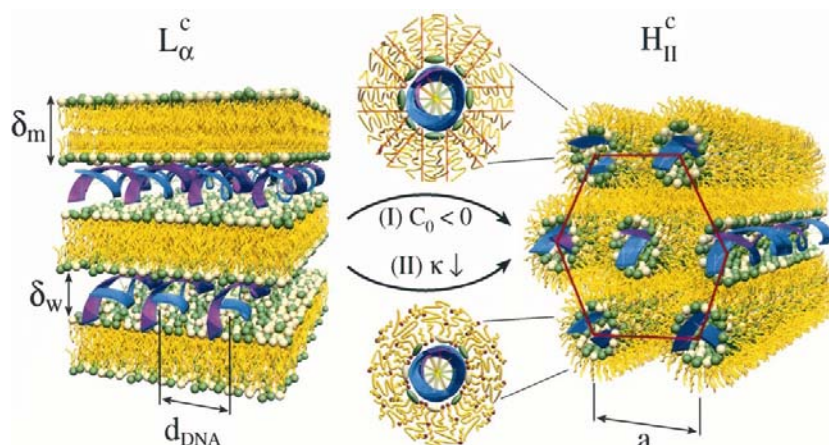
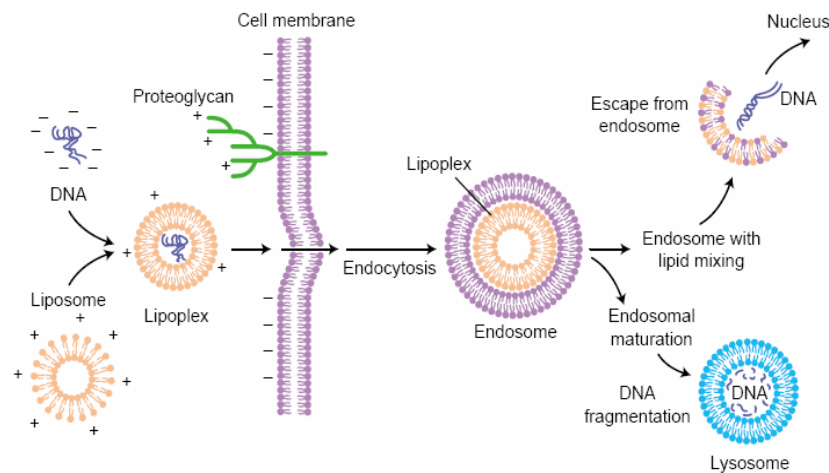


Figure 34 : Description conceptuelle de complexes ADN-liposome cationique. Les hélices d'ADN sont représentées en bleu. La formation d'un lipoplexe en couches lamellaires (phase L_{α}^c à gauche) ou hexagonal (phase H_{II}^c à droite) dépend du type de lipides cationiques utilisés. Le passage d'une structure lamellaire à une structure hexagonale peut se faire selon deux voies représentées schématiquement au centre. La voie (I) passe par un changement de la courbure de la monocouche lipidique en ajoutant du DOPE (le DOPE est en forme de cône alors que le DOTAP est cylindrique). La voie (II) est induite par l'addition d'une mixture de DOPC et d'un cosurfactant (l'hexanol) qui réduisent la rigidité de la membrane. D'après (Koltover, Salditt *et al.* 1998).

Les lipoplexes sont capables de transfecter des cellules *in vitro* avec une efficacité supérieure aux techniques antérieures (précipitation de l'ADN au phosphate de calcium par exemple) (Felgner et Ringold 1989).

De nombreux lipides ont été synthétisés avec le souci d'augmenter l'efficacité de transfert de gènes *in vitro* (en absence et en présence de sérum) et *in vivo*, de diminuer la cytotoxicité, d'augmenter la stabilité des complexes en milieu biologique et d'ajouter éventuellement des éléments de ciblage cellulaire (Colin, Maurice *et al.* 2000).

L'efficacité du transfert dépend du lipide cationique utilisé et du rapport de charge ADN/charges positives du lipide; lorsque ce rapport est proche de un, les charges sont neutralisées et les complexes s'agrègent, ce qui défavorise la transfection *in vivo*. La charge nette positive du lipoplexe va favoriser le rapprochement avec la membrane plasmique qui sera traversée par un mécanisme d'endocytose (Wrobel et Collins 1995; Zabner, Fasbender *et al.* 1995; Coonrod, Li *et al.* 1997). Il semblerait que les endosomes contenant les lipoplexes migrent en direction du noyau et fusionnent entre eux pour former de larges vésicules. L'ADN doit ensuite gagner une position intranucléaire, puis se dissocier du lipide cationique, qui sinon empêcherait la transcription (Zabner, Fasbender *et al.* 1995) (voir figure 35).



Lipoplex-mediated transfection and endocytosis

Expert Reviews in Molecular Medicine©2003 Cambridge University Press

Figure 35 : Transfert de gènes au moyen d'un lipoplexe. Des lipides cationiques formant des micelles (appelés liposomes) sont complexés avec de l'ADN pour former des lipoplexes. La structure fusionne avec la membrane cellulaire, parfois après interaction avec des protéoglycanes de la surface. Les complexes sont alors internalisés par endocytose, formant une vésicule micellaire à double couche inversée. Durant la maturation de l'endosome en un lysosome, la paroi de l'endosome peut se rompre, relâchant l'ADN dans le cytoplasme et potentiellement vers le noyau. L'ADN importé dans le noyau peut alors exprimer le transgène. Sinon l'ADN est dégradé dans le lysosome. D'après (Parker, Newman *et al.* 2003).

Comme pour les polymères cationiques branchés, l'efficacité de transfection est meilleure sur des cellules en phase S/G2 (Brunner, Furtbauer *et al.* 2002). Les lipoplexes possèdent cependant une certaine toxicité vis-à-vis des cellules cibles du transfert de gènes. Cette cytotoxicité est essentiellement liée au rapport de charges électriques entre le lipide et l'ADN, le type de lipide utilisé et la dose administrée (Crook, McLachlan *et al.* 1996; Dass 2004).

Même si l'efficacité de transfection obtenue par ces vecteurs reste faible, ils ont été utilisés dans des essais cliniques pour le traitement de la mucoviscidose et de différents cancers (Voinea et Simionescu 2002).

Il convient cependant de mentionner les résultats étonnants obtenus *in vivo* par l'équipe de Pardridge utilisant des PILs (pegylated immunoliposomes). Ce sont des liposomes cationiques d'environ 100nm dont la surface est recouverte de plusieurs milliers de brins de polyéthylenglycol (PEG) de 2000 Da leur permettant de ne pas être rapidement éliminés par le système réticulo-endothélial après injection intraveineuse. L'ajout sur la surface du PIL d'anticorps spécifiques de certains récepteurs cellulaires (comme le récepteur à l'insuline) lui permet de sortir facilement de la circulation sanguine ou de passer la barrière

hématoencéphalique en utilisant le système de transport endogène de la cellule cible. L'utilisation d'un promoteur tissu spécifique permet ensuite une expression dans un seul type de tissu.

Cette technique permet d'utiliser 30 à 100 fois moins d'ADN plasmidique qu'un lipide cationique classique (Shi et Pardridge 2000) tout en étant capable d'obtenir une très bonne efficacité de transfert tissu spécifique (Zhu, Zhang *et al.* 2002). La production difficile de ces PILs reste leur principal défaut.

L'obtention de complexes ADN/vecteur colloïdalement stables et dont les caractéristiques physico-chimiques sont constantes est difficile. Souvent légèrement immunogène la réponse immunitaire qu'ils déclenchent a pour conséquence de les éliminer. L'inconvénient majeur de l'utilisation de ce type de vecteur reste généralement que leur efficacité de transfection *in vivo* est encore bien inférieure à celle de vecteurs viraux.

3. Les méthodes physiques

Les méthodes physiques de transfert de gènes sont actuellement en plein essor, et de nouvelles méthodes voient le jour régulièrement telles que la micro-injection, le canon à ADN, le laser, les ultrasons, l'injection hydrodynamique, l'électroporation ou électrotransfert (pour revue générale voir (Wells 2004; Mehier-Humbert et Guy 2005) et voir aussi le tableau 3).

Technique	Principe	Matériel	Avantages	Inconvénients
Microinjection	injection manuelle directement dans le noyau	micropipette, micromanipulateur, microscope	Très efficace (ciblage direct du noyau)	Fastidieux <i>ex vivo</i> et pas applicable <i>in vivo</i>
Canon à ADN	bombardement de particules à grande vitesse	« gene gun », particules	Immunisation génétique, faibles quantités d'ADN	Faible pénétration dans les tissus profonds
Jet injection	Injection sous forme de jet très fin à très haute pression	« jet injector »	Immunisation génétique, facilité d'utilisation	Faible pénétration dans les tissus profonds
Sonoporation	perméabilisation de la membrane cellulaire par des ultrasons	Sonde à ultrasons, microbulles	Nouvelle formulation de microbulles	Toxicité mal établie
Irradiation laser	perméabilisation induite par un faisceau laser	Source laser	Efficace, haute précision du faisceau	Coût élevé, toxicité potentielle
Injection hydrodynamique	injection directe d'un grand volume de liquide	Seringue, cathéter	ciblage efficace du foie et des muscles	Recours au clampage par chirurgie, quel que soit le tissu
Electrotransfert	champ électrique induisant une perméabilisation de la membrane et une force électrophorétique	électrodes, générateur d'impulsions	très efficace, facile d'utilisation (surtout pour la peau, le muscle et la tumeur)	toxicité potentielle, recours à la chirurgie pour le traitement de tissus internes

Tableau 3 : Principales techniques physiques ou mécaniques de transfert de gènes.

a) Micro-injection

La micro-injection consiste à injecter directement le matériel génétique dans le cytoplasme ou le noyau d'une cellule en utilisant une micropipette de verre, un système de

précision pour contrôler le mouvement de la micropipette, un microinjecteur et un microscope. Le matériel génétique est introduit dans la cellule par la pression hydrostatique. Cette technique a été utilisée pour la première fois en 1980 (Capecchi 1980) sur des cellules en culture. Par la suite, Gordon *et al.* ont utilisé cette technique pour produire des souris transgéniques (Gordon, Scangos *et al.* 1980; Gordon et Ruddle 1983). Cette technique est actuellement la méthode classique pour la production d'animaux transgéniques.

Cette technique est conceptuellement simple mais difficile à appliquer, en effet on ne peut traiter qu'une seule cellule à la fois. Cette technique n'est pas du tout applicable dans le cas de la thérapie génique *in vivo*.

b) Injection locale : « jet injection »

Depuis 1990, diverses expériences d'injection directe *in situ* d'ADN ont démontré une expression du gène dans plusieurs tissus (muscle cardiaque, muscle squelettique, cerveau). Cependant, l'injection intramusculaire d'ADN n'est faiblement efficace, car moins de 1% de la dose injectée est internalisée par les cellules. De plus, cette expression reste très localisée au niveau du site d'injection.

Il existe un moyen physique d'améliorer la transfection obtenue par la simple injection locale : c'est la « jet injection ». La « jet injection » est un moyen d'administrer localement des substances sans utiliser d'aiguilles, réduisant la douleur et l'appréhension due aux aiguilles, ainsi que certains des risques de blessure par aiguille. A l'heure actuelle la « jet injection » est essentiellement utilisée pour délivrer des hormones, des anesthésiants locaux, pour l'administration d'insuline aux diabétiques ou pour l'immunisation par des vaccins (pour une revue : voir (Mitragotri 2006)). Cependant cette technologie de la « jet injection » peut aussi être utilisée dans le cadre du transfert de gènes. En effet lors d'une « jet injection » le liquide à injecter est envoyé sous forme d'un jet à haute pression. La pression lors d'une « jet injection » étant très élevée, elle semble favoriser le passage des acides nucléiques dans les cellules. Des expériences ont montré qu'il était ainsi possible de transfecter un carcinome par « jet injection » (Walther, Stein *et al.* 2001; Walther, Stein *et al.* 2005), ou d'utiliser la « jet injection » comme technique d'immunisation génétique (Imoto et Konishi 2005; Konishi, Kosugi *et al.* 2006). Cependant cette technique n'en est encore qu'à ses débuts et tout comme le « gene gun » elle ne permet de transfecter que des zones superficielles.

c) Injection intraveineuse : la méthode hydrodynamique

Depuis 1999, l'injection hydrodynamique rapide (5-8 secondes), d'un grand volume (1,6 mL) d'une solution d'ADN nu dans la veine caudale d'une souris, a permis d'obtenir une expression du transgène non négligeable dans divers organes.

Cette méthode efficace et récente repose sur trois critères :

- 1- une injection rapide (de l'ordre d'une dizaine de secondes pour des petits rongeurs)
- 2- un volume élevé (équivalent au volume sanguin du rongeur) de solution plasmidique
- 3- une injection dans la veine de la queue chez la souris ou le rat.

En effet, lorsqu'un grand volume d'une solution d'ADN (8 à 12% de la masse corporelle de l'animal) est injecté rapidement (environ 10s), un transfert de gènes efficace est observé chez la souris (Liu, Song *et al.* 1999). De même chez des rats de 250g environ, un volume de 25mL contenant 800µg d'ADN est injecté en 15sec dans la veine de la queue (Maruyama, Higuchi *et al.* 2002). L'ARNm du transgène est retrouvé principalement dans le foie (Herweijer et Wolff 2003) et de façon moindre dans les poumons, les reins, la rate et le cœur.

Un mécanisme hypothétique permettant d'expliquer cette transfection a été formulé. Dans ces conditions, dans un premier temps, le volume de liquide à prendre en charge par le cœur est trop important et s'accumule dans la veine cave (Zhang, Gao *et al.* 2004). Les organes directement liés à la veine cave vont donc recevoir en majorité la solution d'ADN. Le foie étant un organe capable de se distendre, une grande partie de la solution d'ADN va être captée par le foie dans une direction opposée à celle de la circulation systémique. Ainsi l'ADN n'est pas mélangé au flux sanguin, et il est protégé de l'action des nucléases (Liu, Song *et al.* 1999; Niidome et Huang 2002). La distension du foie a été visualisée par Wolff et Budker (Wolff et Budker 2005) (voir figure 36) et elle s'accompagne d'une augmentation transitoire d'enzymes spécifiques du foie dans le sang, notamment l'alanine aminotransférase, mais aucun profil histologique de lésions hépatiques n'a pu être observé (Liu, Song *et al.* 1999; Herweijer, Zhang *et al.* 2001; Maruyama, Higuchi *et al.* 2002). Ces petites lésions semblent liées à l'injection du gros volume et non pas à l'expression du transgène. Par ailleurs, il a été démontré que l'efficacité de transfection était améliorée si la circulation sanguine était momentanément interrompue (moins de 3 min) au niveau hépatique (Liu et Huang 2001). Il semble que l'augmentation du temps de présence de l'ADN dans le tissu contribue à cette amélioration. De plus, l'augmentation de la pression hydrodynamique au niveau du foie favoriserait le passage de l'ADN au travers des fenestrations des capillaires sinusoides qui irriguent le foie (Zhang, Budker *et al.* 1999), ou perméabiliserait la membrane plasmique des hépatocytes (Zhang, Gao *et al.* 2004).

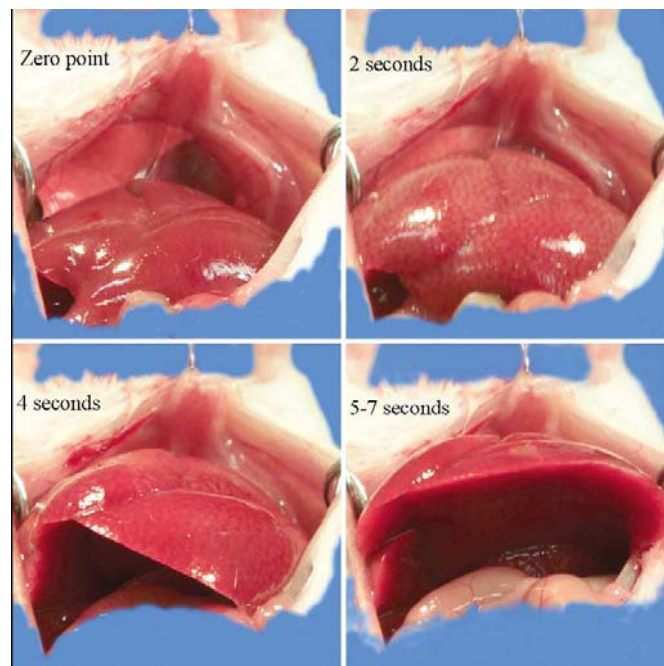


Figure 36 : Observation du foie à différents temps après une injection hydrodynamique dans la veine de la queue de souris. Le foie gonfle et pâlit indiquant le remplissage par la solution injectée. D'après (Wolff et Budker 2005).

De façon similaire, l'injection dans la veine de la queue d'une solution d'ADN permet la transfection de cellules musculaires du diaphragme lorsque la circulation au niveau de la veine cave est bloquée (Liu, Nishikawa *et al.* 2001).

Cette technique a été utilisée pour transfecter le gène codant pour l'interleukine-10 et a montré de bons résultats (Jiang, Wang *et al.* 2001). La combinaison de l'injection rapide d'ADN à l'application d'un champ électrique au niveau du foie permet également d'obtenir une très bonne efficacité de transfection (Liu et Huang 2001; Kobayashi, Dono *et al.* 2003). La méthode hydrodynamique peut sembler difficilement applicable à l'homme, cependant des études récentes ont montré la faisabilité de cette approche sur de plus gros animaux en

injection intra artérielle par l'intermédiaire de cathéters chez le singe et le chien (Wells 2004). Cette méthode a ainsi permis de cibler le rein, le diaphragme et les muscles. En effet chez le primate l'injection hydrodynamique réalisée par voie intra-artérielle cible le muscle, et permet alors une transfection relativement uniforme de tous les muscles de la patte perfusée (Zhang, Budker *et al.* 2001).

d) Le canon à ADN : le gene gun

Cette technique biolistique, utilisée depuis le début des années 1990 pour les cellules de mammifères et les tissus vivants (Yang, Burkholder *et al.* 1990; Williams, Johnston *et al.* 1991) fut utilisée pour la première fois en 1987, initialement pour incorporer un gène dans les cellules végétales (Klein, Wolf *et al.* 1992). Elle consiste à bombarder un tissu ou des cellules cibles avec des billes constituées d'un métal lourd généralement inerte dans les milieux biologiques (tels que l'or ou le tungstène), de diamètre 1 à 5 μm (inférieur à la cellule cible) et recouvertes d'ADN d'intérêt (Fynan, Webster *et al.* 1993). Ces particules sont accélérées soit par un gaz, soit par un système d'arme à feu (Gene gun). Ainsi la vaporisation de l'eau sous l'effet d'un courant électrique de haut voltage (plusieurs kV) (Yang, Burkholder *et al.* 1990) ou la décompression d'un gaz comme l'hélium (Wolff, Williams *et al.* 1991), fournit aux particules métalliques enrobées d'ADN l'accélération nécessaire pour la pénétration dans les cellules.

Le « gene gun » est applicable aussi bien *in vitro* que *in vivo* sur de nombreux organes (peau, foie, rein, muscle) sans endommager le tissu (Yang, Burkholder *et al.* 1990; Williams, Johnston *et al.* 1991; Zelenin, Kolesnikov *et al.* 1997). Cependant, hormis pour les tissus superficiels, cette méthode nécessite une intervention chirurgicale et n'aboutit qu'à des niveaux moyens d'expression du transgène (Williams, Johnston *et al.* 1991). Plus précisément, l'efficacité de transfection de cette méthode varie suivant l'organe ciblé, on observe par exemple 10 à 20% de cellules épidermiques transfectées et seulement 1 à 5% de cellules musculaires (Zelenin, Kolesnikov *et al.* 1997). Toutefois, l'expression du gène reste visible 14 jours après injection dans la peau ou dans le foie de souris.

Mais, l'importante limitation de cette méthode réside dans la faible pénétration de la particule dans les tissus, qui n'excède pas 4mm de profondeur (Zelenin, Kolesnikov *et al.* 1997), l'efficacité de transfection dans le muscle n'excédant pas les 10% de fibres transfectées. L'ADN n'étant propulsé qu'au travers des couches les plus superficielles du tissu, dans le cas de transfection *in vivo*, une exposition préalable des tissus à transfecter est nécessaire.

Cependant, récemment, Dileo *et al.* ont pu atteindre le tissu sous cutané en modifiant le dispositif classique, et en utilisant un système de projection des billes sous haute pression (Dileo, Miller *et al.* 2003).

Une des applications de cette technique serait la vaccination après injection d'ADN nu codant pour l'antigène désiré ou encore le traitement contre le cancer (Yang et Sun 1995). À l'heure actuelle, les applications majeures de cette technique restent l'utilisation sur cellules végétales, qui est à l'origine de la méthode, et la vaccination génétique dans la peau (Larregina, Watkins *et al.* 2001). En effet, l'épiderme contient des cellules de Langerhans, qui sont des cellules présentatrices de l'antigène, transfectées de manière simple et efficace par le gene gun (Tang, DeVit *et al.* 1992).

Un avantage de cette technique est que l'ADN ne subit pas les dégradations du milieu biologique, car il pénètre directement dans le cytosol ou dans le noyau, évitant ainsi sa destruction enzymatique dans le sang ou dans les compartiments intracellulaires comme les endosomes.

e) Ultrasons : la sonoporation

Cette technique consiste à appliquer des ultrasons pour perméabiliser les membranes des cellules et ainsi augmenter la pénétration de molécules.

Cette méthode présente l'avantage d'être non invasive. Elle utilise des ultrasons de faible ou forte intensité, et permet par exemple la transfection du muscle squelettique (Lu, Liang *et al.* 2003), de l'artère carotidienne (Miller et Song 2003), de la tumeur solide (Huber, Mann *et al.* 2003) ou du cœur (Bekeredjian, Chen *et al.* 2003) (Taniyama, Tachibana *et al.* 2002).

Le mécanisme de la sonoporation n'est pas totalement élucidé mais pourrait être expliqué par la cavitation acoustique. La propagation d'ultrasons dans un liquide crée des phases de compressions et de dépression d'un élément de liquide. Si l'amplitude de la phase dépressionnaire est suffisamment grande, des bulles vont se former au sein même de la phase liquide, croître pour finalement imploser : c'est la cavitation. Cette cavitation acoustique entraîne donc une perturbation mécanique et la libération d'énergie associée pourrait perméabiliser les membranes cellulaires au voisinage. L'ajout de microbulles lors du transfert d'ADN permet d'augmenter les sources de cavitation : la destruction de chaque microbulle créant une réaction en chaîne de cavitation. (Deng, Sieling *et al.* 2004).

L'irradiation d'un tissu avec des ultrasons (1 MHz, 1 à 50 W/cm², 3 msec à 16 min) après l'injection de plasmide ADN nu conduit à la perméabilisation par cavitation de la membrane plasmique de la cellule et donc favorise la pénétration intracellulaire de l'ADN dans des conditions *in vitro* ou *in vivo* (Newman, Lawrie *et al.* 2001; Danialou, Comtois *et al.* 2002; Miller, Pislariu *et al.* 2002). Dans les conditions *in vivo*, la solution ADN à transférer est injectée directement dans le tissu d'intérêt et l'application des ultrasons se fait au niveau de la peau (Danialou, Comtois *et al.* 2002) ou par un cathéter introduit dans un vaisseau (Amabile, Waugh *et al.* 2001). Le mélange préalable de la solution d'ADN à injecter avec des agents de contraste sous forme de microbulles (1 à 3 µm) permet d'améliorer l'efficacité du transfection (Danialou, Comtois *et al.* 2002; Taniyama, Tachibana *et al.* 2002). Ces microbulles sont généralement constituées de protéines, lipides ou polymères et remplis d'air ou d'un gaz inerte. On peut citer par exemple les microbulles de Optison™ qui sont constituées de perfluoropropane encapsulé dans une sphère d'albumine humaine. Aucune lésion tissulaire importante n'est observée.

Cette technique a déjà été utilisée pour transférer des muscles de souris avec le gène de la dystrophine (Danialou, Comtois *et al.* 2002) ou pour produire des facteurs de croissance (Schratzberger, Krainin *et al.* 2002; Taniyama, Tachibana *et al.* 2002). Enfin, les ultrasons favorisent aussi la pénétration des lipoplexes lors de transfection *in vitro* (Koch, Pohl *et al.* 2000). Il a été montré, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*, que l'irradiation par les ultrasons de vecteurs synthétiques au contact des cellules augmentait l'expression du transgène (Hosseinkhani, Aoyama *et al.* 2002; Hosseinkhani, Aoyama *et al.* 2003).

Une combinaison d'ultrasons et d'impulsions électriques a également été utilisée, et nommée électro-sonoporation. Dans cette technique, l'ADN est injecté en i.m., puis le muscle est soumis aux ultrasons pendant cinq minutes, avec des impulsions électriques délivrées au milieu de l'application des ultrasons (Yamashita, Shimada *et al.* 2002). Cette méthode a été utilisée pour vectoriser un gène codant l'IL-12 dans un modèle tumoral chez la souris.

f) Laser

Cette technique repose sur l'utilisation d'une source laser (par exemple un laser titane-saphir, un laser à argon ou un laser neodymium yttrium-aluminium garnet (YAG)). Le faisceau laser est focalisé au niveau des cellules cible grâce à une lentille. Le mécanisme pourrait s'expliquer par une perméabilisation transitoire de la membrane au niveau du faisceau laser, probablement par un effet thermique local. Cette perturbation est suffisante pour permettre

l'amélioration de la pénétration de l'ADN dans la cellule par rapport à l'injection d'ADN seule.

Les premiers résultats de transfert de gènes obtenus par irradiation laser datent du début des années 80 (Tao, Wilkinson *et al.* 1987).

L'application d'un laser femtoseconde (impulsions très brèves de l'ordre de 10^{-15} secondes) à infrarouge (intensité 20mW, zone illuminée $95 \times 95 \mu\text{m}^2$, temps d'exposition 5 sec et focalisé sur une zone à 2 mm de profondeur) au travers de la peau recouvrant le muscle tibial antérieur de souris conduit à l'expression du transgène préalablement injecté dans le tissu musculaire (Zeira, Manevitch *et al.* 2003). L'efficacité de transfection (dans la zone limitée à 2 mm de profondeur) est comparable à celle obtenue avec la technique d'électrotransfert de gènes. Cette technique permet aussi une expression à long terme du transgène et ne s'accompagne pas de lésions musculaires. L'utilisation de cette méthode permettait ainsi une expression élevée d'érythropoïétine durant 8 semaines, permettant d'atteindre un taux d'hématocrite supérieur à 22%. Des résultats encourageants ont également été obtenus pour la transfection de la peau (Ogura, Sato *et al.* 2004). C'est une méthode relativement récente qui nécessite encore d'être approfondie.

L'inconvénient principal de cette technique est son coût élevé et l'infrastructure lourde qu'elle nécessite (taille physique de l'installation du laser).

g) Champ magnétique

Cette méthode utilise l'énergie cinétique des particules magnétiques placées dans un champ magnétique, pour introduire dans les cellules des acides nucléiques ou d'autres molécules, associés à ces particules magnétiques. Cette technique a aussi été utilisée dans des expériences *in vivo* pour permettre l'acheminement des vecteurs de gènes associés aux particules magnétiques vers les cellules cibles (Plank, Anton *et al.* 2003). Ce procédé récent porte le nom de magnétofection, et permet d'augmenter l'expression du transgène dans le tube gastro-intestinal et la vasculature de l'oreille (Scherer, Anton *et al.* 2002). Cependant, cette méthode est encore très récente, et demande des études complémentaires.

h) Electrotransfert

Cette technique consiste à appliquer un champ électrique au niveau du tissu cible après l'injection d'ADN. L'électroporation utilise l'effet d'impulsions électriques pour déstabiliser la membrane cellulaire pendant de courtes périodes, permettant ainsi la pénétration du plasmide ou d'autres molécules. Cette technique a été préalablement développée pour améliorer l'entrée dans la cellule de molécules ou principes actifs peu perméables. Cette méthode appliquée à l'ADN est utilisée depuis 1982 pour de multiples applications *in vivo*. Elle est applicable à de nombreux tissus et notamment le tissu musculaire.

L'électrotransfert étant l'objet même de cette thèse il constitue le thème du chapitre V.

C. L'approche ex vivo : les vecteurs cellulaires

L'approche *ex vivo* consiste à prélever les cellules cibles chez le patient et à effectuer ensuite en laboratoire le transfert de gènes (avec l'une des techniques décrites précédemment) sur les cellules prélevées, en dehors du patient. Les cellules porteuses du gène, obtenues après multiplication et sélection *in vitro*, sont ensuite réintroduites chez le patient. La cellule transplantée devra alors fusionner, puis coloniser le tissu cible (Blau et Springer 1995). Les cellules préférentiellement utilisées sont des cellules faciles à prélever et à mettre en culture :

cellules souches de la moelle osseuse, cellules tumorales, fibroblastes de la peau, cellules dendritiques. Les cellules souches constituent un outil de choix puisqu'elles présentent la particularité d'être capables d'acquérir les caractéristiques du tissu dans lequel elles sont transplantées. La principale limite de cette technique est l'obligation d'utiliser des cellules autologues afin d'éviter toute réponse immune. L'utilisation de cellules encapsulées peut permettre de surmonter cette difficulté lorsque la protéine thérapeutique est sécrétée (Bachoud-Levi, Deglon *et al.* 2000). Cette approche *ex vivo* a permis récemment un premier succès thérapeutique en France pour corriger une immunodéficience sévère liée au chromosome X par l'équipe d'Alain Fischer (Cavazzana-Calvo, Hacein-Bey *et al.* 2000), ainsi que pour une déficience en adénosine déaminase (Aiuti, Slavin *et al.* 2002).

1. Vecteurs cellulaires utilisés pour la production de protéines

Dans ce cas, les cellules jouent le rôle d'usine à protéines. Les recherches actuelles ont démontré l'intérêt des lignées cellulaires stables comme les kératinocytes et les fibroblastes (cellules CHO ou COS par exemple), dont les avantages majeurs sont la facilité de mise en culture *in vitro* et la capacité à synthétiser des protéines complexes de haut poids moléculaire. *In vivo* chez le petit animal, les fibroblastes transfectés ont trouvé de nombreuses applications : greffe de fibroblastes primaires de peau infectés par un rétrovirus codant l'hormone de croissance humaine (Selden, Skoskiewicz *et al.* 1987) ou l'érythropoïétine (Naffakh, Henri *et al.* 1995), greffe de fibroblastes ou de kératinocytes transfectés par un plasmide codant respectivement l'IL-13 (Bessis, Boissier *et al.* 1996) ou l'IL-1RII (Bessis, Guery *et al.* 2000). Chez l'homme, des essais cliniques de phase 1 ont été réalisés avec des fibroblastes cutanés autologues transfectés avec un plasmide codant le facteur VIII dans le traitement de l'hémophilie A, et ont montré que la greffe était bien tolérée par les patients et permettait d'augmenter de façon significative les taux circulants de facteur VIII (Roth, Tawa *et al.* 2001). D'autres essais sont en cours avec des fibroblastes autologues infectés par un rétrovirus codant le Nerve Growth Factor (NGF) et injectés par voie intracrânienne, afin de lutter contre la maladie d'Alzheimer.

2. Vecteurs cellulaires utilisant les spécificités d'un type de cellules données

Les cellules utilisées sont alors des cellules souches, des cellules précurseurs (issues de la division des cellules souches et ayant acquis un certain degré de spécialisation), ou des cellules différenciées. Cette stratégie peut être utilisée dans un but de régénération tissulaire et de lutte contre les maladies neurodégénératives. Ainsi, une stratégie d'implantation de précurseurs neuronaux est utilisée chez l'homme pour le traitement de la maladie de Huntington, par administration du facteur de croissance NGF (Kordower, Isacson *et al.* 1999). D'autres types cellulaires peuvent être utilisés, comme les monocytes, macrophages, lymphocytes ou cellules dendritiques afin d'obtenir un effet immunomodulateur. Ainsi, un premier essai d'injection de macrophages transfectés par le gène lacZ chez des souris mdx a montré la production de la protéine au niveau musculaire et validé le système (Parrish, Cifuentes-Diaz *et al.* 1996) ; de même, des clones de lymphocytes T CD4⁺ dirigés contre des auto-antigènes des cellules des îlots β ont été utilisés chez la souris NOD pour lutter contre le diabète auto-immun (Akhtar, Gold *et al.* 1995). Dans l'Arthrite Exérimentale induite par le Collagène (AEC), le transfert de splénocytes ou de LT purifiés pathogènes, transfectés par le TGF- β , chez des souris SCID ou DBA/1 a diminué l'inflammation et prévenu son extension

aux articulations non encore atteintes lors du traitement (Chernajovsky, Adams *et al.* 1997), Des cellules dendritiques infectées par un adénovirus codant l'IL-4 ont aussi prouvé leur efficacité dans l'AEC (Kim, Kim *et al.* 2001).

La faible efficacité de transfection observée par injection seule des acides nucléiques est expliquée par les différentes barrières successivement rencontrées par les acides nucléiques avant d'atteindre leur cible. Le développement de divers vecteurs de transport et techniques de transfection permet d'améliorer l'efficacité du transfert. Le choix de la construction à transférer et du type de vecteur employé reste dépendant du contexte expérimental et des applications envisagées pour cette technique.

V. L'électrotransfert

A. Historique

Les premières études *in vitro* sur les effets de champs électriques pulsés sur des cellules vivantes dans les années 1960-70 ont décrit qu'il se produisait une cassure réversible et/ou irréversible des membranes (dielectric breakdown) (Coster 1965; Sale et Hamilton 1968; Neumann et Rosenheck 1972; Crowley 1973; Zimmermann, Pilwat *et al.* 1974). Le phénomène physique a ensuite été appelé électroporation ou électroperméabilisation, car des macromolécules qui normalement ne diffusaient pas au travers de la membrane plasmique étaient alors capables de diffuser. Dans les conditions optimales, les cellules sont normalement électroporées de façon transitoire (Mir, Banoun *et al.* 1988; Jaroszeski, Gilbert *et al.* 2000).

Le premier essai d'électrotransfert de gènes *in vitro* sur des cellules eucaryotes de mammifères en suspension a été réalisé en 1982 (Neumann, Schaefer-Ridder *et al.* 1982; Wong et Neumann 1982). Des cellules L de souris (mouse lyoma cells) déficientes pour la thymidine kinase (tk) ont été transformées en phénotypes tk positif en exposant ces cellules à un courant continu de haut voltage (8kV/cm) en présence du plasmide contenant le gène tk. Ces chocs électriques provoqueraient la déstabilisation et la perméabilisation de la membrane de cellules de souris en suspension, favorisant ainsi l'entrée d'ADN exogène dans la cellule. Deux ans plus tard, la confirmation de ce résultat (Potter, Weir *et al.* 1984) ouvre la voie au développement de l'électroporation, c'est-à-dire l'utilisation d'un champ électrique afin d'induire la perméabilisation de cellules *in vitro*, et de permettre le transfert d'acides nucléiques dans les cellules. De nombreuses publications ont ensuite démontré que cette technique était efficace sur différents types cellulaires procaryotes comme les bactéries (Calvin et Hanawalt 1988) ou eucaryotes, comme les levures (Ganeva, Galutzov *et al.* 1995), et des cellules appartenant à des lignées immortalisées (Toneguzzo, Hayday *et al.* 1986; Andreason et Evans 1988; Andreason et Evans 1989; Rols, Coulet *et al.* 1992; Sandri, Bortoloso *et al.* 2003) ou issues de cultures primaires comme les myoblastes (Espinosa, Liu *et al.* 2001). Cette méthode est aujourd'hui utilisée en routine sur des cellules aussi bien procaryotes, qu'eucaryotes, végétales ou animales. L'optimisation des paramètres électriques permet de rendre cette perméabilisation transitoire et d'obtenir ainsi un bon taux de survie cellulaire (Bonnafous, Vernhes *et al.* 1999).

Les premières utilisations *in vivo* de la méthode d'électroperméabilisation ont été développées en 1989 et 1990 (Grasso, Heller *et al.* 1989; Heller et Grasso 1990) afin d'obtenir la fusion entre des cellules humaines HeLa et des cellules de la cornée. Cette électrofusion *in*

vivo, résulte de la perméabilisation de deux cellules adjacentes. L'électroperméabilisation peut aussi être utilisée afin d'administrer des médicaments aux cellules. Ainsi, dès 1988, il avait été mis en évidence *in vitro* que la toxicité de la bléomycine était 100 000 fois plus importante sur des cellules électroperméabilisées que sur des cellules non exposées aux impulsions électriques (Orlowski, Belehradek *et al.* 1988). La bléomycine est un agent anticancéreux qui provoque des cassures simple et double brin de l'ADN entraînant une toxicité cellulaire. L'efficacité de la bléomycine dépend de sa concentration intracellulaire mais cette drogue pénètre mal dans les cellules. Il a donc été observé une meilleure pénétration de la bléomycine après application d'impulsions électriques aux tumeurs, conduisant à une plus forte toxicité, prouvant ainsi que les impulsions électriques entraînaient aussi une augmentation de la perméabilité membranaire exploitable *in vivo*. Depuis 1991 (Mir, Belehradek *et al.* 1991), cette propriété a été développée *in vivo* avec succès jusqu'à l'application clinique pour faciliter l'entrée de bléomycine dans les tumeurs, c'est l'électrochimiothérapie (Belehradek, Orlowski *et al.* 1994; Mir, Bureau *et al.* 1999). De nombreux essais cliniques sont en cours (pour revue, voir (Gothelf, Mir *et al.* 2003)), utilisant la bléomycine ou le cisplatine (voir figure 1) principalement pour le traitement des tumeurs cutanées ou sous-cutanées chez l'homme (Mir, Glass *et al.* 1998; Mir, Bureau *et al.* 1999; Rols, Bachaud *et al.* 2000) ou en application vétérinaire chez le cheval (Rols, Tamzali *et al.* 2002), et récemment pour le cancer du sein, à l'aide de cisplatine (Rebersek, Cufer *et al.* 2004).

Les premiers travaux d'électrotransfert d'ADN *in vivo* ont été réalisés dans la peau en 1991 (Titomirov, Sukharev *et al.* 1991), par utilisation d'impulsions électriques exponentielles. En 1996 des trains d'impulsions de courtes durées (100 μ s) sont utilisés pour l'électrotransfert de gènes dans le foie (Heller, Jaroszeski *et al.* 1996). En 1998, quatre équipes indépendantes ont montré l'efficacité de l'électrotransfert à l'aide d'impulsions de longue durée (5-50 ms) : Mir *et al.* (Mir, Bureau *et al.* 1998) et Aihara *et al.* (Aihara et Miyazaki 1998) dans le muscle squelettique, Rols *et al.* (Rols, Delteil *et al.* 1998) dans les tumeurs, et Suzuki *et al.* (Suzuki, Shin *et al.* 1998) dans le foie.

Le développement de l'électrotransfert de gènes *in vivo* se poursuit depuis la fin des années 1990 avec la description de l'électrotransfert de gènes dans de nombreux tissus comme le foie (Heller, Jaroszeski *et al.* 1996; Suzuki, Shin *et al.* 1998), les testicules (Muramatsu, Shibata *et al.* 1997), la vessie (Harimoto, Sugimura *et al.* 1998), le muscle strié squelettique (Aihara et Miyazaki 1998; Kreiss, Bettan *et al.* 1999; Mathiesen 1999; Mir, Bureau *et al.* 1999), le cerveau (Nishi, Yoshizato *et al.* 1996; Saito et Nakatsuji 2001), le cœur (Harrison, Byrne *et al.* 1998), les vaisseaux sanguins (Martin, Young *et al.* 2000; Matsumoto, Komori *et al.* 2001) l'épithélium d'estomac (Fukuda, Sakamoto *et al.* 2000), le rein (Nakamura, Isaka *et al.* 2001), la moelle épinière (Lin, Tai *et al.* 2002), le tissu synovial (Ohashi, Kubo *et al.* 2002), la cornée (Blair-Parks, Weston *et al.* 2002; Oshima, Sakamoto *et al.* 2002), la rétine (Dezawa, Takano *et al.* 2002), le tendon (Jayankura, Boggione *et al.* 2003), la rate (Tupin, Poirier *et al.* 2003), le poumon (Dean, Machado-Aranda *et al.* 2003), le tissu adipeux (Granneman, Li *et al.* 2004),... (pour une revue : voir revue 1 en annexe (Andre et Mir 2004)).

Dans tous les cas cités ci-dessus, les modèles animaux (rat, souris, lapin, singe), la nature des plasmides utilisés (plasmide rapporteur ou plasmide d'intérêt biologique ou thérapeutique), les électrodes (plaques ou aiguilles), les procédures de stimulation électrique (nombre, durée, voltage/intensité et fréquence des impulsions électriques) et la durée du traitement étaient différents (pour une revue : voir revue 2 en annexe (Mir, Moller *et al.* 2005)), soulignant la nécessité d'optimiser les conditions expérimentales au type cellulaire étudié. En comparaison avec l'injection de plasmides ADN nu, la technique d'électrotransfert de gènes dans le muscle strié squelettique permet une augmentation de l'efficacité de transfection d'un facteur 10 à 1000 (Mir, Bureau *et al.* 1999; Cappelletti, Zampaglione *et al.* 2003) et réduit la variabilité interindividuelle de l'efficacité de transfection (Mir, Bureau *et al.* 1999; Hartikka, Sukhu *et al.* 2001).

B. Aspects physico-chimiques généraux consécutifs à l'application d'un champ électrique à des cellules

1. Notion de circuit électrique équivalent

La bicouche lipidique de la membrane plasmique est faiblement conductrice et sépare deux solutions ayant une très forte conductivité ionique, le cytoplasme d'une part et le milieu extracellulaire d'autre part. La membrane se comporte donc électriquement comme un diélectrique ou isolant et l'ensemble : milieu externe, membrane isolante, cytoplasme, se comporte comme un condensateur entouré de résistances (voir figure 37).

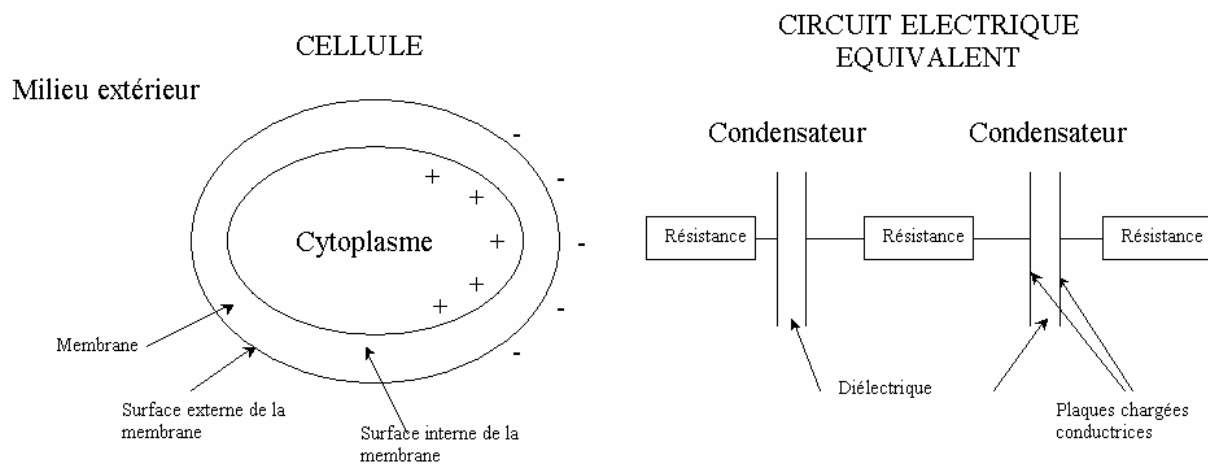


Figure 37 : Analogie entre une cellule et un circuit électrique

2. Effets physico-chimiques de l'application d'un champ électrique

L'application d'un champ électrique à des cellules *in vivo* ou *in vitro* entraîne différentes conséquences d'un point de vue physico-chimique (Zimmermann et Vienken 1982; Tsong 1990; Tsong 1991). On observe ainsi des effets à caractère scalaire, homogènes dans l'espace, et aussi des effets à caractère vectoriel, dépendants de la position par rapport aux lignes de champ.

a) Effets scalaires.

(1) Effet Joule.

D'un point de vue électrique lorsqu'une résistance (R) est traversée par un courant d'ampérage I pendant une période de temps Δt il y a production d'énergie (ΔQ) sous forme de chaleur, donnée par la loi de Joule :

$$\Delta Q = RI^2 \Delta t \quad (\text{Equation 1})$$

Comme on l'a vu précédemment le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire peuvent être assimilés à des résistances, il y a donc production de chaleur dans le milieu extracellulaire

et dans le milieu intracellulaire. Dans le cadre d'une solution homogène sans cellule, toute l'énergie électrique appliquée sur les électrodes est convertie en chaleur (Loste, Eynard *et al.* 1998). L'augmentation de température induite dépend de l'intensité du champ électrique appliqué, de la durée de l'impulsion et de la conductivité de l'échantillon mais est indépendante du volume de l'échantillon.

(2) Effets électrochimiques au niveau des électrodes

Au niveau des électrodes le courant électrique provoque des réactions d'oxydo-réductions. Il peut alors y avoir production d'espèces chimiques très réactives telles que des radicaux libres ou la libération d'ions métalliques (Friedrich, Stachowicz *et al.* 1998). Cet effet est localisé au niveau des électrodes et dépend de la nature chimique de celles-ci (acier, acier inoxydable, aluminium,...), de la composition du milieu et des paramètres électriques. Pour de longues durées d'impulsions ($> 100\mu s$), il se produit aussi un changement de pH localisé au niveau des électrodes (Friedrich, Stachowicz *et al.* 1998). L'anode (électrode positive) devient alors acide et la cathode (électrode négative) devient basique. Ces composés générés au niveau des électrodes peuvent avoir des conséquences néfastes sur la viabilité cellulaire et entraîner des modifications des conditions électriques pendant l'impulsion par variation des propriétés physiques du milieu (Loste, Eynard *et al.* 1998).

b) Effets vectoriels

(1) Effets à l'échelle de la cellule

(a) Orientation cellulaire

Les membranes biologiques sont chargées et possèdent des dipôles permanents. Lorsque l'on applique un champ électrique externe, les cellules vont s'orienter le long des lignes de champ de façon à ce que l'énergie globale du système devienne minimale (Zimmermann et Vienken 1982). Dans le cas de cellules sphériques, comme des cellules en suspension, ce phénomène se traduit par une simple rotation de la cellule autour de son centre. Dans le cas de cellules non sphériques, comme des bactéries en bâtonnets (ex : *Escherichia coli*), les cellules s'orientent en mettant leur grand axe parallèle aux lignes de champ (Eynard, Sixou *et al.* 1992).

(b) Déformation des cellules

Des modifications de la forme des cellules, en particulier des élongations, ont été observées chez des protozoaires, des cellules animales, des protoplastes végétaux et dans le cas de vésicules lipidiques (Kinosita, Hibino *et al.* 1992).

(c) Électrophorèse globale des cellules

Les cellules possèdent une charge de surface nette négative. En présence d'un champ électrique externe, les cellules vont migrer, sous l'effet de forces électrophorétiques, vers

l'électrode positive (anode). Selon les types cellulaires, les charges de surface, et donc par conséquent la réponse à l'application d'un champ électrique, sont différentes.

Un déplacement impliquant la locomotion préférentielle des cellules vers la cathode sous l'effet d'un champ électrique de l'ordre de 1mV/mm (appelé galvanotactisme), a également été observé chez certaines cellules connues pour leurs propriétés de migration (Orida et Feldman 1982).

(d) Diélectrophorèse cellulaire

Ce phénomène se produit dans le cas de l'application de champs électriques non homogènes. Dans un champ non uniforme, les dipôles induits ne sont pas identiques sur les deux faces de la particule entraînant la migration de la cellule vers les zones de fort champ électrique (quel que soit son signe et donc même dans le cas d'un champ électrique alternatif). Lorsque deux cellules s'approchent durant la migration électrophorétique, les forces d'attraction entre les dipôles deviennent supérieures aux forces de répulsion électrostatique. Les cellules s'organisent alors en chaîne vers l'électrode du plus fort potentiel. Ce comportement a été observé pour de nombreux systèmes cellulaires : cellules animales (Pilwat, Richter *et al.* 1981), protoplastes végétaux (Zimmermann et Scheurich 1981), fantôme d'érythrocytes (Sowers 1988). Il permet un contact cellulaire efficace dans le cadre de la fusion cellulaire.

(2) Effets à l'échelle moléculaire

(a) Electrophorèse et orientation des composants membranaires

La membrane plasmique est constituée de nombreuses molécules chargées, également sensibles au champ électrique. Lors de l'application du champ électrique, les différentes charges positives ou négatives présentes dans la membrane vont être redistribuées, créant ainsi de nouveaux dipôles. Ces dipôles induits et les dipôles préexistants vont s'orienter le long des lignes de champ en fonction de leurs degrés de liberté. La migration électrophorétique au sein de la membrane de molécules polarisées (telles que des récepteurs de la concanaviline A) a été mise en évidence par leur accumulation au niveau du pôle des cellules faisant face à l'électrode négative (Poo et Robinson 1977).

(b) Potentiel membranaire induit par le champ électrique

Au repos, la distribution des différentes charges positives ou négatives présentes dans la membrane, ainsi que la distribution des ions de part et d'autre de la membrane entraîne une différence de potentiel entre la membrane externe et la membrane interne d'une cellule. Ce potentiel de repos d'une cellule ($\Delta\Psi_0$) est de l'ordre de -60mV (varie selon les types cellulaires) en prenant le potentiel de la surface externe égal à zéro. Lorsqu'un champ électrique externe est appliqué à une cellule, le mouvement ionique résultant induit une accumulation de charges électriques sur la membrane cellulaire et module ainsi le potentiel transmembranaire de la cellule.

Si l'on considère la cellule comme un volume sphérique creux, que l'épaisseur de la membrane est négligeable par rapport au rayon cellulaire et que l'on considère la membrane

comme un diélectrique, alors la différence de potentiel transmembranaire induite ($\Delta\Psi_i$) par un champ électrique (E) sur une cellule est décrite par l'équation de Schwann :

$$\Delta\Psi_i = F.g(\lambda).E.\cos\theta.(1-\exp(-t/\tau)) \quad (\text{Equation 2}) \quad (\text{Foster et Schwan 1989})$$

Où F est un facteur dépendant de la forme de la cellule (égal à 1,5 fois le rayon de la cellule pour des cellules sphériques), $g(\lambda)$ un paramètre dépendant de la permittivité et conductivité λ de la membrane et des milieux internes et externes, E le champ électrique appliqué, θ l'angle entre la direction du champ électrique et la normale à la tangente au point M donné de la membrane, t la durée d'application du champ électrique et τ le temps de charge de la capacité membranaire (voir figure 38).

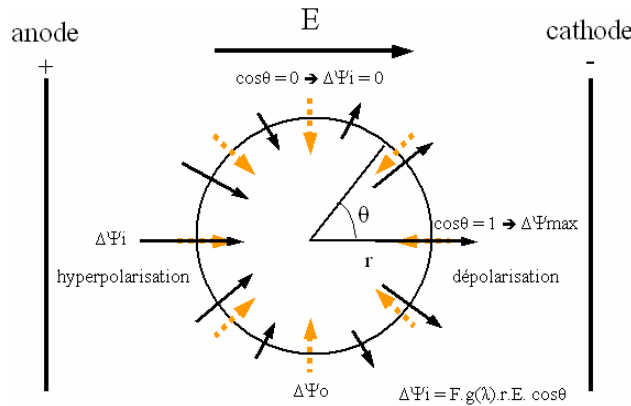


Figure 38 : Conséquences de l'exposition d'une cellule à des impulsions électriques. Abréviations : r : rayon de la cellule, E : intensité du champ électrique (V/cm), θ : angle entre la direction du champ électrique et la normale à la tangente de la membrane de la cellule au point considéré, F : facteur de forme de la cellule, $g(\lambda)$: paramètre dépendant de la conductivité de la membrane, flèches noires : potentiel induit par le champ électrique, flèches oranges : potentiel membranaire. Réalisé d'après (Rols, Golzio et al. 2000).

Si on considère que la membrane est un diélectrique pur et que les milieux internes et externes sont également considérés comme des conducteurs purs, alors le terme $g(\lambda)$ devient égal à 1. Dans les conditions utilisées pour l'électroperméabilisation des cellules, la durée des impulsions est grande (de plusieurs centaines de microsecondes à quelques millisecondes) devant le temps de charges de la cellule qui est de l'ordre de quelques microsecondes. Pour une cellule sphérique l'équation peut alors être simplifiée :

$$\Delta\Psi_i = 1,5.r.E.\cos\theta \quad (\text{Equation 3})$$

Donc $\Delta\Psi_i$ n'est pas uniforme à la surface de la cellule : le potentiel transmembranaire induit est maximum au point de la cellule face aux électrodes ($\theta = 0$ et π). Ce phénomène a été observé expérimentalement par vidéomicroscopie (voir figure 47).

On voit aussi que la différence de potentiel induite est directement proportionnelle à la taille de la cellule et à l'intensité du champ électrique appliqué.

C. Electroperméabilisation

1. Notion de seuil de perméabilisation membranaire

Lors de l'application d'un champ électrique la différence de potentiels induite se surajoute au potentiel de repos natif de la membrane cellulaire (entre -20 et -150mV selon le

type cellulaire). La membrane est mise hors équilibre et devient transitoirement perméable lorsque la somme $\Delta\Psi_0$ (cellule) + $\Delta\Psi_i$ (induite) atteint une valeur seuil $\Delta\Psi_s$, voisine de 200mV à 250 mV dans le cas de cellules animales, végétales ou de bactéries (Neumann et Rosenheck 1972; Rols et Teissie 1990; Orlowski et Mir 1993; Teissie et Rols 1993; Weaver 1993; Wolf, Rols *et al.* 1994; Gehl 2003). La caractéristique majeure de l'électroperméabilisation est l'existence de cette valeur seuil de différence de potentiel transmembranaire $\Delta\Psi_s$.

La valeur $\Delta\Psi_s$ étant globalement la même pour la plupart des membranes biologiques (200-250mV), cela signifie que d'après l'équation 3 la valeur seuil du champ électrique (E_s) nécessaire pour obtenir une perméabilisation de la membrane est inversement proportionnelle aux paramètres de forme et de taille de la cellule considérée. D'après l'équation 3, il apparaît aussi que plus le diamètre de la cellule est petit, plus le champ extérieur appliqué devra être élevé, les conditions électriques doivent donc être adaptées aux cellules ciblées.

Ceci a été vérifié expérimentalement *in vitro* sur des types cellulaires de différent diamètre. Ainsi pour des cellules eucaryotes en culture ($\varnothing$ 10 à 30 μ m) E_s est de l'ordre de 1000V/cm, et de l'ordre de 6000V/cm pour les bactéries (*E.Coli* $\varnothing$ 1 à 5 μ m). De même, les cellules ovariennes de hamster chinois (chines hamster ovary, CHO) qui ont un diamètre plus important que les érythrocytes humains possèdent une valeur seuil de champ électrique pour la perméabilisation deux fois plus faible (Rols et Teissie 1992). C'est encore la différence de diamètre qui explique que le seuil de perméabilisation est plus bas pour des cellules adhérentes que pour des cellules en suspension (Rols et Teissie 1990; Golzio, Rols *et al.* 2004). En effet, des cellules CHO sont perméabilisées pour des champs électriques appliqués de 300 V/cm lorsqu'elles sont adhérentes et de 700 V/cm lorsque les cellules sont en suspension (Rols et Teissie 1990). Enfin, les fibres musculaires étant de longues cellules d'un diamètre de 10 à 100 μ m, les conditions électriques utilisées *in vitro* sur des cellules plus petites et sphériques se sont révélées délétères (Mir, Bureau *et al.* 1999). Après de nombreuses expériences, il a été constaté que des impulsions répétées (8 à 10) à la fréquence de 1 ou 2 Hz, de longue durée (4-50 ms/impulsion) et peu intenses (100-500 V/cm) permettent d'atteindre de bons niveaux d'expression *in vivo* (Rols, Delteil *et al.* 1998; Mathiesen 1999; Mir, Bureau *et al.* 1999).

Par ailleurs, il apparaît donc peu probable que les organites intracellulaires pourraient être affectés par l'application du courant électrique perméabilisant la membrane. En effet, des expériences de transfection réalisées sur mitochondries isolées nécessitaient un champ électrique 10 à 100 fois supérieur à ceux généralement utilisés *in vitro* et *in vivo* (Collombet, Wheeler *et al.* 1997).

Cette propriété a été mise à profit entre autres pour transfecter sélectivement des adipocytes matures de grande taille dans le tissu adipeux sous-cutané constitué de plusieurs types cellulaires de tailles inférieures (Granneman, Li *et al.* 2004).

2. Asymétrie de la perméabilisation membranaire

Lorsque la valeur du champ électrique seuil est dépassée, plus la différence entre la valeur seuil et la valeur appliquée est grande, plus la surface perméabilisée est étendue. En effet l'équation 3 montre que pour un champ électrique donné, la différence de potentiel transmembranaire induite varie en fonction du point considéré sur la membrane. Plus l'angle formé entre la direction du champ et la direction perpendiculaire à la tangente au point considéré augmente, plus le potentiel transmembranaire induit diminue. Au-delà d'un angle donné, $\Delta\Psi_i$ devient inférieure à la valeur seuil permettant la perméabilisation. La relation entre le champ électrique appliqué et la surface perméabilisée a été mise en évidence *in vitro* par marquage fluorescent des zones perméabilisées de la cellule à l'échelle de la milliseconde

(Gabriel et Teissie 1997). Ces travaux ont aussi montré que c'est d'abord la face de la cellule du côté anode qui est perméabilisée. Puis, pour des valeurs de champ électrique plus élevées, l'autre face se perméabilise à son tour, tout en ayant une surface perméabilisée toujours inférieure à la face du côté anode. En effet du côté de l'anode il y a hyperpolarisation (le potentiel natif de la membrane de la cellule s'ajoutant à celui induit par le champ électrique) alors que du côté de la cathode il y a dépolarisation (le potentiel induit s'oppose au potentiel natif de repos) (voir figures 38 et 47).

3. Notion de réversibilité de la perméabilisation ou « resealing »

L'électroperméabilisation est un processus réversible (Neumann et Rosenheck 1972). Des mesures de conductance membranaire ont montré que ce processus de réversibilité était déclenché dès l'arrêt de l'application du champ électrique dans le cas de bicouches lipidiques planes (Benz et Zimmermann 1981; Benz et Zimmermann 1983). Dans le cas de bicouches lipidiques, la durée de vie de l'état perméable est très bref (échelle de la microseconde).

Dans le cas de cellules animales l'état de perméabilisation se poursuit quelques minutes au-delà de la durée d'application du courant électrique puis les pores disparaissent et la membrane retrouve son intégrité : c'est le phénomène de « resealing » (Escande-Geraud, Rols *et al.* 1988; Rols, Delteil *et al.* 1998; Bier, Hammer *et al.* 1999; Gehl, Skovsgaard *et al.* 2002). Les surfactants, notamment le poloxamère 188, peuvent favoriser ce phénomène (Lee, River *et al.* 1992; Teissie et Rols 1994). La stabilisation de l'état perméable est également fortement dépendante de la température. De manière générale, une diminution de la température augmente la durée de vie de l'état perméable alors qu'une augmentation de la température la diminue (Kinosita et Tsong 1977; Lopez, Rols *et al.* 1988).

En revanche, l'application de champs électriques très supérieurs à la valeur seuil, peut conduire à une perméabilisation irréversible de la cellule (Gehl, Sorensen *et al.* 1999). Dans ce cas la mort cellulaire consécutive à l'application du courant électrique peut être rapide (dans les 15 min) ou décalée (dans les 24 - 48h.) (Gabriel et Teissie 1995). De façon similaire, l'augmentation de la durée et du nombre d'impulsions au-delà de valeurs optimales déterminées pour un type cellulaire donné, peut-être à l'origine d'une mort cellulaire (Gabriel et Teissie 1995; Davalos, Mir *et al.* 2005).

L'implication des protéines membranaires et du cytosquelette a été rapportée (Teissie et Yow Tsong 1981). En effet, au cours de l'électroperméabilisation cellulaire, il se produit une modification de l'organisation du cytosquelette. Des villis ont même été observées à la surface de la membrane des cellules CHO après l'application d'un champ électrique (Escande-Geraud, Rols *et al.* 1988). D'autre part, il a été observé que si la dépolymérisation des microtubules du cytosquelette était induite par la colchicine, le phénomène de « resealing » était accéléré (Rols et Teissie 1992; Teissie et Rols 1994). Il apparaît donc que le cytosquelette, et principalement les microtubules, jouent un rôle primordial dans la régulation du processus de stabilisation de la perméabilité membranaire.

4. Répercussions cellulaires de l'électroperméabilisation

Lorsque la membrane est électroperméabilisée, un gonflement colloïdal peut se produire et conduire à la rupture irréversible de la membrane plasmique lorsque le déséquilibre osmotique entre le cytoplasme et le milieu extérieur est trop important (Kinosita et Tsong 1977; Kinosita et Tsong 1977; Kinosita et Tsong 1977). Des changements ultra-structuraux et des déformations membranaires ont été observées au niveau la membrane

plasmique des cellules animales électroperméabilisées (Escande-Geraud, Rols *et al.* 1988; Gass et Chernomordik 1990).

L'application du champ électrique est un stress pour la cellule et des espèces oxygénées réactives (EOR) sont générés. Leur génération est dépendante des paramètres électriques et peut-être empêchée par certains inhibiteurs (Gabriel et Teissie 1994).

L'activité de certaines protéines et notamment les canaux ioniques sodium et potassium de la membrane de muscles striés squelettiques de grenouilles, peut-être affecté par l'application d'un champ électrique. Ceci résulte d'un changement électroconformationnel de ces canaux qui se produit pour des valeurs de champ supérieur à celles induisant la perméabilisation. Il est réversible et dépend des conditions électriques (Chen et Lee 1994).

5. Modèles mécanistiques de l'électroperméabilisation

Les mécanismes moléculaires du transfert d'ADN lors de l'électroperméabilisation sont encore mal élucidés et différents modèles ont été proposés.

a) Modèle expliquant la rupture irréversible de la membrane

Les premiers modèles tentant d'expliquer l'effet du champ électrique externe ont été établis sur la base de travaux sur des films noirs lipidiques (Crowley 1973). En présence d'un champ électrique, les charges libres s'accumulent de part et d'autre de la membrane lipidique sans pouvoir la traverser. Étant de signes opposés, elles s'attirent et donnent naissance à une force de compression électrique (force de Maxwell). Cette force provoque un étirement et un amincissement du film lipidique. L'amincissement du film lipidique dépend du carré de l'intensité de la tension appliquée, donc du champ électrique. Au-delà d'un seuil critique, la compression entraîne la rupture irréversible de la membrane.

Ce modèle permet d'expliquer la lyse cellulaire en conditions électriques extrêmes mais il ne permet pas d'expliquer le maintien et la réversibilité de l'état perméable.

b) Electroporation ou la formation de pores : la théorie initiale

(1) Modèles

Ce modèle a été initialement proposé par Abidor en 1979 (Abidor, Arakelyan *et al.* 1979), il a ensuite été repris et complété par différents auteurs (Chernomordik, Sukharev *et al.* 1983; Glaser, Leikin *et al.* 1988).

Ces modèles sont basés sur le fait que les membranes ne sont pas des assemblages parfaits de lipides et de protéines, mais comportent des défauts de structures instables dans la matrice lipidique qui permettent aux différents lipides de se mouvoir dans la membrane (notion de volume libre, de protrusions aqueuses) (voir figure 39 A et B). L'application d'un champ électrique externe apporte l'énergie nécessaire au basculement des phospholipides et transforme les pores hydrophobes en pores hydrophiles (voir figure 39 C). Ce nouvel état permet le passage de molécules hydrophiles habituellement non perméantes. Ces structures de type "micellaire" sont réversibles tant qu'elles n'ont pas atteint la taille critique qui provoque une rupture irréversible de la membrane.

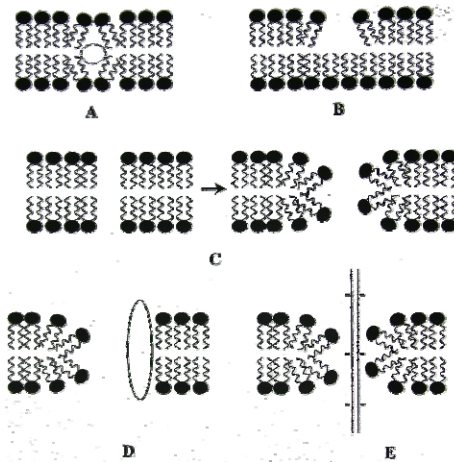


Figure 39 : Schéma de modèles structuraux hypothétiques pour l'électroperméabilisation transitoire et réversible. A : fluctuation de volume libre ; B : protrusion aqueuse ; C : pores hydrophobes évoluant en pores hydrophiles ; D : pores mixtes ; E : insertion de molécules chargées dans les pores hydrophiles. D'après (Weaver 1993).

Ce modèle permet donc d'expliquer à la fois la création et la disparition de la perméabilité membranaire sous l'effet d'un champ électrique externe. Cependant, il ne permet pas de simuler tous les phénomènes observés dans le cas des cellules animales comme le maintien de l'état perméable au-delà de l'application du champ. De plus, ces modèles considèrent la membrane comme un édifice purement lipidique. Or, l'implication des protéines membranaires et du cytosquelette des cellules dans la stabilisation de ces structures a été démontrée (Rols et Teissie 1992; Teissie et Rols 1994).

(2) Mise en évidence des pores ?

Des travaux basés sur des mesures de conductance, sur l'étude de la pénétration ou la libération de molécules par les cellules permettent d'estimer que le diamètre des pores varie entre 1 et 10 nanomètres. Selon les auteurs le nombre de pores varie entre un et plusieurs centaines (Kinosita et Tsong 1977; Benz et Zimmermann 1983; Schwister et Deuticke 1985; Sowers et Lieber 1986; Dimitrov et Sowers 1990).

Une observation en microscopie électronique et cryofracture d'érythrocytes électroperméabilisés avait permis de montrer l'apparition de modifications membranaires de types "languettes" et "cratères" lors de l'électrofusion, après l'électroperméabilisation (Stenger et Hui 1986). Une approche similaire réalisée par Chang et Reese en 1990 (Chang et Reese 1990), montre l'apparition de structures ouvertes en forme de cratère au niveau de la membrane d'érythrocytes électroperméabilisés (voir figure 40). Cependant, le traitement électrique est réalisé en milieu hypotonique et de telles structures n'apparaissent qu'au bout de dix secondes après l'application du champ, elles semblent donc être dues à un effet secondaire de la perméabilisation : l'hémolyse des globules. En effet les micrographies des pores membranaires observés durant l'hémolyse ont une structure qui ressemble à celle décrite par Chang et Reese (Cudd, Arvinte *et al.* 1989). De plus ces structures n'ont jamais pu être observées dans des conditions iso-osmolaire, ni sur d'autres types de cellules.

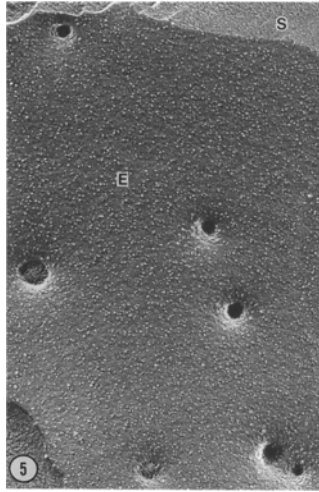


Figure 40 : Face externe d'érythrocyte humain électropéabilisé, cryogénisé 40ms après l'application des pulses et observé en microscopie électronique, grossit 60000x. D'après (Chang et Reese 1990).

c) Modèle actuel

La plupart des modèles théoriques actuels font encore intervenir la formation de pores, or ces diverses théories expliquent toujours mal les résultats observés à la fois *in vitro* et *in vivo* et ne tiennent toujours pas compte de l'implication des protéines membranaires. Si la formation d'électropores n'est donc toujours pas prouvée, les lipides membranaires, eux, sont clairement impliqués dans le processus de perméabilisation. En effet une analyse par résonance magnétique nucléaire du phosphore 31 a permis de montrer une modification de l'orientation des têtes polaires des phospholipides au niveau de la membrane plasmique électropéabilisée de cellules CHO (Lopez 1988). Cette étude montre que tous les phospholipides de la zone perméabilisée sont affectés et qu'il n'y a donc sans doute pas de défauts ponctuels (pores) au niveau de la membrane.

Les impulsions électriques appliquées ne génèrent sans doute pas de pores, mais elles altèrent bien suffisamment la membrane pour la rendre perméable puisque de nombreuses expériences *in vitro* ont confirmé que les impulsions électriques permettent bien l'entrée par simple diffusion de petites molécules non perméantes. *In vivo* la perméabilisation membranaire obtenue par application des champs électriques a également été observée. Elle a été évaluée en mesurant la capacité des cellules musculaires à capter une petite molécule hydrophile radioactive : l'EDTA complexé au chrome 51 (EDTA-⁵¹Cr) (Gehl, Sorensen *et al.* 1999; Mir, Bureau *et al.* 1999). Ces études montrent que la captation de la molécule est identique, qu'elle soit injectée 30 secondes avant ou après l'application des impulsions électriques. Ainsi les impulsions électriques entraînent *in vitro* et *in vivo* une perturbation de la membrane se prolongeant au-delà de la durée de l'impulsion et suffisante pour autoriser la diffusion au travers de la membrane de petites molécules non perméantes.

A l'heure actuelle les différentes étapes impliquées dans l'électropéabilisation sont connues, mais les mécanismes moléculaires restent fortement spéculatifs (Teissie, Golzio *et al.* 2005) :

- dans un premier temps (à l'échelle de la microseconde) le champ électrique appliqué induit une augmentation du potentiel transmembranaire jusqu'au seuil de perméabilisation,
- puis une modification membranaire apparaît et augmente progressivement (à une échelle de temps pouvant atteindre quelques millisecondes) tant que le champ est maintenu au-dessus de la valeur critique,

- dès que le champ électrique devient inférieur à la valeur critique, une réorganisation très rapide (quelques millisecondes) de la membrane se produit, diminuant fortement son niveau de perméabilisation,
- enfin la membrane continue de se restructurer lentement et reste dans un état semi-perméabilisé pendant plusieurs secondes avant de revenir à son état initial,
- après retour au niveau initial de la perméabilité membranaire, la structure membranaire (flip flop des lipides) et les propriétés physiologiques de la membrane (macropinocytose) mettent plusieurs heures à revenir à la normale.

6. Applications de l'électroperméabilisation

Selon l'amplitude du champ appliqué, mais aussi en fonction de la durée, du nombre et de la fréquence des impulsions, la membrane électroperméabilisée des cellules acquiert de nouvelles propriétés qui sont à l'origine de ces applications actuelles en biotechnologie et en médecine.

a) Électroperméabilisation et électrochargement

En induisant une perméabilité membranaire non spécifique, réversible et contrôlée, l'électroperméabilisation permet un accès direct au compartiment intracellulaire à des molécules non perméantes (Mir, Banoun *et al.* 1988). En plus des molécules de petite taille, cette technique permet le transfert de macromolécules (anticorps, toxines...), et plus particulièrement de l'ADN (on parle alors d'électrotransfert, c'est l'objet des chapitres V.D. et suivants de cette introduction).

Actuellement, la principale application thérapeutique de l'électroperméabilisation *in vivo* est l'utilisation de petites molécules comme la bléomycine (voir figure 1) en électrochimiothérapie, déjà en utilisation courante en clinique humaine et vétérinaire, principalement pour le traitement des tumeurs cutanées (voir figure 42). Cette technique consiste à utiliser le courant électrique pour perméabiliser la membrane plasmique afin de favoriser la pénétration d'un médicament antitumorale comme la bléomycine (voir figure 41) (Mir et Orlowski 1999; Mir et Orlowski 2000).

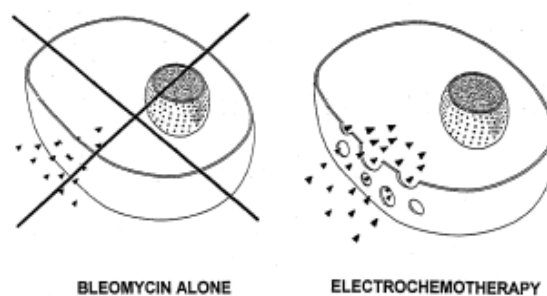


Figure 41 : Illustration du principe d'électrochimiothérapie. L'électroperméabilisation électrique favorise la pénétration intracellulaire de la bléomycine. D'après (Mir et Orlowski 1999).

Le médicament peut être injecté par voie intraveineuse à distance de la tumeur, au niveau de laquelle le courant électrique est appliqué, ou par voie locale (injection intratumorale). La combinaison de l'électrochimiothérapie avec l'électrotransfert d'un gène suppresseur de tumeurs (MBD2) conjugue deux effets bénéfiques d'un traitement contre le cancer (Ivanov, Lamrihi *et al.* 2003).

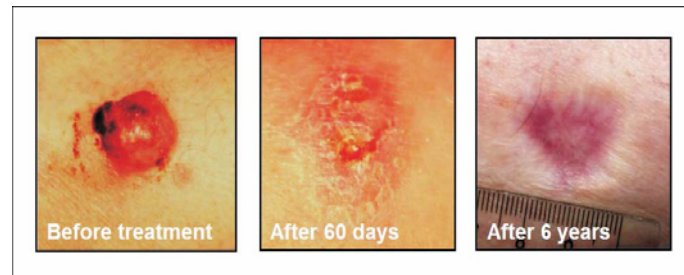


Figure 42 : Exemple de résultat obtenu par un traitement par électrochimiothérapie. Le mélanome (2cm de diamètre) à été traité une seule fois par électrochimiothérapie avec du cisplatine en intratumorale. Après 6 ans il n'y a toujours pas de réapparition du mélanome. D'après (Sersa, Cemazar *et al.* 2003) et la newsletter n°2 du projet ESOPE : <http://www.cliniporator.com/goods/newsletters/ESOPENewsletterNo2.pdf>.

b) Electrofusion

La membrane électroperméabilisée est fusogène permettant la fusion de cellules mises en contact, qu'elles soient ou non de même origine (Hui et Stenger 1993). Les cellules peuvent être mises en contact avant les impulsions par des substances chimiques (polyéthylène glycol, spermine) ou par diélectrophorèse (Zimmermann et Unovitz 1987). Si le contact est réalisé après l'application des impulsions électriques, par centrifugation ou par diélectrophorèse, les cellules fusionnent même si elles ont été perméabilisées séparément (Teissie et Rols 1986; Sowers 1993). Ces résultats montrent que la fusion est une conséquence de la perméabilisation. L'événement de fusion membranaire indispensable à la fusion cellulaire, nécessite la mise en contact des régions électroperméabilisées des deux cellules partenaires (Teissie et Ramos 1998).

Il existe au moins trois applications pour la fusion cellulaire :

Immunothérapie – production d'hybrides thérapeutiques combinant une cellule cancéreuse avec une cellule dendritique

Production d'hybridomes pour la fabrication d'anticorps. Par exemple un hybridome issu de la fusion d'un myélome et d'un lymphocyte est capable de se diviser à l'infini (propriété de la cellule cancéreuse plus grosse que le myélome) et de produire des anticorps spécifiques (propriété du lymphocyte B). Cette technique de laboratoire permet d'obtenir des anticorps monoclonaux très purs.

Transfert nucléaire – traitement de la fertilité (fusion d'une cellule avec un ovocyte énucléé) et propagation animale

c) Électroinsertion

Il est possible d'insérer des protéines possédant un fragment transmembranaire dans la membrane électroperméabilisée de globules rouges, de cellule CHO et de cellules K562 (Mouneimne, Tosi *et al.* 1990; el Ouagari, Gabriel *et al.* 1993; Raffy et Teissie 1995).

d) Electromortalité

Des champs électriques intenses peuvent entraîner une rupture irréversible de la membrane mais aussi des dysfonctionnements du métabolisme cellulaire et conduire à la mort cellulaire (Sale et Hamilton 1968; Gabriel et Teissie 1995; Vernhes, Cabanes *et al.* 1999). L'électroporation irréversible présente un intérêt comme technique d'ablation, par exemple pour traiter des tumeurs (Miller, Leor *et al.* 2005; Edd, Horowitz *et al.* 2006).

D. Aspects mécanistiques de l'électrotransfert

Depuis les années 80, la technique d'électroporéabilisation est utilisée pour le transfert d'acides nucléiques, sous le nom d'électrotransfert.

L'électrotransfert est un processus comprenant plusieurs étapes. Dans un premier temps l'ADN plasmidique est incubé avec les cellules, puis le champ électrique est appliqué. Sous l'effet du champ électrique les cellules sont électroporéabilisées et l'ADN plasmidique peut alors entrer dans la cellule. Une fois dans le cytoplasme le plasmide va migrer jusqu'au noyau et le transgène pourra alors être exprimé quelques heures après l'entrée du plasmide dans la cellule.

Bien que les mécanismes exacts de l'électrotransfert ne soient pas encore élucidés, de nombreux événements ont été décrits au cours de l'électrotransfert, permettant d'avoir quelques informations sur les mécanismes impliqués.

1. Importance d'une composante électrophorétique lors de l'électrotransfert

La composante électrophorétique de l'électrotransfert d'ADN a d'abord été mise en évidence *in vitro* par une expérience sur des monocouches de cellules soumises à l'application d'un champ électrique induisant une électrophorèse (Klenchin, Sukharev *et al.* 1991). Ce phénomène d'électrophorèse permet le déplacement de l'ADN vers la cellule et il pourrait aussi favoriser l'insertion de l'ADN dans la membrane cellulaire préalablement déstabilisée par le champ électrique et/ou favoriser le mouvement de l'ADN dans la cellule électroporéabilisée.

Dans un premier temps Klenchin *et al.* ont démontré la nécessité de la présence de l'ADN au moment de l'application du champ électrique (Klenchin, Sukharev *et al.* 1991). De plus ils ont montré que l'efficacité de transfection dépendait de la polarité du champ électrique : une impulsion avec une polarité induisant une migration électrophorétique de l'ADN vers les cellules permettait une transfection 10 fois plus efficace qu'une impulsion de polarité inverse. Sukharev *et al.* ont également montré *in vitro* que des impulsions de courte durée à haut voltage (HV) induisaient une perméabilisation de la membrane mais pas de transfection et que des impulsions de longue durée à bas voltage (LV) n'induisaient ni perméabilisation ni transfection. Par contre la séquence HV puis LV permettait d'obtenir une transfection. Une hypothèse proposée était que la transfection des cellules perméabilisées par le HV n'était possible que si l'on induisait une électrophorèse de l'ADN avec le LV (Sukharev, Klenchin *et al.* 1992).

En 1994 Cymbalyuk et Serov (Cymbalyuk et Serov 1994) ont confirmé qu'il est possible de transfecter des cellules par l'application d'une impulsion brève (μ s) mais de forte intensité pour perméabiliser la membrane en combinaison avec une deuxième impulsion non perméabilisante mais de longue durée. Ils ont également montré que lorsque la direction du champ de la deuxième impulsion est inversée par rapport à la première (rotation de 180°), le taux de transfection reste le même, alors que lorsque la direction du champ de la deuxième impulsion est croisée par rapport à la première (rotation de 90°), le taux de transfection s'effondre. Ces auteurs montrent ainsi l'importance d'un effet électrophorétique sur l'ADN au niveau des zones préalablement perméabilisées.

En 1999, Mir *et al.* ont montré *in vivo* que des impulsions électriques permettaient d'augmenter le transfert de gènes dans le muscle squelettique non seulement par un effet de perméabilisation de la cellule mais également par un effet électrophorétique sur l'ADN permettant sa migration et son entrée dans la cellule (Mir, Bureau *et al.* 1999). Ils ont étudié

d'une part l'incorporation du ^{51}Cr -EDTA radioactif comme marqueur de la perméabilisation des fibres musculaires, et d'autre part l'expression du transgène, comme preuve de l'entrée d'ADN. Ils ont montré que l'ajout de ^{51}Cr -EDTA peu de temps après l'impulsion électrique permettait encore la pénétration des marqueurs radioactifs alors que l'ajout d'ADN après les impulsions électriques ne permettait plus l'entrée de l'ADN. De nombreuses autres études ont confirmé que pour que le transfert de gènes soit effectif, il faut obligatoirement que l'ADN soit ajouté dans le milieu avant l'application des impulsions électriques (Sukharev, Klenchin *et al.* 1992; Wolf, Rols *et al.* 1994; Ganeva, Galutzov *et al.* 1995; Eynard, Rols *et al.* 1997; Rols et Teissie 1998; Liu et Huang 2002). Toutefois, en se basant sur l'analyse de l'expression du transgène, il a été démontré *in vivo* que l'efficacité de transfection restait inchangée lorsque l'électrotransfert était réalisé jusqu'à 4 heures après l'injection du plasmide (Satkauskas, Bureau *et al.* 2001); ceci suggère l'existence d'un pool d'ADN électrotransférable qui est très stable, même si une grande partie de l'ADN est dégradé dans les premières heures suivant l'injection (Cappelletti, Zampaglione *et al.* 2003). D'autres expériences complémentaires permettent de suggérer que l'ADN injecté soit rapidement séparé en deux compartiments: dans le premier, la majorité de l'ADN est rapidement dégradée et éliminée (dès 5 minutes après l'injection), et dans le second, une petite partie de l'ADN injecté qui peut être électrotransférée est dégradée plus lentement (Bureau, Naimi *et al.* 2004).

L'ADN doit donc être présent *in situ* au moment des impulsions électriques pour obtenir une transfection cellulaire efficace car il est incapable de traverser la membrane déstabilisée par simple diffusion comme les petites molécules non perméantes. Ceci suggère un effet direct et actif du champ électrique sur les molécules d'ADN pour promouvoir leur entrée dans les cellules. D'où les hypothèses mécanistiques actuelles d'un processus biphasique nécessitant non seulement une électroperméabilisation cellulaire, mais aussi une électrophorèse de l'ADN.

Cette hypothèse de phénomènes de perméabilisation et d'électrophorèse induits par la procédure d'électrotransfert est confortée *in vivo* par l'étude de combinaisons d'impulsions de faible voltage et de longue durée, non perméabilisantes (LV, dites impulsions électrophorétiques) et d'impulsions de fort voltage et courte durée (HV, dites impulsions perméabilisantes) (Bureau, Gehl *et al.* 2000). Pour montrer cela ils ont étudié le transfert de gènes sur le muscle squelettique de souris. Seule la combinaison d'une impulsion HV (800V/cm ; 100µs) suivie d'une impulsion LV (80V/cm ; 80ms) a conduit un transfert de gènes efficace, similaire à celui obtenu par utilisation des conditions électriques standards précédemment décrites.

La poursuite de ces travaux a permis de confirmer que les impulsions HV n'agissent que sur la perméabilisation cellulaire et non sur l'ADN, et que les impulsions LV ont un effet électrophorétique sur l'ADN *in vivo* (Satkauskas, Bureau *et al.* 2002). L'importance de la perméabilisation cellulaire a aussi été étudiée par IRM à l'aide d'un complexe du gadolinium comme agent de contraste (gadopentate dimeglumine). Ces études montrent que la zone de perméabilisation au complexe gadopentate dimeglumine est identique à la zone d'expression d'un plasmide codant la β -galactosidase (Paturneau-Jouas, Parzy *et al.* 2003).

Les rôles de la perméabilisation et de l'électrophorèse ont été approfondis directement à l'échelle de la cellule unique, par microscopie en fluorescence (Golzio, Teissie *et al.* 2002). Ces travaux révèlent que des impulsions électriques de l'ordre de la milliseconde induisent une interaction entre la membrane électroperméabilisée et l'ADN. Une accumulation de plasmides fluorescents a été observée au contact de la membrane cellulaire côté cathode. Cette accumulation requiert une électroperméabilisation préalable. L'ADN étant chargé négativement il migre ensuite vers l'anode sous l'effet du champ électrique et interagit donc avec la membrane cellulaire faisant face à la cathode. L'effet électrophorétique du courant contribuerait ensuite à l'enchâssement de l'ADN dans la membrane plasmique préalablement perméabilisée. L'interaction ainsi obtenue entre l'ADN et la membrane cellulaire conduit à la

formation d'agrégats localisés, insérés dans la membrane cellulaire (Golzio, Teissie *et al.* 2002; Faurie, Golzio *et al.* 2003), qui ne sont pas libérés de la membrane cellulaire par application d'impulsions électriques de polarité inverse.

2. Une internalisation de l'ADN postérieure à l'impulsion électrique

De nombreuses expériences ont montré que l'ADN n'était pas internalisé durant l'application des impulsions électriques mais seulement quelques secondes ou minutes après. En effet l'ADN reste accessible à la DNase I (enzyme qui dégrade les acides nucléiques double brin), pendant plusieurs secondes *in vitro* et plusieurs minutes *in vivo*, après la dernière impulsion (Eynard, Sixou *et al.* 1992; Ganeva, Galutzov *et al.* 1995; Eynard, Rols *et al.* 1997; Satkauskas, Bureau *et al.* 2001).

De plus, au cours de l'électrotransfert, une accumulation de plasmides fluorescents a été observée au contact de la membrane cellulaire côté cathode sans pour autant immédiatement se déplacer dans le cytosol (Golzio, Teissie *et al.* 2002; Faurie, Golzio *et al.* 2003).

Ainsi l'ADN doit être présent pendant les impulsions et l'électrophorèse induite par le champ favorise son insertion dans la membrane, mais l'ADN ne franchit la membrane électroperméabilisée que dans la minute suivante (Golzio, Rols *et al.* 2004).

Dans la période qui suit la fin de la stimulation électrique, l'ADN traverserait la membrane plasmique selon un mécanisme encore controversé.

3. Implication du métabolisme énergétique dans l'électrotransfert

La déstabilisation de la membrane cellulaire et l'effet électrophorétique sur l'ADN ne sont sans doute pas les seuls mécanismes contribuant au transfert de l'ADN dans la cellule. Par exemple, Rols *et al.* ont évoqué l'importance du métabolisme énergétique (ADP et ATP) pour le passage de l'ADN à travers la membrane et sa migration jusqu'au noyau (Rols, Delteil *et al.* 1998).

Il a été démontré que la translocation de l'ADN au travers de la membrane plasmique était un processus dépendant du niveau d'ADP présent dans le milieu d'électroporation, alors que l'ATP contrôlait plutôt la pénétration intranucléaire et la transcription du transgène (Rols, Delteil *et al.* 1998). En revanche, l'électroperméabilisation et le « resealing » de la membrane ne semblent pas dépendre directement de l'ATP ou de l'ADP.

4. Modèles mécanistiques de l'électrotransfert

Les mécanismes moléculaires de l'électrotransfert d'ADN *in vivo* sont encore à l'heure actuelle en cours d'investigation. C'est très vraisemblablement un mécanisme multi-étapes faisant intervenir suite à l'injection d'ADN : distribution de l'ADN, électroperméabilisation de la cellule et transfert d'ADN facilité par un effet électrophorétique. Cependant il est encore nécessaire de comprendre les détails et les contributions de chaque étape pour développer des stratégies d'électrotransfert plus efficaces.

Comme pour l'électroperméabilisation, il a d'abord été suggéré que l'ADN utilisait des pores générés par la stimulation électrique pour entrer dans la cellule (Xie, Sun *et al.* 1990). L'électroperméabilisation conduirait à la formation d'« électropores » relativement stables, au sein de la membrane plasmique, pores qui serviraient de point de passage entre le

milieu extracellulaire et intracellulaire (Neumann, Schaefer-Ridder *et al.* 1982; de Gennes 1999).

Ainsi un modèle de perméabilisation membranaire basé sur la formation de pores avait été proposé par Hristova (voir figure 43) (Hristova, Tsoneva *et al.* 1997). Ce modèle décrit la transition réversible entre un état où la bicouche lipidique membranaire est imperméable et un état où celle-ci devient perméable à de larges molécules anioniques. Le champ électrique externe induit un potentiel transmembranaire du fait de la redistribution des ions autour de la membrane. Dans un premier temps, des pores hydrophobes vont se former avant de donner naissance à des pores hydrophiles où les lipides s'organisent de façon à diminuer l'interaction des zones hydrophobes avec le milieu aqueux et permettant ainsi le passage de l'ADN.

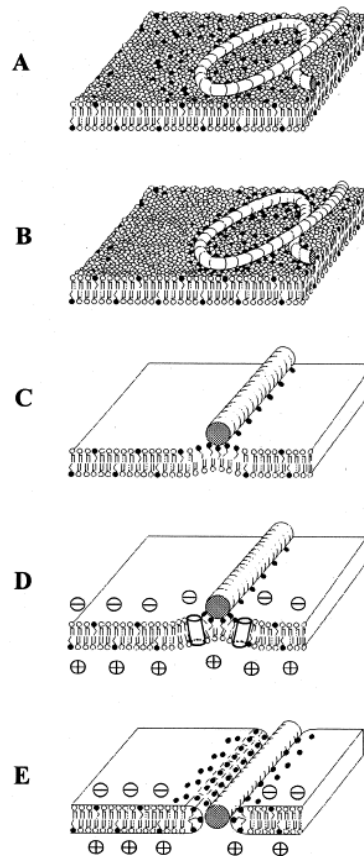


Figure 43 : Schéma décrivant la séquence d'événements de l'électrotransfert d'ADN, facilitée par la présence de sphingosine dans la bicouche membranaire. A : Adsorption partielle d'une section de l'ADN plasmidique sur la surface membranaire. B : L'ADN polyanionique entraîne une séparation de phase partielle des molécules cationiques de sphingosines au niveau de la zone de contact avec l'ADN adsorbé. C : Les sphingosines ont tendance à former des micelles ce qui provoquerait une forte courbure localisée au niveau de la zone de contact. D : L'application du champ électrique provoque la perméabilisation locale de la membrane, c'est à dire la formation probable de pores hydrophobes dans la partie incurvée. Un état intermédiaire transitoire pour l'insertion de l'ADN dans la surface serait probablement l'évolution en une zone de pores hydrophiles. E : passage de l'ADN au travers des zones hydrophiles percolées. Ces macropores ne sont pas stables sans la présence de l'ADN et se referment probablement immédiatement après le passage de l'ADN. (de larges électropores ouverts en permanence déchargeraient la membrane, réduisant par conséquent le champ polarisant qui est nécessaire à la formation de ces zones poreuses). D'après (Hristova, Tsoneva *et al.* 1997).

Cependant, comme on l'a vu précédemment, les modèles basés sur une électroperméabilisation due à des pores n'arrivent pas à expliquer les différentes observations expérimentales. A l'heure actuelle le mécanisme moléculaire reste inconnu et seuls les quatre étapes du processus ont été clairement décrites notamment pour les cellules de mammifères dans les conditions *in vitro* (voir figure 44) (Wolf, Rols *et al.* 1994; Ganeva, Galutzov *et al.* 1995; Eynard, Rols *et al.* 1997; Golzio, Teissie *et al.* 2002).

Selon ce modèle, la pénétration de l'ADN dans la cellule se produirait après la fin d'application du courant.

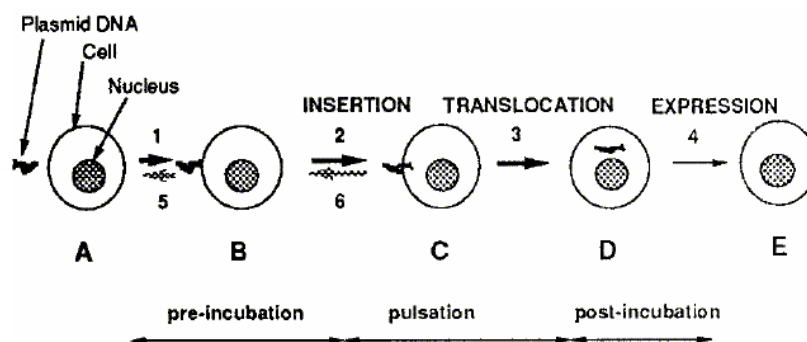


Figure 44 : Modèle d'électrotransfert de gènes dans une cellule eucaryote. A : l'ADN est libre devant la cellule ; B : L'ADN se lie de manière réversible à la membrane cellulaire ; C : durant l'application du champ électrique l'ADN s'enchâsse dans la membrane ; D : la pénétration de l'ADN se poursuit au-delà de la durée d'application du champ électrique, puis la membrane plasmique retrouve son intégrité (resealing) ; E : le gène peut être exprimé par la cellule. D'après (Golzio, Mora *et al.* 1998).

Dans le cas de l'injection d'ADN seul, sans électrotransfert, Satkauskas *et al.* ont proposé un mécanisme d'entrée de l'ADN par endocytose médiée par un récepteur (Satkauskas, Bureau *et al.* 2001). Mais ce mécanisme ne peut pas expliquer l'électrotransfert puisque la saturation de ces récepteurs par un inhibiteur compétitif (un polyanion comme l'ADN) inhibe bien le transfert d'ADN seul mais n'a aucun effet sur l'électrotransfert (Satkauskas, Bureau *et al.* 2001).

En conclusion, bien que le mécanisme exact ne soit pas totalement élucidé, on peut distinguer trois étapes : (1) l'électroperméabilisation de la cellule aux petites molécules indiquant une déstabilisation de la membrane, (2) le transport des acides nucléiques vers les cellules et l'interaction avec la membrane perméabilisée, sans doute par électrophorèse et (3) le passage de la membrane après la fin des impulsions électriques (sans doute par un processus n'impliquant pas d'électropores), suivi de la migration dans le cytoplasme et du passage dans le noyau.

E. Aspects pratiques de l'électrotransfert

1. Les différents paramètres électriques de l'électrotransfert

Différents paramètres de l'électrostimulation sont susceptibles de moduler l'efficacité de l'électroporation : la nature du générateur, la configuration des électrodes, l'intensité du champ électrique, la forme, la durée, le nombre et la fréquence des impulsions électriques. La connaissance des effets de chacun de ces facteurs est importante puisqu'elle conditionnera la qualité de l'électroperméabilisation et donc l'efficacité de l'électrotransfert de gènes.

a) Les générateurs d'impulsions

Il existe divers types de générateurs, les générateurs délivrant des impulsions à voltage constant, les générateurs délivrant des impulsions à courant constant et ceux délivrant des impulsions à décroissance exponentielle ou sinusoïdale à haute fréquence. Au cours de

l'électrostimulation, notamment *in vivo*, une baisse de la résistance du milieu traversé par le courant peut être observée. Dans ces conditions, si le courant est délivré à voltage constant, la quantité de courant réellement reçu par la cellule va augmenter au cours du traitement. Par contre, si les impulsions sont délivrées à courants constants, le voltage appliqué sur la cellule va diminuer (Khan, Smith *et al.* 2003). Ce dernier type d'appareil permet une dissipation d'énergie plus faible, limitant l'effet Joule et ses effets délétères sur le tissu (Draghia-Akli, Khan *et al.* 2002).

Les générateurs à décroissance exponentielle délivrent une intensité de champ électrique (E) qui décroît en cours du temps (t) selon une loi exponentielle, à partir de la valeur demandée (E₀) :

$$E(t) = E_0 e^{(-t/\tau)}$$

Avec $\tau = RC$ où R est la résistance de l'échantillon et C la capacité du condensateur.

On voit donc que ces générateurs ne permettent pas de contrôler exactement la valeur et la durée du champ électrique appliqué.

Pour une revue sur les générateurs d'impulsions utilisés : voir (Puc, Corovic *et al.* 2004).

b) Les électrodes

Le choix des électrodes dépend du tissu cible et de la taille de l'animal traité. Dans tous les cas, le type d'électrodes est d'une importance critique et doit-être mûrement réfléchi.

In vitro, pour un électrotransfert de gènes dans des cellules en suspension, les électrodes sont des plaques parallèles constituant deux des faces de la cuve d'électroporation (voir figure 45). Pour un électrotransfert de gènes dans des cellules adhérentes, il existe également des électrodes directement posées au fond de la boîte de culture (Teissie et Rols 1994).

In vivo, des électrodes plaques prenant en « sandwich » le tissu à électrotransférer (voir figure 45) ou des électrodes aiguilles pénétrant dans le tissu sont utilisées.

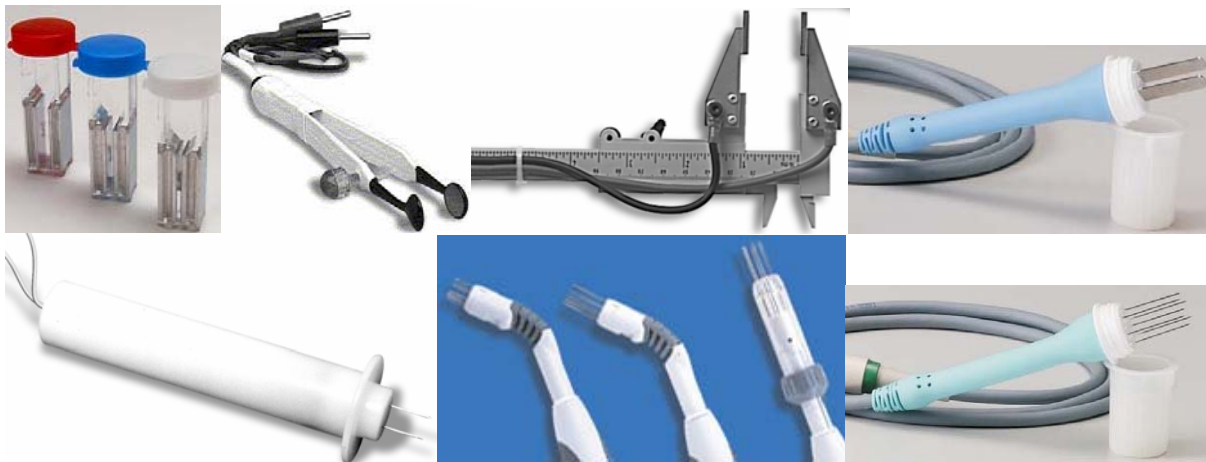


Figure 45 : Exemples de divers types d'électrodes. En haut de gauche à droite : cuvette d'électroporation *in vitro*, électrodes à plaques montées sur pinces, électrodes à plaques montées sur pied à coulisse, électrodes à plaques classiques. En bas de gauche à droite : électrodes composées de deux aiguilles, divers carrousels d'électrodes à aiguilles.

Lors d'un électrotransfert sur petit animal dans un tissu tel que le muscle squelettique, une tumeur ou le foie, la majorité des expérimentateurs utilisent des électrodes composées de 2 plaques attachées à une pince. En effet ce type d'électrode peut être facilement appliqué en externe de chaque côté du tissu d'intérêt.

Pour des animaux de plus grosse taille, les électrodes aiguilles sont plus souvent utilisées, car les électrodes plaques nécessiteraient un champ électrique trop fort (du fait de l'écart important entre les électrodes). Dans le cas des électrodes aiguilles, il peut s'agir de deux aiguilles ou d'un réseau d'aiguilles permettant des sites d'injection et d'électroporation multiples. Les électrodes aiguilles peuvent être portées par un carrousel, permettant alors de délivrer les impulsions électriques au niveau de plusieurs électrodes (voir figure 45) (Heller, Jaroszeski *et al.* 1996; Yoshizato, Nishi *et al.* 2000; Lucas et Heller 2001; Draghia-Akli, Khan *et al.* 2002). Ce dispositif permet de modifier l'orientation et la polarité du champ électrique appliqué ce qui équivaut à faire tourner le champ électrique dans la zone électrostimulée et donc de perméabiliser la zone selon plusieurs directions sans déplacer les électrodes.

Les électrodes plaques permettent une répartition du champ électrique plus homogène et un plus grand volume tissulaire est soumis à un champ électrique de forte intensité (voir figure 46). Dans le cas des électrodes aiguilles, la valeur du champ électrique délivré diminue rapidement lorsque l'on s'éloigne des électrodes (Gehl, Sorensen *et al.* 1999; Miklavcic, Semrov *et al.* 2000).

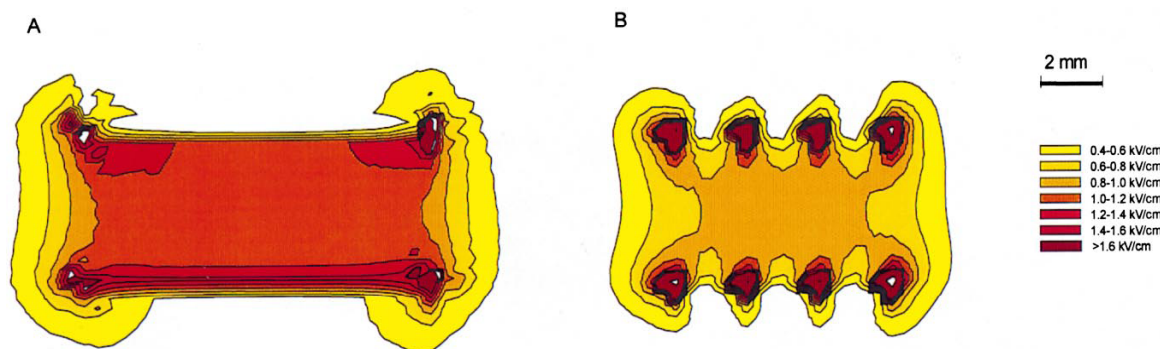


Figure 46 : Calcul de la distribution du champ électrique pour des électrodes à plaques (A) et pour des électrodes composées de deux rangées parallèles de 4 aiguilles (B). Valeur du champ électrique appliqué : 1200V/cm. D'après (Gehl, Sorensen *et al.* 1999).

Pour obtenir une même valeur de courant dans le tissu, la valeur du champ électrique délivré par le générateur *via* des électrodes aiguilles doit être supérieure à celle fixée lorsque le courant est délivré par des électrodes plaques. Les électrodes aiguilles sont en contact direct avec les cellules à transférer. En revanche les électrodes à plaques appliquées sur la peau, doivent traverser plusieurs types tissulaires pouvant conduire à une diminution du courant électrique au niveau du tissu considéré. Chez de gros animaux, la résistance de la peau et l'épaisseur du tissu adipeux sous-cutané, peuvent constituer un obstacle à l'utilisation des électrodes plaques.

Certaines contraintes expérimentales ont conduit au développement d'électrodes spécifiques du tissu à stimuler. Par exemple, une sorte de cuillère contenant la solution d'ADN a été développée pour permettre la stimulation *in vitro* de cellules ganglionnaires de rétine chez le rat (Dezawa, Takano *et al.* 2002). Le même système muni d'une gouttière permet de stimuler individuellement des vaisseaux sanguins (Martin, Young *et al.* 2000). Un système de seringues permettant à la fois l'injection d'ADN dans le muscle et l'application du courant électrique à l'aide des mêmes aiguilles a aussi été décrit (Liu et Huang 2002). Son utilisation dans le muscle strié squelettique permet d'imposer des champs électriques quatre fois plus faibles pour une efficacité de transfection similaire (50 V/cm contre 200 V/cm), mais la surface de la zone traitée et les lésions ne sont pas similaires.

Les électrodes relarguent des ions dans le milieu sous l'action du champ électrique (Stapulionis 1999; Tomov et Tsoneva 2000). Ces ions, en général Fe^{2+} ou Fe^{3+} car les électrodes utilisées sont généralement faites en acier inoxydable, sont susceptibles d'être toxiques pour la cellule, notamment par leur capacité à générer des espèces oxygénées réactives (reactive oxygen species, ROS) (Tomov et Tsoneva 2000; Kotnik, Miklavcic *et al.*

2001). *In vitro*, ils peuvent également conduire à une précipitation des macromolécules biologiques présentes dans le milieu d'électroporation, probablement par interaction entre les charges négatives des macromolécules et les charges positives libérées au niveau de l'anode (Stapulionis 1999).

c) Le champ électrique

La connaissance de l'intensité et de la distribution du champ électrique est très importante, pour obtenir d'une part un transfert de gènes efficace mais également une toxicité réduite. La distribution du champ électrique dépend du tissu et du type d'électrodes entraînant ainsi une variation de l'intensité effective du champ (en V/cm) dans la zone traitée.

La valeur du champ électrique utilisé est exprimée en V/cm. On calcule en général la valeur du champ électrique appliqué en divisant le voltage du courant utilisé par la distance qui sépare les deux électrodes, bien que cela ne corresponde pas réellement aux différentes valeurs locales du champ électrique (surtout dans le cadre des électrodes à aiguilles) (voir figure 46). Sa valeur optimale en terme de perméabilisation est étroitement dépendante de la nature de la cellule ou du tissu traité et des applications envisagées.

La distribution du champ électrique est plus homogène pour des électrodes à plaques que pour des électrodes à aiguilles, et, pour un voltage appliqué identique, le champ électrique obtenu près des électrodes sera plus fort pour des électrodes aiguille que pour des électrodes à plaques, alors qu'entre les deux électrodes il sera plus faible pour des aiguilles que pour des plaques (voir figure 46). (Gehl, Sorensen *et al.* 1999; Miklavcic, Semrov *et al.* 2000). Il convient donc d'adapter la géométrie et le type des électrodes à la géométrie de la zone à traiter.

La perméabilisation membranaire se produit au niveau des zones qui font face aux deux électrodes qui encadrent une cellule sphérique (voir figure 47) (Golzio, Teissie *et al.* 2002; Faurie, Golzio *et al.* 2003). En revanche, l'interaction de l'ADN avec la membrane s'effectue au niveau de la cathode (Golzio, Teissie *et al.* 2002).

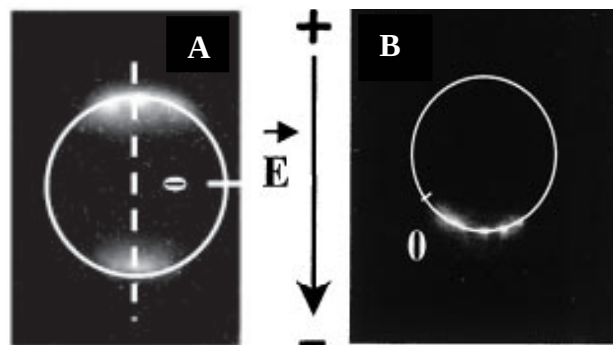


Figure 47 : Electroperméabilisation membranaire et pénétration de l'ADN pour des cellules en suspension en fonction de la position des électrodes. L'électroperméabilisation membranaire asymétrique (panneau A) est visualisée par l'entrée d'un marqueur fluorescent de perméabilité membranaire (iodure de propidium). L'interaction de l'ADN (marqué avec le fluorophore TOTO-1), sous l'effet du champ électrique, avec la membrane électroperméabilisée se produit uniquement du côté de la cathode (panneau B). D'après (Golzio, Teissie *et al.* 2002; Faurie, Golzio *et al.* 2003).

L'orientation du champ électrique par rapport à la cellule est donc aussi un élément important (Teissie et Rols 1993). L'utilisation de deux séries d'impulsions de directions orthogonales permet ainsi d'augmenter l'expression d'un gène rapporteur *in vitro* et *in vivo* dans le muscle

tibialis cranialis de la souris car la zone de perméabilisation cellulaire est augmentée (Faurie, Golzio *et al.* 2003; Faurie, Phez *et al.* 2004). De même, l'utilisation de plusieurs orientations du champ électrique a permis d'optimiser les conditions d'électrotransfert dans l'articulation du genou chez le rat (Ohashi, Kubo *et al.* 2002). D'autres protocoles d'électrotransfert de gènes ont également fait varier la polarité des électrodes au cours de la procédure de stimulation (Aihara et Miyazaki 1998; Maruyama, Sugawa *et al.* 2000; Blomberg, Eskandarpour *et al.* 2002). Ceci s'est révélé aussi efficace dans le contexte de l'électrochimiothérapie (Sersa, Cemazar *et al.* 1996). La première impulsion électrique permet l'enchâssement de l'ADN dans la membrane, par contre l'application d'une deuxième impulsion mais de polarité inverse ne conduirait pas à un désenchâssement de l'ADN de la membrane cellulaire.

Comme décrit précédemment, si le champ électrique appliqué est trop important, il peut se produire une perméabilisation irréversible de la membrane cellulaire (Lee, River *et al.* 1992; Gabriel et Teissie 1995; Gehl, Sorensen *et al.* 1999). Par exemple, dans le muscle strié squelettique de souris, le seuil de perméabilisation réversible a été expérimentalement déterminé à 530 V/cm, alors que l'apparition de dommages irréversibles est observée au-delà de 800 V/cm (Gehl, Sorensen *et al.* 1999).

Pour chaque tissu et chaque espèce, il est nécessaire de déterminer les valeurs seuil du champ électrique : seuil irréversible (perméabilisation) et seuil irréversible (dommages cellulaires) pour obtenir les conditions électriques optimales pour un transfert de gènes avec le minimum d'effets toxiques. Dans ce contexte, Miklavcic *et al.* ont développé un modèle combinant des prédictions numériques et des observations expérimentales pour déterminer ces valeurs seuil dans le cas d'électrodes aiguilles pour délivrer des médicaments dans le foie de lapin (Miklavcic, Semrov *et al.* 2000).

Dans les conditions *in vitro*, les champs électriques utilisés peuvent varier de la dizaine de V/cm jusqu'au kV/cm, voir centaine de kV/cm dans le cas des nanopulses (voir paragraphe V.E.1.e de cette introduction). Pour déterminer le seuil d'électroperméabilisation *in vitro*, les cellules sont généralement électrostimulées en présence d'un colorant, comme l'iodure de propidium, puis un test de viabilité est réalisé. Ainsi il est possible de déterminer le pourcentage de cellules non perméabilisées et des cellules transitoirement ou irréversiblement perméabilisées (Rols et Teissie 1998). *In vivo*, une technique suivant la capture du ^{51}Cr -EDTA 1h après électrostimulation a été mise au point pour déterminer le seuil de perméabilisation des cellules musculaires striées squelettiques (Gehl et Mir 1999).

L'intensité du champ électrique contrôlerait aussi la surface perméabilisée (Rols et Teissie 1990; Wolf, Rols *et al.* 1994; Rols et Teissie 1998; Rols, Golzio *et al.* 2000). Des impulsions de haut voltage et de courte durée (100 μs) provoqueraient plutôt la perméabilisation de la cellule, alors que des impulsions de plus faible voltage et de plus longue durée (plusieurs millisecondes) seraient responsables de l'effet électrophorétique sur l'ADN (Wolf, Rols *et al.* 1994; Bureau, Gehl *et al.* 2000; Satkauskas, Bureau *et al.* 2002; Faurie, Golzio *et al.* 2003).

d) La forme des impulsions électriques

Il existe différents types d'impulsions électriques : les impulsions carrées unipolaires, les impulsions à décroissance exponentielle et les impulsions carrées bipolaires (voir figure 48) (Hofmann 2000; Bloquel, Fabre *et al.* 2004).

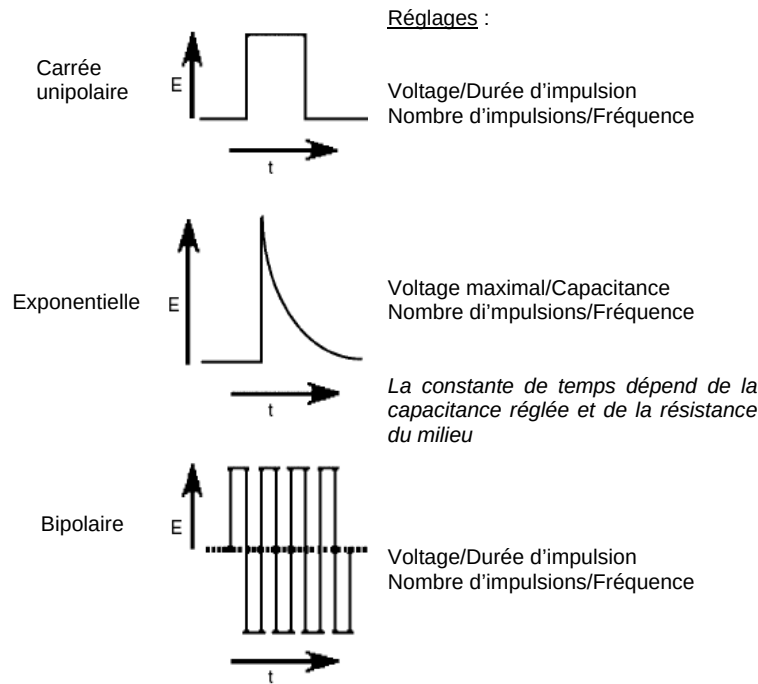


Figure 48 : Différents types d'impulsions électriques utilisés pour l'électrotransfert de gènes. D'après (Bloquel, Fabre *et al.* 2004).

La forme de l'impulsion est importante puisqu'elle détermine la durée pendant laquelle le champ électrique reste au-dessus de la valeur seuil d'électroporation (Kotnik, Pucihar *et al.* 2003).

Pour une impulsion à décroissance exponentielle, la durée, pendant laquelle le champ électrique appliqué est supérieur à la valeur seuil, dépend de la demi-vie de décroissance de l'impulsion, celle-ci dépendant de la résistance du milieu (Knutson et Yee 1987; Andreason et Evans 1988) (voir chapitre V.E.1.a. de cette introduction).

Par contre, pour des impulsions carrées, le champ électrique appliqué reste au-dessus de la valeur seuil pendant la totalité de la durée de l'impulsion.

Les générateurs qui délivrent des impulsions à décroissance exponentielle ne permettent donc pas de fixer la durée pendant laquelle le champ électrique sera appliqué au-dessus de la valeur seuil. Une onde à décroissance exponentielle peut donc être décomposée en deux parties présentant d'abord une tension de haut voltage puis de bas voltage.

Les générateurs d'impulsions électriques carrées permettent de délivrer des impulsions dont l'intensité/voltage et la durée peuvent être réglés indépendamment de la résistance du milieu d'électroporation. Les impulsions exponentielles sont donc principalement utilisées *in vitro*, l'exponentielle ayant une constante de temps dépendante de la résistance du milieu de culture. *In vivo*, des impulsions carrées unipolaires sont majoritairement utilisées, ce qui permet de fixer l'intensité du champ électrique et la durée des impulsions indépendamment de la résistance électrique du tissu.

En revanche, les ondes carrées bipolaires sont encore peu utilisées pour l'électrotransfert de gènes (Tekle, Astumian *et al.* 1991; Mathiesen 1999; Hoover et Magne Kalhovde 2000). Les impulsions électriques peuvent être appliquées 1 à 1 (Mir, Bureau *et al.* 1999) ou sous forme de trains d'impulsions (Rizzuto, Cappelletti *et al.* 1999).

e) La durée et le nombre d'impulsions électriques

La durée des impulsions électriques utilisées *in vitro* et *in vivo* varie de la dizaine de μ sec à la dizaine ou centaine de msec et le nombre d'impulsions utilisées varie de 1 à 1000

(voir revue 2 en annexe (Mir, Moller *et al.* 2005)). D'une façon générale, toute augmentation du nombre et de la durée des impulsions conduit à une augmentation de la perméabilisation cellulaire (Rols et Teissie 1990; Rols et Teissie 1998). Il est cependant difficile de dissocier réellement les effets propres à la durée de stimulation de ceux liés au nombre d'impulsions appliquées. Le calcul de la durée cumulée de stimulation permet de prendre en compte ces deux paramètres. Le nombre et la durée des impulsions électriques contrôlent l'efficacité de la perméabilisation en termes de densité et de taille des « pores » (Rols et Teissie 1990; Rols et Teissie 1998). Des impulsions plus longues permettent de réduire la valeur du champ électrique appliqué (Rols et Teissie 1998). Par exemple, la valeur seuil d'électroporéabilisation du muscle strié squelettique de souris a été déterminée à 90 V/cm pour des impulsions d'une durée de 20 msec (Gehl et Mir 1999), alors que dans le même tissu l'utilisation d'impulsions de 99 μ sec nécessitait d'augmenter le champ électrique à 450 V/cm (Gehl, Sorensen *et al.* 1999). Le phénomène de « resealing » est aussi dépendant de la durée et du nombre d'impulsions (Rols et Teissie 1990; Teissie et Rols 1994).

Il faut également noter le développement relativement récent de l'utilisation d'impulsions électrique de très hauts voltages (de la dizaine à la centaine de kV/cm) et de très courtes durées (de l'ordre de la dizaine ou de la centaine de ns). Ces « nanopulses » ont des effets distincts de ceux de l'électroporation classique : plus la durée de l'impulsion est courte par rapport au temps de charge de la membrane plasmique, plus les effets au niveau de la membrane plasmique sont réduits et les effets intracellulaires augmentés (Chen, Schoenbach *et al.* 2004). Ces « nanopulses » ont été utilisés *in vivo* pour diverses applications (Beebe, White *et al.* 2003). Ainsi on peut citer la destruction *in vivo* de mélanomes, directement par l'effet des impulsions électriques à l'intérieur des cellules tumorales (Nuccitelli, Pliquett *et al.* 2006). La destruction des mélanocytes n'est pas due à un effet hyperthermique puisque l'accroissement local de la température induit par les impulsions électriques n'est que de 3°C (Nuccitelli, Pliquett *et al.* 2006). Les « nanopulses » ont aussi été appliquées après une électroporation classique permettant ainsi un accroissement de l'expression du gène rapporteur GFP (Beebe, White *et al.* 2003), suggérant une extension des effets de l'électrotransfert par des perturbations des structures intracellulaires.

f) La fréquence

Une augmentation de la fréquence entre 0,1 et 1 Hz s'accompagne d'une amélioration de l'efficacité de transfection (Mir, Bureau *et al.* 1999). En général, la fréquence d'application des impulsions électriques délivrées à l'unité ou sous forme de trains, est de l'ordre de 1 à 2 Hz. L'intervalle entre les impulsions est souvent insuffisant pour permettre une fermeture totale des « pores », les effets de l'impulsion suivante s'ajoutent alors aux effets de la précédente (Gowrishankar, Pliquett *et al.* 1999).

Il faut aussi noter l'utilisation d'impulsions électriques jusqu'à une fréquence de 5000 Hz dans le cadre de l'électrochimiothérapie (Miklavcic, Pucihar *et al.* 2005). En effet l'utilisation de fréquences supérieures à la fréquence de téτανisation du muscle permet de réduire le nombre de contractions et donc la douleur, tout en préservant l'efficacité de l'électrochimiothérapie.

Divers protocoles ont été publiés par différents groupes : des impulsions de faible voltage (100-300V) mais de longue durée (4-50ms) pour des essais sur des mélanomes (Rols, Delteil *et al.* 1998) ou le muscle (Mir, Bureau *et al.* 1998) par exemple, ou des impulsions de haut voltage (400-1200V/cm) mais de courte durée (95-300 μ s) dans le foie (Heller, Jaroszeski *et al.* 1996), les tumeurs (Nishi, Yoshizato *et al.* 1996) ou le muscle (Vicat, Boisseau *et al.* 2000). Les paramètres électriques dépendent à la fois de la méthodologie employée et des caractéristiques électriques des tissus cibles.

Pour un aperçu des divers protocoles utilisés voir la revue 2 (Mir, Moller *et al.* 2005) en annexe).

2. Les autres paramètres influençant l'électrotransfert

a) Composition du milieu

(1) *In vitro*

La composition du milieu d'électroperméabilisation revêt une certaine importance. La majorité des expériences sont réalisées dans un milieu isoosmotique et à pH physiologique. Ainsi le milieu d'électroperméabilisation est souvent un milieu de culture avec ou sans sérum, un tampon phosphate ou un tampon HEPES. Mais de nombreux autres types de milieux ont été testés dans le cas de l'électrotransfert *in vitro*.

Ainsi les sels de ces différents tampons peuvent être complètement ou partiellement remplacés par du saccharose, de l'inositol ou un autre sucre a fin de conserver l'osmolarité du tampon tout en diminuant sa conductivité a fin de limiter l'échauffement par effet Joule.

Des études de l'influence de la pression osmotique et de la force ionique du milieu ont également été réalisées, cependant l'utilisation certaines fois d'impulsions de type exponentiel rend certaines interprétations difficiles. En effet dans le cas d'impulsions de type exponentiel toute modification du milieu se traduit également par une modification de la valeur et de la durée du champ électrique appliqué. Il est alors difficile de savoir si les phénomènes observés sont la conséquence de la modification du milieu ou de la modification du champ électrique.

On peut néanmoins mentionner le fait que les cations présents dans le milieu, en interagissant avec les charges négatives de l'ADN, peuvent réduire la mobilité électrophorétique de l'ADN (Lee, Cho *et al.* 2002). Ainsi le nuage ionique autour de la molécule d'ADN est porteur d'une charge inverse de telle sorte que l'application du champ électrique peut faire migrer ce nuage en sens inverse.

D'autre part, un tampon de faible force osmotique peut altérer la membrane et conduire à des lésions cellulaires (Lee, Cho *et al.* 2002). La valeur de la pression osmotique du milieu d'électroporation peut aussi influencer l'efficacité de la perméabilisation notamment en modulant la conductivité du milieu et l'effet Joule (Golzio, Rols *et al.* 2004). En effet, lorsque les cellules sont dans un milieu hypo-osmotique, la perméabilisation des cellules est plus importante (Rols et Teissie 1990). La pression osmotique exercerait un effet sur la phase d'expansion de la perméabilisation (augmentation de la taille des pores sans modification de leur nombre), sans modifier la valeur du seuil d'électroperméabilisation. Un tampon d'électrostimulation hypo-osmolaire améliore l'efficacité de pénétration du plasmide dans la cellule par réduction des forces de répulsion entre ADN et membrane cellulaire (Golzio, Mora *et al.* 1998).

En s'inspirant des protocoles des autres méthodes de transfection, un grand nombre de molécules ont aussi été testées afin d'améliorer les rendements de l'électrotransfert. Un certain nombre de ces molécules permettent ainsi de moduler le taux de transfert obtenu par électrotransfert. Cependant l'action de ces molécules sur le transfert de l'ADN ou sur son expression n'est pas discutée par les auteurs.

La présence de sérum dans le milieu de culture ne semble pas gêner la pénétration du plasmide ADN (Delteil, Teissie *et al.* 2000). Au contraire, elle augmenterait l'efficacité de l'électrotransfert de gènes en améliorant la survie cellulaire.

Cependant il est à noter que de manière générale l'effet de la composition du milieu sur l'efficacité de l'électrotransfert varie d'un type cellulaire à l'autre. Ainsi pour chaque type cellulaire il convient de réaliser une étude préalable.

(2) *In vivo*

Différentes approches ont été envisagées pour améliorer l'efficacité du transfert de gènes *in vivo*.

Une première approche consiste à provoquer un remaniement tissulaire pour favoriser l'incorporation de l'ADN exogène. L'injection de substances myotoxiques provoque des cycles de dégénérescence - régénération musculaire (Duguez, Feasson *et al.* 2002; Duguez, Bihan *et al.* 2003). Le traitement du muscle par la bupivacaïne 3 à 7 jours avant l'injection du plasmide ADN nu sans électroporation s'accompagne d'une augmentation significative de l'efficacité de transfection en comparaison avec des muscles non traités (Wells 1993; Vitadello, Schiaffino *et al.* 1994; Davis, Millan *et al.* 1997). Cependant, ce même type de traitement avant électrotransfert de gènes n'améliore pas l'efficacité de transfection (Aihara et Miyazaki 1998). De plus, ce traitement semble limiter l'expression du transgène à long terme. En revanche, une réinjection du plasmide ADN nu (sans électrostimulation) réalisée trois jours après un protocole d'électrotransfert de gènes permettait d'améliorer l'efficacité de transfection et de maintenir l'expression du transgène (Hoover et Magne Kalhovde 2000). Il a été suggéré que le premier protocole d'électrostimulation avait provoqué un cycle de dégénérescence-régénération qui favoriserait l'expression du transgène suite à la deuxième injection.

Il a également été démontré la relation directe entre l'interaction ADN/membrane et l'efficacité de transfection : une augmentation de la surface de contact entre l'ADN et la membrane conduit à une plus forte expression (Faurie, Phez *et al.* 2004). Différentes études ont aussi montré l'importance de l'accessibilité de l'ADN aux cellules cibles. Ces études, réalisées principalement sur le muscle squelettique, ont montré qu'améliorer la distribution du plasmide conduisait à une augmentation de l'expression. Une meilleure distribution peut être obtenue par exemple par la préinjection d'une solution de saccharose qui crée des espaces entre les fibres musculaires (Davis, Whalen *et al.* 1993), ou encore avec un prétraitement à la hyaluronidase 2 heures avant électrotransfert de gènes (McMahon, Signori *et al.* 2001; Mennuni, Calvaruso *et al.* 2002). La hyaluronidase est une enzyme qui dégrade l'acide hyaluronique, un constituant majeur de la matrice extracellulaire (Favre, Cherel *et al.* 2000) (voir figure 13).

Par exemple, Molnar *et al.* ont montré par histochimie en utilisant le gène LacZ, une augmentation de la zone du muscle transfectée de 150 à 370 % grâce à un prétraitement à la hyaluronidase avant l'électrotransfert (175V/cm) dans différentes souches de souris (Molnar, Gilbert *et al.* 2004). Il est intéressant de noter que ce prétraitement à la hyaluronidase permet d'utiliser, pour un même niveau d'expression, des voltages plus faibles tout en réduisant les dommages musculaires (McMahon, Signori *et al.* 2001).

La nature du véhicule de l'ADN et de certains adjuvants peut moduler l'efficacité de transfection. Ainsi, dans le cadre de l'utilisation d'un tampon NaCl, il a été montré que plus la concentration en cation du tampon diminue plus l'efficacité de transfection augmente, jusqu'à une valeur optimale à partir de laquelle si on continue de diminuer la concentration en cation, l'efficacité diminue. Une concentration de 71mM (soit à peu près la moitié de la concentration d'une solution de sérum physiologique), permet une efficacité de transfection 3 fois plus forte qu'avec un tampon salin classique. Lorsque la concentration en cation devient trop faible des lésions tissulaires apparaissent dues au stress osmotique et à la faible conductivité (Lee, Cho *et al.* 2002).

La co-transfection d'un plasmide ADN non codant ou l'ajout de poly-L-glutamate (un polymère anionique) permet aussi une amélioration de l'efficacité de transfection (Draghia-Akli, Khan *et al.* 2002; Nicol, Wong *et al.* 2002). Ces résultats suggèrent que, de façon surprenante, des molécules chargées négativement pourraient améliorer l'internalisation du plasmide à l'intérieur de la cellule ou le trafic intracellulaire de l'ADN, ou réduire la dégradation de l'ADN.

b) Température

In vitro la température, ainsi que la durée de la phase d'incubation des cellules avec l'ADN plasmidique semblent aussi être des facteurs pouvant influencer l'efficacité de transfert. Cependant, selon le type cellulaire étudié, ces facteurs n'ont pas les mêmes effets (Chu, Hayakawa *et al.* 1987; Rols, Delteil *et al.* 1994).

L'incubation de la cuvette d'électroporation à 4°C avant l'application du champ électrique permet d'améliorer l'efficacité de transfection sans modifier la viabilité des cellules par rapport à une pré incubation à 37°C (Rols, Delteil *et al.* 1994; Teissie et Rols 1994). Ceci résulterait notamment d'une protection de l'ADN contre l'action des DNases et/ou d'une protection des cellules contre l'effet Joule. Il a également été démontré que l'incubation post-stimulation à 37°C favoriserait l'efficacité de pénétration de la molécule d'ADN dans la cellule (Rols et Teissie 1992; Rols, Delteil *et al.* 1994). A cette température le phénomène de « resealing » est favorisé. Par exemple, des cellules CHO incubées à 37°C ont une demi-vie d'ouverture des « pores » de 6 min, tous les « pores » étant ensuite totalement refermés en 30 min (Rols et Teissie 1992; Rols, Delteil *et al.* 1994). En revanche, des cellules soumises au même traitement mais incubées à 4°C après l'électrostimulation restent totalement perméables 30 min après la fin de la stimulation.

Encore une fois il est à noter que ces effets dépendent des cellules et des paramètres électriques appliqués. Par exemple, si lors de l'utilisation de paramètres électriques assez forts, il est recommandé d'incuber les cellules à 37°C après les impulsions pour accélérer la récupération des cellules et augmenter la viabilité, dans le cas de paramètres électriques relativement faibles il pourra être conseillé de laisser les cellules à 4°C après l'électrostimulation pour augmenter la durée de la perméabilisation, sans détriment pour la viabilité cellulaire.

c) Taille et concentration du plasmide

La taille de l'ADN plasmidique ou génomique pouvant être transféré à l'intérieur des cellules est variable et ne constitue pas une limite comme dans le cas des vecteurs viraux. Des fragments de plus de 65kb ont pu être transférés dans des cellules NIH3T3 et dans les cellules de la moelle osseuse (Jastreboff, Ito *et al.* 1987).

Cependant la taille du plasmide a quand même un effet sur l'efficacité de l'électrotransfert. En effet, l'efficacité de transfection du plasmide codant pour la mini-dystrophine est supérieure à celle obtenue pour le plasmide codant pour la dystrophine. Les deux plasmides présentent une différence de taille d'un facteur 2 (Molnar, Gilbert *et al.* 2004). D'autre part, il apparaît que plus la taille du plasmide est grande, plus il devra être apporté en grande quantité (à la fois en terme de masse et de nombre de molécules de plasmide) pour avoir une efficacité de transfection maximale (6µg pour un plasmide de 4,75 Kbp contre 22µg pour un plasmide de 9,75 Kbp). (Espinosa, Liu *et al.* 2001) Ces observations peuvent s'expliquer par les résultats des expériences de micro injections présentées au chapitre III.C..

La concentration plasmidique utilisée varie selon les expériences, mais de manière générale plus le nombre de copies d'ADN est important plus le taux de cellules transfectées augmente (Andreason et Evans 1988; Wolf, Rols *et al.* 1994). Cependant, au-delà d'une certaine valeur, un plateau était observé (Suzuki, Shin *et al.* 1998; Mir, Bureau *et al.* 1999; Rizzuto, Cappelletti *et al.* 1999; Blair-Parks, Weston *et al.* 2002; Draghia-Akli, Khan *et al.* 2002; Nicol, Wong *et al.* 2002; Dean, Machado-Aranda *et al.* 2003; Khan, Smith *et al.* 2003). Dans certains tissus, un effet toxique de certains plasmides a pu être mis en évidence lorsque des concentrations trop importantes sont utilisées. Elles entraînent une forte chute de la viabilité et du taux de transfection (Heller, Jaroszeski *et al.* 1996; Matsumoto, Komori *et al.* 2001).

Le volume d'injection de l'ADN revêt également une certaine importance. Un volume d'injections correspondant à 30 % du volume total du tissu induirait une pression hydrostatique telle que la pénétration de l'ADN serait améliorée dans certains tissus (Hartikka, Sukhu *et al.* 2001).

d) Répercussions cellulaires et moléculaires de l'électrotransfert

(1) *In vitro*

L'électrostimulation des cellules s'accompagne d'un maintien de leurs fonctions biologiques. Elles restent notamment capables de se multiplier et de se différencier (Espinosa, Liu *et al.* 2001). Cependant, différents effets secondaires peuvent mettre en péril la survie cellulaire.

L'application d'impulsions électriques de courte (de l'ordre de plusieurs μ sec) ou de longue durée (dizaine de msec) sur des cellules *in vitro* s'accompagne de la production de ROS, concomitante à la perméabilisation cellulaire (Gabriel et Teissie 1994). La production de ROS augmente de façon proportionnelle au degré de perméabilisation.

L'ajout de substances comme le diméthylsulfoxyde ou l'ascorbate de sodium permet une amélioration de la survie cellulaire (Gabriel et Teissie 1994; Sabri, Pelissier *et al.* 1998; Bonnafe, Vernhes *et al.* 1999).

D'autre part, l'application de champs électriques efficaces pour la transfection induirait des cassures dans l'ADN génomique (Meakin, Edgerton *et al.* 1995). Ces cassures résulteraient de l'effet électrophorétique exercé sur l'ADN ou seraient dues à la production de ROS.

Par ailleurs, il a été démontré que certains types cellulaires comme les lymphocytes, possèdent une faible efficacité de transfection *in vitro* par électroporation du fait d'une importante apoptose (Li, Sen *et al.* 1999). Dans ce cas-là, l'apoptose est essentiellement due à la pénétration anormalement élevée de l'ADN exogène dans la cellule, indépendamment de son expression ultérieure.

Enfin, des altérations structurales sont également observées : modifications de la répartition asymétrique des phospholipides membranaires et modification de la structure de certaines protéines qui perdent alors leurs fonctions (Lopez, Rols *et al.* 1988; Golzio, Rols *et al.* 2004). Il apparaît donc indispensable d'optimiser les paramètres électriques ainsi que les conditions d'électroporation pour limiter ces effets délétères.

(2) In vivo

Des lésions tissulaires peuvent être associées à l'électrotransfert de gènes et vont limiter l'efficacité de transfection (Taylor, Babbs *et al.* 2004).

En effet la perméabilisation des cellules entraîne la diffusion du milieu externe dans ces cellules ou la diffusion inverse de certains éléments intracellulaires dans le milieu externe, provoquant ainsi la modification du milieu intracellulaire. Le niveau et la durée de l'électroperméabilisation doivent donc être optimisés. Il ne faut pas oublier non plus la production de radicaux libres suite à l'électrotransfert qui a aussi été décrite par différents groupes (Maccarrone, Bladergroen *et al.* 1995; Bonnafeous, Vernhes *et al.* 1999).

D'un point de vue histologique l'utilisation de certaines conditions électriques a entraîné des lésions visibles. Les liaisons relevées sont des marques blanches, situées au niveau de la zone électrostimulée, semblables à des brûlures (Hartikka, Sukhu *et al.* 2001). Le tissu apparaît remanié et présente un infiltrat inflammatoire (voir figure 49). Dans les jours et les semaines qui suivent, les fibres présentent des noyaux en position centrale, révélateur d'un phénomène de régénération (Vicat, Boisseau *et al.* 2000; McMahon, Signori *et al.* 2001; Babiuk, Baca-Estrada *et al.* 2002; Draghia-Akli, Khan *et al.* 2002).

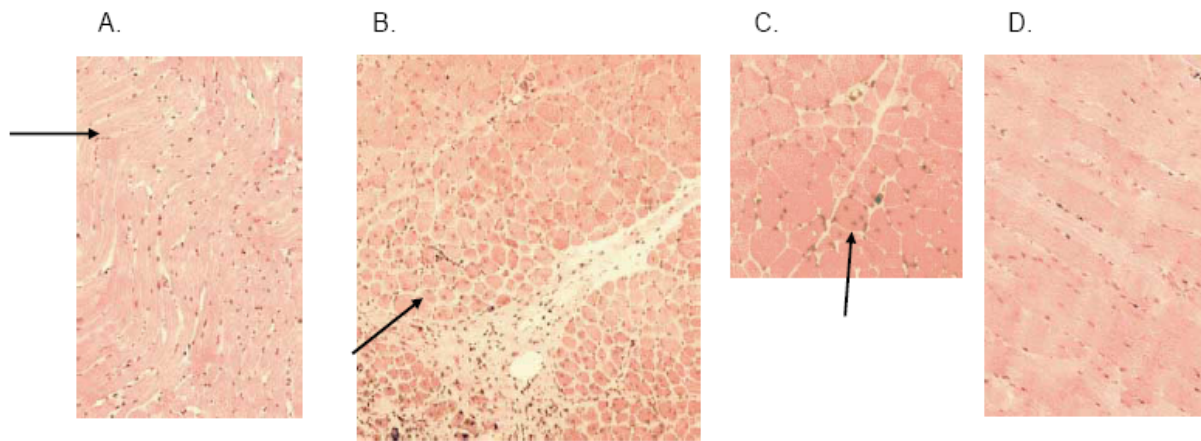


Figure 49 : Analyse histologique du muscle tibial antérieur de souris après application d'un champ électrique de 200 à 250V/cm. Les flèches indiquent les zones lésées. A : ondes de chaleur. B : zone nécrotique. C : régénération avec présence de fibres musculaire à noyau en position centrale. D : architecture normale d'un muscle, traité avec un champ électrique plus faible. D'après (Draghia-Akli, Khan *et al.* 2002).

Les lésions musculaires sont également révélées par la libération d'enzymes spécifiques comme la créatine kinase très rapidement retrouvée dans le sérum après certains protocoles d'électrostimulation (Hartikka, Sukhu *et al.* 2001; Lefesvre, Attema *et al.* 2002). Par ailleurs, il a été démontré que l'application d'impulsions électriques sur un muscle *ex vivo*, sans transfert de gènes, s'accompagne d'un influx de calcium dans la cellule qui se prolonge jusqu'à 60 minutes après l'arrêt de la stimulation (Gissel et Clausen 2003). Cet influx de calcium pourrait donc être à l'origine de lésions intracellulaires. Cependant peu d'études se sont attachées à la caractérisation des lésions autres que musculaires.

Dans des conditions décrites comme étant optimales pour le muscle quadriceps de souris (300V/cm, 8 x 20ms) un infiltrat inflammatoire et des myofibres nécrotiques ont été observés 1 et 7 jours après électrotransfert de gènes. Le tissu retrouvait un aspect intègre 28 à 56 jours plus tard (Hartikka, Sukhu *et al.* 2001). Dans ce contexte, il a été démontré que ces lésions musculaires étaient liées à la présence et à l'expression de l'ADN plasmidique pendant l'électrostimulation (Hartikka, Sukhu *et al.* 2001; Durieux, Bonnefoy *et al.* 2004), mais que les motifs CpG non méthylés ne semblaient pas impliqués (Hartikka, Sukhu *et al.* 2001).

Un ajustement des paramètres électriques permettait de réduire les lésions tissulaires tout en maintenant une expression du transgène supérieure à celle obtenue suite à l'injection de plasmide ADN nu.

Il est également possible de diminuer l'étendue des lésions musculaires en utilisant la hyaluronidase qui permet, par son action biologique sur la matrice extracellulaire, de diminuer la valeur du champ électrique utilisé (McMahon, Signori *et al.* 2001). Ce protocole a notamment été utilisé pour améliorer l'efficacité de transfection dans un muscle fragilisé comme le muscle de souris *mdx* (Gollins, McMahon *et al.* 2003; Molnar, Gilbert *et al.* 2004).

Cependant, malgré l'utilisation de paramètres électriques optimaux, il a été décrit une augmentation transitoire de la transcription de certains gènes muscles-spécifiques comme MyoD et myogénine (Bertrand, Ngo-Muller *et al.* 2003). Il faut attendre 7 à 10 jours pour que le niveau d'expression de ces deux facteurs de transcription retourne à leur valeur basale. Il existerait donc une stimulation de l'expression de protéines spécifiques des muscles, en réponse à l'électrotransfert de gènes, expression qui pourrait témoigner de processus locaux de réparation cellulaire. En revanche, l'application d'un courant électrique seul dans le muscle strié squelettique ne semble pas s'accompagner d'une augmentation de la production de certaines protéines de stress (Rubenstrunk, Mahfoudi *et al.* 2004). Il est par contre intéressant de remarquer que l'impulsion électrique semble activer le promoteur métallothionine endogène, ce qui pourrait avoir une application pour le contrôle de l'expression d'un gène au moyen d'impulsions électriques (Rubenstrunk, Orsini *et al.* 2003). Néanmoins le courant électrique provoquant un relargage d'ions métalliques en provenance des électrodes (Kotnik, Miklavcic *et al.* 2001), il se pourrait que ces promoteurs soient activés de manière indirecte par ces ions métalliques. En effet les promoteurs métallothionine sont initialement connus pour être activés par la présence de métaux lourds (voir chapitre III.E. de cette introduction.).

Le véhicule de reprise de l'ADN peut également conduire à des lésions musculaires. En effet l'utilisation d'une solution d'injection hypo-osmotique peut entraîner des lésions cellulaires (Lee, Cho *et al.* 2002).

De plus, en fonction du voltage appliqué, des effets vasculaires dont une vasoconstriction réflexe des artérioles de 1 à 2 minutes et un léger œdème dû à la perméabilisation des cellules endothéliales ont également été observés au niveau de la zone électrostimulée (Gehl, Skovsgaard *et al.* 2002; Sersa, Krzic *et al.* 2002).

Enfin un risque potentiel dans le cadre d'une utilisation clinique de cette méthode est le problème de l'insertion génomique du plasmide. Une étude, réalisée avec des trains d'impulsions électriques a mis en évidence une très faible intégration 6 semaines après électrotransfert (Wang, Troilo *et al.* 2004). Cependant cette étude n'a pas été confirmée par d'autres, et devrait être réalisée avec d'autres types d'impulsions électriques. Une meilleure compréhension des mécanismes de l'électrotransfert est donc nécessaire pour améliorer la sécurité de la méthode.

La caractérisation des lésions musculaires associées à l'électrotransfert de gènes sera également abordée dans le cadre du travail expérimental réalisé au cours de cette thèse.

e) Tissus et cellules cibles

Même si la transfection par électrostimulation fonctionne sur toutes les cellules, selon une étude elle donne de meilleurs résultats sur des cellules synchronisées en phase G2/M que sur des cellules en phase G1. Ceci peut notamment s'expliquer par la disparition de la membrane nucléaire en phase G2/M (Golzio, Teissie *et al.* 2002). Ce résultat est cependant lui aussi controversé puisque d'autres auteurs ont montré que l'efficacité de transfection était indépendante de la position de la cellule dans le cycle cellulaire (Brunner, Furtbauer *et al.* 2002).

Depuis les premiers essais *in vivo* (Titomirov, Sukharev *et al.* 1991; Heller, Jaroszeski *et al.* 1996; Muramatsu, Shibata *et al.* 1997; Mir, Bureau *et al.* 1998; Rols, Delteil *et al.* 1998), de nombreux tissus (chez diverses espèces animales) ont été traités. On peut citer par exemple : le muscle squelettique, la peau, le foie, le poumon, le rein, les articulations, le cerveau, la rétine, la cornée, et bien d'autres encore (voir revues 1 et 2 en annexe (Andre et Mir 2004; Mir, Moller *et al.* 2005)).

Du fait de la complexité du milieu tissulaire et de la densité cellulaire, il existe une inhomogénéité de la répartition du champ électrique *in vivo* par rapport aux conditions *in vitro*. De plus les paramètres de forme des cellules étant également différents, il y a nécessité de paramètres électriques différents (Canatella, Karr *et al.* 2001). Dans tous les cas, les paramètres optimaux d'électrostimulation doivent être déterminés en fonction du type cellulaire et du modèle animal. Il est à noter que l'âge des animaux et le sexe ne semblent pas avoir une grande influence sur l'efficacité de l'électrotransfert de gènes dans le muscle strié squelettique (Gollins, McMahon *et al.* 2003; Khan, Smith *et al.* 2003). En revanche, pour la transfection de la peau chez la souris, une meilleure efficacité est observée chez les souris jeunes (Chesnoy et Huang 2002).

La comparaison des différentes procédures de stimulation n'est pas toujours évidente pour un même tissu. Par exemple, pour l'électrotransfert de gènes dans la vessie, il est indiqué une différence de potentiel de 100 à 500 V pour une distance entre les électrodes de 5 à 7 mm soit un champ électrique pouvant varier de 142 à 1000 V/cm (Harimoto, Sugimura *et al.* 1998).

De manière générale un grand nombre de conditions différentes d'électrotransfert sont appliquées selon le tissu cible car le transfert de gènes est hautement dépendant de l'organisation du tissu et de la taille des cellules transfectées.

L'un des tissus utilisés dans le cadre de cette thèse est le muscle squelettique, c'est aussi le tissu le plus utilisé pour l'électrotransfert.

L'électrotransfert d'ADN dans le muscle squelettique a été découvert de façon indépendante par trois équipes (Aihara et Miyazaki 1998; Mir, Bureau *et al.* 1998; Mathiesen 1999). Si le muscle squelettique est le tissu cible le plus largement utilisé pour l'électrotransfert c'est parce qu'il offre de nombreux avantages :

- il constitue un large volume facilement accessible,
- le muscle squelettique est constitué de faisceaux musculaires formés eux-mêmes d'un ensemble de fibres musculaires. Les fibres musculaires sont des cellules très allongées et organisées en fibres parallèles : de nombreuses fibres auront ainsi une orientation optimale par rapport au champ et pourront être transfectées sur toute la longueur,
- contrairement aux autres cellules de l'organisme, les cellules musculaires possèdent plusieurs noyaux plaqués contre la membrane cellulaire ce qui facilite le transfert de gènes (Lu, Bou-Gharios *et al.* 2003),
- les fibres musculaires ont une longue durée de vie, car les cellules ne se divisent pas ce qui permet potentiellement une expression à long terme en l'absence de régénération due à une blessure ou une réponse immunitaire cytotoxique (Mir, Bureau *et al.* 1998; Mir, Bureau *et al.* 1999).
- outre les fibres musculaires et le tissu conjonctif qui le constituent, le muscle est parcouru par des vaisseaux sanguins et des fibres nerveuses. Il possède ainsi une vascularisation développée ce qui permet aux protéines produites d'atteindre rapidement la circulation sanguine (pour une revue : voir (Goldspink 2003)).

La persistance de l'ADN à un état épisomale pendant des mois et la capacité du muscle squelettique à sécréter des protéines permettent d'utiliser ce tissu pour des cinétiques d'expression à long terme. De nombreuses études ont montré une production à long terme de protéines sécrétées par le muscle : on peut citer par exemple la phosphatase alcaline sécrétée humaine (hSeAP), le facteur IX humain (Bettan, Emmanuel *et al.* 2000) sur des souris SCID,

l'érythropoïétine (Kreiss, Bettan *et al.* 1999), ou même des immunoglobulines (Bettan, Emmanuel *et al.* 2000) sur des souris immunocompétentes.

Pour toutes ces raisons, le muscle squelettique est une cible de choix pour le transfert de gènes.

F. Applications de l'électrotransfert

L'électrotransfert de gènes *in vivo* conduit à une efficacité de transfection plus importante que d'autres techniques non virales de transfert de gènes telles que le gène gun dans le foie (Muramatsu, Shibata *et al.* 1997), les liposomes dans le cerveau et la cornée (Tsujiie, Isaka *et al.* 2001; Blair-Parks, Weston *et al.* 2002) ou les lipides cationiques dans le tissu synovial (Ohashi, Kubo *et al.* 2002), notamment en permettant à l'ADN d'échapper à l'action des lysosomes (Toneguzzo, Hayday *et al.* 1986; Andreason et Evans 1988; Dujardin, Van Der Smissen *et al.* 2001) et en favorisant la migration de l'ADN en direction du noyau (Cappelletti, Zampaglione *et al.* 2003).

Si la transfection reste transitoire et de durée variable en fonction des tissus utilisés (de quelques semaines (Aihara et Miyazaki 1998; Blair-Parks, Weston *et al.* 2002; Dean, Machado-Aranda *et al.* 2003) à plusieurs mois (Mir, Bureau *et al.* 1998; Mir, Bureau *et al.* 1999; Vicat, Boisseau *et al.* 2000), il est possible de ré-administrer le transgène quelques semaines plus tard et d'obtenir le même niveau de transfection que celui obtenu après le premier électrotransfert de gènes (Hoover et Magne Kalhovde 2000; Payen, Bettan *et al.* 2001).

Ces divers avantages ont permis à l'électrotransfert d'être utilisé dans de nombreuses applications.

1. Applications thérapeutiques

Concernant le transfert de gènes, le champ d'application de l'électrotransfert est vaste (Andre et Mir 2004; Bloquel, Fabre *et al.* 2004). Cependant l'utilisation du muscle comme organe sécréteur reste à l'heure actuelle la principale utilisation de l'électrotransfert.

a) Sécrétion ectopique de protéines

Le transfert de gènes présente une alternative intéressante à l'administration répétée de protéines recombinantes : l'avantage dans ce cas est une meilleure pharmacocinétique parce que la protéine est sécrétée de façon stable (voir figure 2). De nombreuses études avec des gènes rapporteurs ont montré le potentiel de l'électrotransfert intramusculaire pour la sécrétion à des niveaux thérapeutiques de protéines dans la circulation sanguine. Le muscle squelettique est en effet un bon candidat en tant que tissu néoendocrine pour l'expression de cytokines, de facteurs de croissance, de facteurs de coagulation (Kreiss, Bettan *et al.* 1999; Bettan, Emmanuel *et al.* 2000).

Divers groupes ont récemment montré que la sécrétion d'érythropoïétine (Epo) après électrotransfert dans le muscle d'un plasmide codant le gène de l'Epo sous contrôle d'un promoteur CMV ou d'un promoteur sensible à la tétracycline Tet-On conduisait à une meilleure érythropoïèse, à une augmentation de la demi-vie des globules rouges et à un hémocrite élevé pendant plusieurs mois chez des souris bêta-thalassémique (Kreiss, Bettan *et al.* 1999; Rizzuto, Cappelletti *et al.* 2000; Payen, Bettan *et al.* 2001; Samakoglu, Fattori *et al.* 2001). L'électrotransfert d'un plasmide codant l'érythropoïétine a aussi permis de rétablir de manière quasi parfaite le déséquilibre entre les chaînes α et β de l'hémoglobine observé

dans la β -thalassémie (Payen, Bettan *et al.* 2001). L'anémie liée à un défaut rénal est également une cible potentielle de thérapie génique par transfert du gène de l'Epo (Maruyama, Ataka *et al.* 2001).

Le muscle squelettique a aussi été utilisé pour la production de cytokines qui conduit à une augmentation de la survie dans un modèle expérimental viral de myocardite chez la souris (Adachi, Nakano *et al.* 2002) ou chez le rat (Watanabe, Nakazawa *et al.* 2001).

La sécrétion par le muscle du facteur de croissance HGF (Hepatocyte Growth Factor) a montré chez la souris sur un modèle expérimental d'inflammation aiguë du foie (administration de tétrachlorure de carbone), un effet protecteur au niveau des cellules du foie (Tanaka, Ichimaru *et al.* 2002; Xue, Takahara *et al.* 2002).

Un autre résultat prometteur a été obtenu avec une protection contre le diabète auto-immun grâce à la sécrétion par le muscle d'un ligand de l'antigène cellulaire T (CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4), un régulateur négatif de l'activité des lymphocytes T (Prud'homme, Chang *et al.* 2002). Le diabète a aussi été traité par production d'insuline après électrotransfert dans le muscle de souris (Martinenghi, Cusella De Angelis *et al.* 2002).

Enfin, deux groupes ont montré que l'électrotransfert dans le muscle ou dans la peau (avec un promoteur spécifique de l'épiderme : l'involucrine) d'un plasmide codant le facteur VIII conduisait à une correction phénotypique de l'hémophilie A (Long, Jaichandran *et al.* 2005) (Fakharzadeh, Zhang *et al.* 2000).

La potentialité de l'électrotransfert a également été illustrée dans des modèles d'arthrite rhumatoïde chez la souris. En effet, l'électrotransfert de plasmide codant les cytokines IL-10 et IL-4 protège les souris contre l'arthrite induite au collagène (Kim, Greenleaf *et al.* 1996; Perez, Plence *et al.* 2002; Kim, Ho *et al.* 2003; Saidenberg-Kermanac'h, Bessis *et al.* 2003; Ho, Hahn *et al.* 2004). Deux études indépendantes ont également montré que l'électrotransfert dans le muscle de plasmide codant des récepteurs solubles du TNF alpha, conduisait à une inhibition de cette cytokine pro-inflammatoire entraînant une diminution des signes cliniques et histologiques de la maladie (Kim, Ho *et al.* 2003; Bloquel, Bessis *et al.* 2004). L'effet d'un seul traitement par électrotransfert était dans ce dernier cas comparable à l'effet obtenu par des injections répétées de protéine recombinante, l'Ethanercept (Bloquel, Bessis *et al.* 2004). Récemment, une équipe a montré que l'inhibition de l'action de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 par électrotransfert d'un plasmide codant un récepteur de l'IL-1 conduisait, là encore, à une amélioration des scores cliniques (Jeong, Kim *et al.* 2004).

La cytokine anti-inflammatoires IL-18 a montré des propriétés intéressantes dans un modèle d'artériosclérose (Mallat, Corbaz *et al.* 2001).

Ces différentes études montrent que l'électrotransfert intramusculaire peut être utilisé pour atteindre en systémique des niveaux thérapeutiques de protéines sécrétées.

b) Maladies nécessitant la production intracellulaire d'une protéine

Il est aussi possible d'apporter une information génétique qui permet de pallier la déficience d'un gène non impliqué dans la sécrétion d'une protéine. Ainsi l'électrotransfert dans le muscle est une technique applicable sur des muscles fragiles tels que les muscles de souris dystrophiques. L'expression locale d' α 2 laminine a, par exemple, été obtenue chez des souris dystrophiques sans dommage musculaire trop important (Vilquin, Kennel *et al.* 2001) bien qu'une perte d'expression soit observée au cours du temps, causée par un phénomène de dégénération/régénération du muscle. Cette technique s'est avérée efficace également pour l'expression de la dystrophine entière de souris sur un modèle de souris dystrophique (Gollins, McMahon *et al.* 2003; Murakami, Nishi *et al.* 2003; Ferrer, Foster *et al.* 2004; Molnar, Gilbert *et al.* 2004).

Il a été démontré que ce gène était exprimé et que la protéine adoptait une position sarcolemmale, en rapport avec sa fonction normale. Toutefois, dans le cas des dystrophies, l'utilisation de l'électrotransfert de gènes pour la correction définitive de la pathologie génétique ne semble pas actuellement la technique la plus appropriée. En effet, l'importance de la masse musculaire à traiter, l'accessibilité difficile des muscles profonds, ainsi que la quantité importante de plasmide ADN à transférer, ne permettent pas pour l'instant d'envisager son utilisation chez l'humain.

c) Vaccination par immunisation génétique

L'immunisation génétique est un concept assez nouveau en vaccination. Cette méthode simple et peu coûteuse, présente plusieurs avantages : l'antigène est produit généralement sous sa forme native, il est produit de façon prolongée par les cellules de l'organisme, ce qui peut permettre d'éviter le recours au rappel pour certains vaccins et cette stratégie ne présente aucun risque d'infection post-vaccinale.

Il faut cependant noter que, à l'heure actuelle, ce type de vaccination n'est généralement pas encore aussi efficace que la vaccination classique. Le risque d'intégration de l'ADN introduit dans les cellules de l'organisme, doit également être évalué avant une utilisation à grande échelle de ce type de vaccination.

La possibilité d'obtenir une immunisation par transfection d'un ADN a été démontrée pour la première fois il y a une quinzaine d'année (Tang, DeVit *et al.* 1992; Ulmer, Donnelly *et al.* 1993). Elle consiste à injecter directement dans le muscle squelettique ou la peau les gènes codant les protéines antigéniques. L'organisme produit lui-même les antigènes qui vont induire la réaction immunitaire. Il est maintenant bien établi que l'immunisation par ADN induit une réponse durable à la fois cellulaire et humorale (Gurunathan, Klinman *et al.* 2000; Quinn, Jiang *et al.* 2002), bien que le mécanisme conduisant à cette réponse ne soit pas entièrement élucidé. Ce type d'immunisation est souvent développé dans un but vaccinal antiviral ou antibactérien, mais il apparaît clairement que l'on peut l'utiliser pour provoquer chez l'animal la production d'anticorps contre l'antigène injecté avec des titres élevés.

Encore une fois le muscle est un tissu cible privilégié pour ce type d'application. Mais la peau présente aussi un intérêt particulier dans le cadre de la vaccination par ADN :

- par sa fonction naturelle de barrière biologique, c'est un organe de choix pour la vaccination par ADN car elle contient des cellules présentatrices d'antigène,
- de plus, les cellules de l'épiderme ayant une courte durée de vie cela peut être utile pour des traitements qui nécessitent une durée d'expression brève, comme la vaccination par ADN.

Cependant, la peau ayant pour fonction principale la protection de l'organisme contre des agressions externes, elle possède une structure élaborée (Kanitakis 2002), qui ne facilite pas le transfert de gènes. En particulier, la couche supérieure, *stratum corneum* ou couche cornée, constitue la plus importante barrière au transfert de gènes (Jadoul, Bouwstra *et al.* 1999; Denet, Vanbever *et al.* 2004).

Différentes méthodes physiques de transfert de gènes ont donc été développées (pour une revue : voir (Peachman, Rao *et al.* 2003)) comme par exemple injection en intradermique d'ADN nu, le "gene gun" ou pistolet à ADN, ou le "skin patch". L'électrotransfert peut aussi être utilisé (Bakker, Bleeker *et al.* 2004), en effet Dujardin *et al.* ont démontré que des impulsions carrées ou exponentielles induisaient des effets modérés et réversibles sur la peau, sans inflammation et nécrose, tout en perméabilisant de façon transitoire la peau permettant ainsi le passage des molécules (Dujardin, Staes *et al.* 2002).

Comparé aux autres techniques physiques, l'électrotransfert *in vivo* apparaît d'ailleurs comme une technique efficace pour améliorer ce transfert de gènes (Drabick, Glasspool-Malone *et al.* 2001; Zhang, Nolan *et al.* 2002; Pavsely et Preat 2005).

De plus Perez *et al.* ont récemment démontré que l'injection et l'électrotransfert de gènes codant des immunoglobulines permettait une production d'anticorps monoclonaux par le muscle, pouvant atteindre une concentration plasmatique entre 800 et 1500ng/ml en trois semaines (Perez, Bigey *et al.* 2004). Ceci permet d'améliorer l'expression des protéines de plusieurs ordres de grandeur, ce qui est un avantage puisqu'il a été montré que le titre en anticorps produits dépend du taux d'expression du transgène (Lee, Suh *et al.* 1997; Kirman et Seder 2003).

Plusieurs études montrent l'intérêt de la technique d'électrotransfert lors de l'immunisation par ADN : par exemple, le titre en anticorps produits augmente d'un facteur 100 chez la souris après électrotransfert d'un plasmide codant un antigène de surface du virus HBV (Widera, Austin *et al.* 2000). Ce facteur d'augmentation est de l'ordre de 10 dans le cas de lapin ou de cochon d'inde.

Des titres élevés en anticorps ont également été obtenus chez la souris et le lapin après électrotransfert intramusculaire d'un plasmide codant une glycoprotéine de l'enveloppe du virus de l'hépatite C (Zucchelli, Capone *et al.* 2000), et chez la souris après électrotransfert d'un plasmide codant une protéine du bacille de la tuberculose (Tollefsen, Tjelle *et al.* 2002) ou une protéine du VIH (Selby, Goldbeck *et al.* 2000).

Il a aussi été montré que l'électrotransfert d'un plasmide codant l'hémagglutinine de la grippe induisait une meilleure réponse immune chez la souris qu'une simple injection intramusculaire (Bachy, Boudet *et al.* 2001).

Enfin, on peut noter qu'il a été possible de générer des anticorps monoclonaux contre des allergènes de mite après immunisation de souris par électrotransfert (Yang, Cheong *et al.* 2003). Cette technique est également applicable à des animaux plus gros tels que la chèvre, le cochon ou les bovins, après anesthésie locale (Babiuk, Baca-Estrada *et al.* 2002; Tollefsen, Vordermeier *et al.* 2003).

Ces quelques exemples montrent qu'il est possible d'obtenir des anticorps neutralisant avec des titres satisfaisant chez l'animal par immunisation par l'ADN. Ceci est surtout vrai chez la souris, mais la méthode est un peu moins efficace chez les animaux plus gros. Ce qui est peut-être attribuable à une moindre efficacité du transfert de gènes (Dupuis, Denis-Mize *et al.* 2000; Babiuk, Pontarollo *et al.* 2003).

d) Traitement des Cancers.

Le cancer représente le principal domaine d'essais d'application de la thérapie génique. L'électrotransfert est donc aussi un outil intéressant pour des stratégies anticancéreuses (Bettan, Ivanov *et al.* 2000).

Différentes stratégies peuvent être envisagées, on peut globalement les regrouper en quatre concepts principaux :

(a) stimulation de la réponse immunitaire contre une tumeur (cette stratégie rejoint l'application précédente) (Kishida, Asada *et al.* 2001; Tamura, Nishi *et al.* 2001; Li, Xia *et al.* 2002; Lucas, Heller *et al.* 2002; Tamura, Nishi *et al.* 2003) en utilisant par exemple l'interféron alpha 2 (Zhang, Tan *et al.* 2003) ou les interleukines 2 et 12 (Lohr, Lo *et al.* 2001; Lucas, Heller *et al.* 2002)

(b) utilisation de gènes suicides (Goto, Nishi *et al.* 2000; Shibata, Morimoto *et al.* 2002; Goto, Nishi *et al.* 2004)

(c) réparation des défauts du cycle cellulaire causés par la perte de gènes suppresseurs de tumeurs ou l'activation inappropriée d'oncogènes (Baba, Iishi *et al.* 2001; Celiker, Wang *et al.* 2001; Yamashita, Shimada *et al.* 2002)

(d) inhibition de l'angiogénèse tumorale (Martel-Renoir, Trochon-Joseph *et al.* 2003; Bossard, Van den Berghe *et al.* 2004).

L'électrotransfert est alors principalement réalisé dans le muscle, la tumeur ou la peau. (pour une revue détaillée : voir (Tamura et Sakata 2003)).

2. Outil d'investigation

Le transfert de gènes dans les cellules eucaryotes constitue un outil de choix pour la recherche en physiologie cellulaire. Il est en effet possible d'identifier et d'étudier les mécanismes de régulation de l'expression génique ainsi que la fonction des gènes dans un tissu donné et ce dans les conditions *in vitro* et *in vivo*. Le transfert des gènes présente certains avantages par rapport à l'utilisation d'animaux transgéniques ou « knock-out ». L'électrotransfert de gènes est notamment une technique simple à mettre en œuvre, rapide, peu coûteuse et qui permet d'exprimer des gènes en quantité suffisante de façon aiguë. À l'inverse, les animaux transgéniques sont très souvent difficiles et coûteux à obtenir. De plus, ces animaux ne sont pas forcément viables en fonction du gène invalidé. Lorsqu'ils sont viables, ils peuvent aussi développer un processus adaptatif à la manipulation génétique, pouvant masquer ou modifier certains des paramètres étudiés.

a) Etude de la régulation de l'expression d'un gène d'intérêt

En fonction de la nature du ou des plasmides utilisés, différentes applications physiologiques peuvent être envisagées. L'utilisation d'un plasmide rapporteur d'activité transcriptionnelle permet d'étudier la régulation de l'expression d'un gène d'intérêt. Dans ce cas, le promoteur d'intérêt dirige l'expression d'une protéine rapportrice généralement la β -galactosidase, la luciférase ou la protéine fluorescente verte (GFP). Ces protéines rapportrices sont absentes du génome du type cellulaire étudié et sont facilement détectables par des techniques biochimiques (histochimie, immunohistochimie, bioluminescence, spectrophotométrie, fluorimétrie). Le promoteur peut être utilisé sous une forme sauvage, mutée ou tronquée, permettant alors de déterminer les séquences régulatrices de l'activité transcriptionnelle de ce promoteur en mesurant l'activité des protéines rapportrices. Le promoteur du gène codant pour une protéine découplante de la membrane interne mitochondriale (uncoupling protéine 3) a été ainsi caractérisé (Riquet, Rodriguez *et al.* 2003). Les effets de certaines molécules sur la régulation de l'expression génique peuvent également être étudiées. Par exemple, l'effet d'un inhibiteur de la calcineurine sur la régulation de l'expression des chaînes lourdes des myosines a été déterminé (Serrano, Murgia *et al.* 2001). L'activité neurone-dépendante et type-dépendante du promoteur de l'aldolase A humaine, spécifique du muscle, a également été étudiée par électrotransfert de gènes (Bertrand, Ngo-Muller *et al.* 2003).

L'électrotransfert est en particulier utilisé en biologie du développement chez les vertébrés (Inoue et Krumlauf 2001). Saito *et al.* ont par exemple réalisé un électrotransfert dans le cerveau d'embryons de souris *in utero* et *ex utero* (Saito et Nakatsuji 2001) : ils ont observé l'expression de la GFP dans différentes régions ciblées du cerveau et ont visualisé la morphologie de neurones.

L'électrotransfert peut aussi être un outil efficace pour la mise au point de systèmes de régulation, comme le système à la tétracycline (voir chapitre III.E.1. de cette introduction) qui nécessite la co-transfection d'au moins deux plasmides au sein d'une même cellule. Par exemple, Lamartina *et al.* ont étudié par électrotransfert l'activité de nouveaux transactivateurs sensibles à la doxycycline dans un système de régulation (Lamartina, Roscilli *et al.* 2002). Ils ont également étudié par électrotransfert l'efficacité d'un système de

régulation de l'expression de gènes composés de trois plasmides utilisant le système répressif à la tétracycline combinée à une stratégie antisens (Trollet, Ibañez-Ruiz *et al.* 2004).

b) Etude de la fonction d'un gène/d'une protéine

L'utilisation d'un plasmide d'expression permet d'étudier les effets aigus de la surexpression d'une protéine dont on veut déterminer l'action biologique. Dans ce cas, un promoteur constitutif fort (CMV, RSV, SV40) ou conditionnel (tissus spécifiques) dirige l'expression de la protéine d'intérêt. Elle peut être exprimée sous sa forme sauvage ou génétiquement modifiée (formes dominantes positive ou négative). La surexpression d'une forme dominante positive de la protéine Akt, a été utilisée pour mettre en évidence son rôle dans l'hypertrophie musculaire (Bodine, Stitt *et al.* 2001). De façon similaire, l'utilisation de l'électrotransfert de gènes pour sur-exprimer le facteur de transcription myogénine a permis de mettre en évidence *in vivo* son implication dans la régulation du typage des fibres musculaires (Ekmark, Gronevik *et al.* 2003). Enfin, la sur-expression par électrotransfert du gène d'un transporteur d'acides gras (plasma membrane-associated fatty acid binding protein) dans le muscle strié squelettique a permis d'améliorer le transport et le métabolisme des acides gras dans ce tissu (Clarke, Miskovic *et al.* 2004). Cette approche peut aussi être utilisée dans des conditions physiologiques particulières, par exemple sous l'effet d'une contrainte. Ainsi, la surexpression par électrotransfert de gènes codant pour deux protéines anti-atrophiantes (IGF- et sonic hedgehog) a permis de limiter l'atrophie musculaire induite lors d'une expérience d'hypokynésie-hypodynamique (Alzghoul, Gerrard *et al.* 2004). Dans une autre étude, l'électrotransfert a été utilisé pour identifier la fonction d'un gène d'une voie de signalisation dans une étude de régénération de nageoire en l'invalisant chez des embryons de zebrafish (Tawk, Tuil *et al.* 2002).

Enfin, il est également possible de combiner les deux approches précédentes pour étudier les effets de l'expression d'une protéine d'intérêt sur l'activité transcriptionnelle d'un promoteur d'intérêt. Dans ce cas, les deux plasmides sont introduits simultanément lors de l'électrotransfert de gènes. Ce type de « cascade » d'expression génique a été utilisé pour étudier la régulation de la transactivation du promoteur B de l'utrophine (protéine endogène présentant des domaines fonctionnels identiques à la dystrophine) *in vivo* chez des souris saines ou *mdx* (Briguet, Bleckmann *et al.* 2003). Une autre approche originale a consisté à transfecter le gène codant pour la protéine PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), l'administration orale de son co-activateur conduisant au déclenchement de la transactivation de gènes rapporteurs d'activités transcriptionnelle (Darteil, Wang *et al.* 2002).

Récemment il a été démontré qu'un ARN double brin pouvait être introduit efficacement par électrotransfert *in vivo* dans différents tissus, tels que l'embryon de poulet (Pekarik, Bourikas *et al.* 2003; Rao, Baraban *et al.* 2004), le cerveau de rat (Konishi, Stegmuller *et al.* 2004), le muscle de souris (Kishida, Asada *et al.* 2004; Golzio, Mazzolini *et al.* 2005) ou la rétine (Matsuda et Cepko 2004), conduisant au mécanisme d'ARN interférence.

Ces deux approches, transfert d'un ADN plasmidique ou d'un ARN double brin par électrotransfert *in vivo*, sont deux méthodes complémentaires et utiles pour l'analyse de fonction de gènes. En effet deux stratégies sont couramment utilisées pour étudier la fonction d'un gène *in vivo* : l'analyse du gain ou de la perte de fonction. L'électrotransfert *in vivo* est un outil pour ces deux stratégies : le gain de fonction peut être obtenu en surexprimant un gène d'intérêt, alors que la perte de fonction peut être obtenue par stratégie antisens ou ARN interférence. Dans ce contexte, on peut citer par exemple, le développement de

l'électrotransfert *in ovo* chez le poulet qui permet d'introduire simplement et efficacement divers acides nucléiques dans des embryons de poulet, qui est un modèle classique pour les études de développement (Krull 2004).

L'électrotransfert de gènes est une technique de transfection simple permettant d'obtenir une efficacité de transfection supérieure à celle obtenue avec les autres méthodes non virales. Cependant, bien que l'électrochimiothérapie soit déjà utilisée et que des essais cliniques utilisant l'électrotransfert aient déjà commencé, les mécanismes de l'électrotransfert sont encore mal connus. De plus des progrès en termes de spécificité et de nombre de cellules transfectées, de régulation de l'expression, de stabilité d'expression au cours du temps et de contrôle des effets secondaires, doivent être réalisés pour permettre une application courante optimale de l'électrotransfert de gènes dans le domaine clinique chez l'homme. Ainsi une revue (Lundstrom 2003) sur les vecteurs viraux de thérapies géniques énumérait quatre points cruciaux sur lesquels des progrès peuvent être faits : améliorer les techniques de transfert de gènes pour les rendre plus efficaces, contrôler dans le temps et l'espace l'expression du gène d'intérêt, maîtriser la durée d'expression de gènes d'intérêts et s'assurer de la biosécurité de ce transfert de gènes.

L'objectif de ce travail de thèse a donc consisté à étudier, à une moindre échelle, plusieurs de ces points autour de la technique physique de transfert de gènes utilisée au laboratoire, l'électrotransfert au moyen d'une combinaison d'impulsions électroperméabilisantes (HV) et électrophorétiques (LV).

Résultats

Résultats

Le but de cette thèse est d'étudier l'électrotransfert *in vivo*. Pour cela il faut être sûr que les observations que l'on fait ne sont pas dues à des artefacts liés à un autre paramètre non correctement contrôlé. Nous avons donc, dans le cadre d'études préliminaires, regardé l'influence de deux facteurs pouvant avoir des répercussions sur le transfert et susceptibles de perturber l'étude : d'une part l'injection et d'autre part les éventuels dommages induits par l'électrotransfert. La vitesse d'injection s'est ainsi révélée être un paramètre important et cette étude a donné lieu à l'article 1 (Andre, Cournil-Henrionnet *et al.* 2006).

L'application *in vivo* de l'électrotransfert est relativement récente (Titomirov, Sukharev *et al.* 1991) et l'utilisation de la combinaison d'une impulsion de courte durée et de fort voltage (HV) suivi d'une impulsion de longue durée et de faible voltage (LV) est encore plus récente *in vivo* (Bureau, Gehl *et al.* 2000). L'utilisation au sein du laboratoire d'un nouveau type de générateur (le Cliniporator), développé dans le cadre d'un projet européen (QLK3-1999-00484), et capable de délivrer ce type de combinaisons d'impulsions, nous a donc conduits dans un premier temps à valider ce générateur. La détermination des paramètres électriques optimaux, conduisant à une haute efficacité de transfection et à des lésions tissulaires associées minimales, a ainsi été effectuée dans le cadre de la dernière phase du projet européen Cliniporator. Ces résultats, regroupés avec ceux obtenus par les autres équipes impliquées dans le projet Cliniporator, ont donné lieu à une publication commune en cours de rédaction. La validation *in vivo* de l'effet électrophorétique de l'impulsion LV a été intégrée dans l'article 2 (Satkauskas, Andre *et al.* 2005).

Dans le cadre de futures applications cliniques, un algorithme de contrôle, en temps réel, de l'impulsion perméabilisante (HV) a été développé. La validation *in vivo* de cet algorithme fait l'objet d'un autre article commun actuellement soumis et accepté à Bioelectrochemistry (voir manuscrit 1 ci après). Enfin l'étude de l'application de l'électrotransfert au traitement des tumeurs a fait l'objet de l'article 3 (Cemazar, Grosel *et al.* 2003) présenté en annexe.

Le travail de recherche bibliographique réalisé au cours de cette thèse a quant à lui donné lieu à deux revues présentées en annexe (Andre et Mir 2004; Mir, Moller *et al.* 2005).

I. Influence de l'injection sur l'électrotransfert

Tout électrotransfert commence par l'injection des acides nucléiques. Ainsi, comme mentionné dans le chapitre III.A de l'introduction bibliographique, la façon dont l'injection est réalisée peut avoir des répercussions sur la distribution du liquide et donc la répartition des cellules transfectées, et aussi sur l'efficacité de transfert, comme c'est le cas avec la méthode dite hydrodynamique qui utilise des injections intraveineuses de grands volumes à fortes vitesses. L'injection intraveineuse permet également une meilleure distribution. Cependant, du fait de la dilution du volume injecté dans tout le volume sanguin, elle nécessite d'utiliser des quantités plus importantes de la substance à injecter que l'injection locale. Dans le cadre de l'électrotransfert d'ADN il faudrait injecter des quantités très importantes de plasmide pour obtenir localement une concentration suffisante pour un bon transfert. La production de telles quantités de plasmide étant coûteuse et difficilement réalisable, nous effectuons l'électrotransfert par injection locale du plasmide.

Nous nous sommes donc attachés à étudier l'influence de l'injection locale. Les divers paramètres de ce type d'injection ont déjà fait l'objet de nombreuses études (Wolff, Williams *et al.* 1991; Davis, Whalen *et al.* 1993; Manthorpe, Cornefert-Jensen *et al.* 1993; Levy,

Barron *et al.* 1996), desquelles il ressort que, pour l'injection locale, seuls certains paramètres ont une influence :

- l'angle d'injection a une influence sur la distribution (Levy, Barron *et al.* 1996), nous réalisons donc nos injections dans le muscle dans le sens longitudinal des fibres (aiguille parallèle à l'axe principal du muscle).
- le volume doit être suffisant et adapté au tissu pour avoir une bonne distribution, il semblerait aussi que le volume puisse jouer sur l'efficacité de transfection par injection seule (Davis, Whalen *et al.* 1993). Nous avons donc préalablement optimisé les volumes utilisés pour chaque tissu, en nous basant sur les travaux précédemment réalisés dans ces divers tissus.
- la quantité d'ADN plasmidique injectée a un impacte sur le niveau d'expression, l'expression du transgène augmentant avec la quantité d'ADN injectée, jusqu'à une valeur seuil à partir de laquelle les concentrations en plasmide n'ont plus d'effet (Davis, Whalen *et al.* 1993; Manthorpe, Cornefert-Jensen *et al.* 1993; Levy, Barron *et al.* 1996). Nous avons donc utilisé des quantités fixes d'ADN (situées dans la moyenne des valeurs couramment utilisées) pour toutes nos expériences.
- enfin le type de tampon utilisé semblant aussi pouvoir jouer sur l'efficacité du transfert (Wolff, Williams *et al.* 1991; Manthorpe, Cornefert-Jensen *et al.* 1993), nous avons donc effectué tous nos transferts dans du PBS (sauf dans de rares exceptions et pour des raisons bien déterminées qui seront expliquées aux endroits appropriés de cette thèse)

A. Problématique de la distribution du volume injecté

Afin d'être sûr que les différences observées en terme de distribution des cellules transfectées n'étaient pas dues à une différence de distribution du liquide injecté, nous avons effectué des tests d'injection utilisant divers marqueurs colorés.

1. Cas du muscle tibialis cranialis

Dans le tibialis cranialis de souris C57Bl/6 anesthésiées, nous avons injecté longitudinalement 20µl de bleu trypan à 0,4% dans du PBS (tampon phosphate salin).

Le bleu trypan est un colorant vital souvent utilisé *in vitro*. C'est une molécule chargée négativement qui n'interagit pas avec les cellules sauf si la membrane est endommagée. Il est aussi utilisé comme marqueur tissulaire en chirurgie ophtalmique. Etant donnée sa taille relativement faible (voir figure 1), il permet d'avoir une idée de la distribution du liquide injecté, mais pas forcément de celle de l'ADN qui est une molécule beaucoup plus volumineuse et chargée.

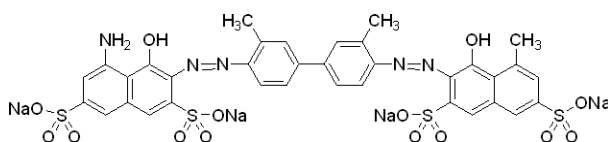


Figure 1 : Bleu trypan (poids moléculaire : 960,81 g/mol)

Comme on le voit sur la figure 2 le colorant injecté semble avoir été distribué dans la quasi-totalité du tibialis (les injections, réalisées à des jours différents, ont toutes donné des résultats similaires).



Figure 2 : Muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles anesthésiées, observés sans la peau, quelques minutes après l’injection de 20µl de bleu trypan (0,4% dans du PBS).

Cette distribution est exactement la même que celle de l’expression de la GFP (Green Fluorescent Protein) obtenue par électrotransfert dans les conditions électriques optimales, après le même type d’injection locale avec 20µl de PBS contenant 10µg de plasmide pEGFPN1 (plasmide codant pour la GFP sous contrôle du promoteur CMV) (voir figure 3).

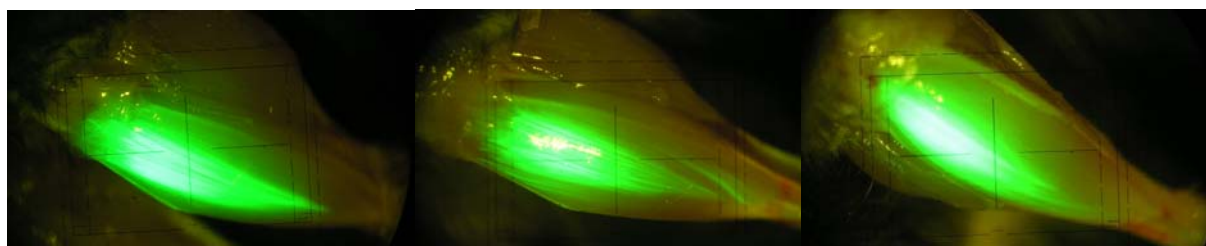


Figure 3 : Exemples de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles exprimant la GFP, observés à la loupe binoculaire à fluorescence 2 jours après l’électrotransfert (1HV 800V/cm 100µs, 1s délai, 1LV 400ms 80V/cm ; 20µl de plasmide pEGFPN1 à 0,5µg/µl dans du PBS).

On peut donc en déduire que lors des injections, le liquide, mais aussi le plasmide, sont distribués dans presque tout le muscle tibialis cranialis. Si après électrotransfert tout le muscle n’est pas transfecté, l’origine en est l’électrotransfert et non l’injection.

Ces observations macroscopiques sont à moduler par les observations faites sur des coupes de muscle au microscope par Davis *et al.* en 1993 (Davis, Whalen *et al.* 1993). En effet, il semblerait que, même si d’un point de vue macroscopique le liquide et les cellules transfectées semblent uniformément distribués dans le muscle, il existe en fait une certaine variabilité d’une injection à l’autre. Certaines injections peuvent laisser des zones non touchées et/ou le liquide peut parfois ne pas être en contact avec toutes les fibres mais plutôt dans l’espace interfasciculaire (voir figure 11 de l’introduction bibliographique de cette thèse).

Nous avons observé cette distribution incomplète au moyen de coupes histologiques avec un immuno-marquage après électrotransfert d’un plasmide codant pour la β -galactosidase (voir figure 4). En surface le muscle semble presque entièrement transfecté, alors que la coupe histologique révèle des zones non transfectées.

Cette variabilité pourrait expliquer une partie de la variabilité que nous avons observée par la suite lors des expériences quantitatives utilisant la luciférase.

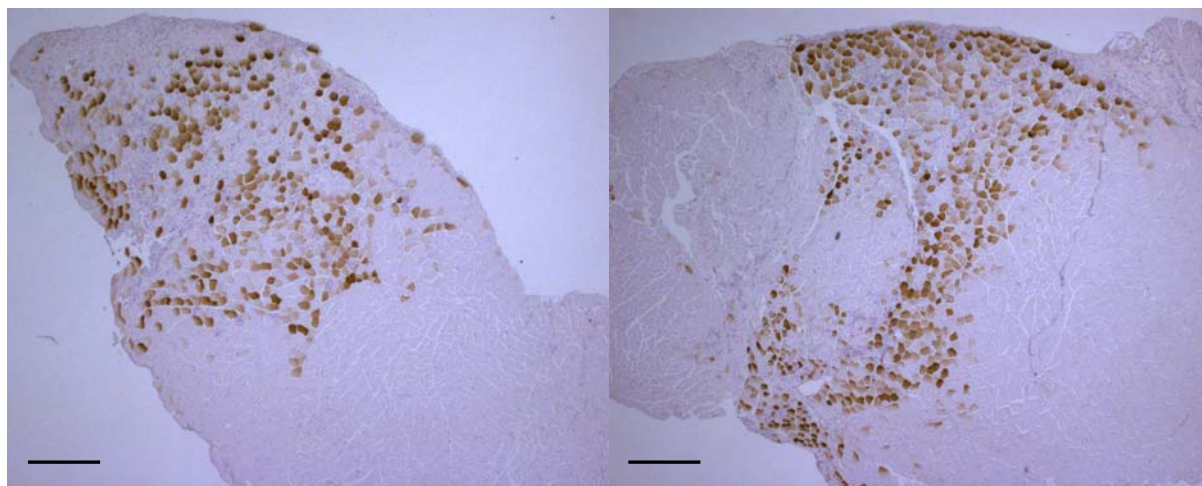


Figure 4 : Coupes immuno-histologiques de muscles tibialis de souris C57Bl/6 femelles, observés 2 jours après électrotransfert (1HV 800V/cm 100 μ s, 1s délai, 1LV 400ms 80V/cm ; 20 μ l de plasmide pCMV β à 0,5 μ g/ μ l dans du PBS). La barre d'échelle fait 350 μ m.

Il a été aussi rapporté (Levy, Barron *et al.* 1996) que le plasmide injecté dans le muscle disparaissait lentement du muscle pour se distribuer petit à petit dans l'organisme au cours du temps (plus de 98% du plasmide injecté ont disparu du site d'injection au bout de 9h). C'est pourquoi nous appliquons les impulsions électriques quelques secondes après l'injection.

La distribution du liquide injecté dans le muscle peut être améliorée en injectant de la hyaluronidase quelques minutes avant l'injection (Favre, Cherel *et al.* 2000; McMahon, Signori *et al.* 2001; Mennuni, Calvaruso *et al.* 2002). En effet une expérience test nous a permis de voir que l'utilisation de la hyaluronidase permet, à partir de la même injection de 20 μ l dans le tibialis cranialis, de distribuer le liquide injecté dans d'autres muscles de la patte de la souris, contrairement à une injection classique (voir figure 5). Cependant, l'utilisation de la hyaluronidase pouvant constituer une source d'artefacts et de variabilité supplémentaire, nous ne l'utilisons pas dans nos expériences.

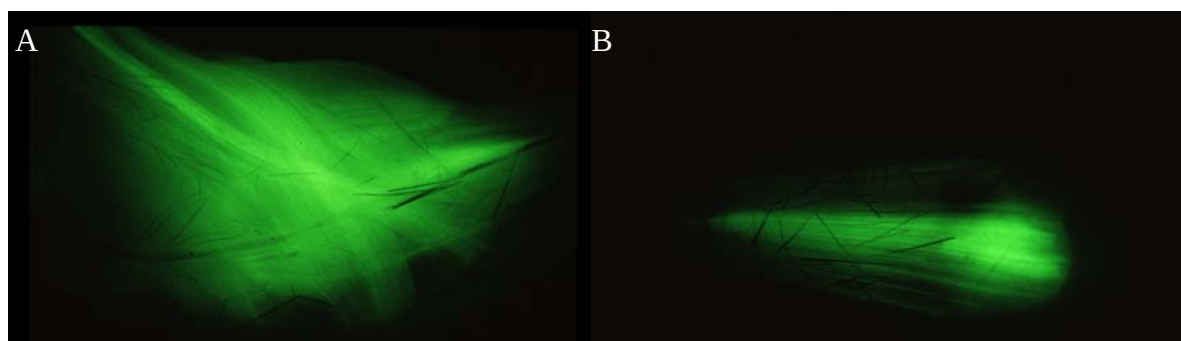


Figure 5 : Comparaison entre des muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles électrotransférés avec (A) ou sans hyaluronidase (B). Electrotransfert (1HV 800V/cm 100 μ s, 1s délai, 1LV 400ms 80V/cm) réalisé 15 minutes après injection de 20 μ l de plasmide pEGFPN1 à 0,5 μ g/ μ l dans du PBS avec ou sans hyaluronidase (10ui pour 20 μ l). Expression de la GFP observée à la loupe binoculaire à fluorescence 2 jours après électrotransfert.

2. Cas des tumeurs sous cutanées

Si pour le muscle tibialis cranialis le plasmide se distribue correctement dans tout le tissu, il n'en est pas de même pour les tumeurs. Selon les types de tumeurs le liquide injecté se distribue plus ou moins bien.

En effet nous avons réalisé la même expérience que dans le cas du muscle mais sur divers types de tumeurs et nous avons obtenu les résultats présentés dans la figure 6.

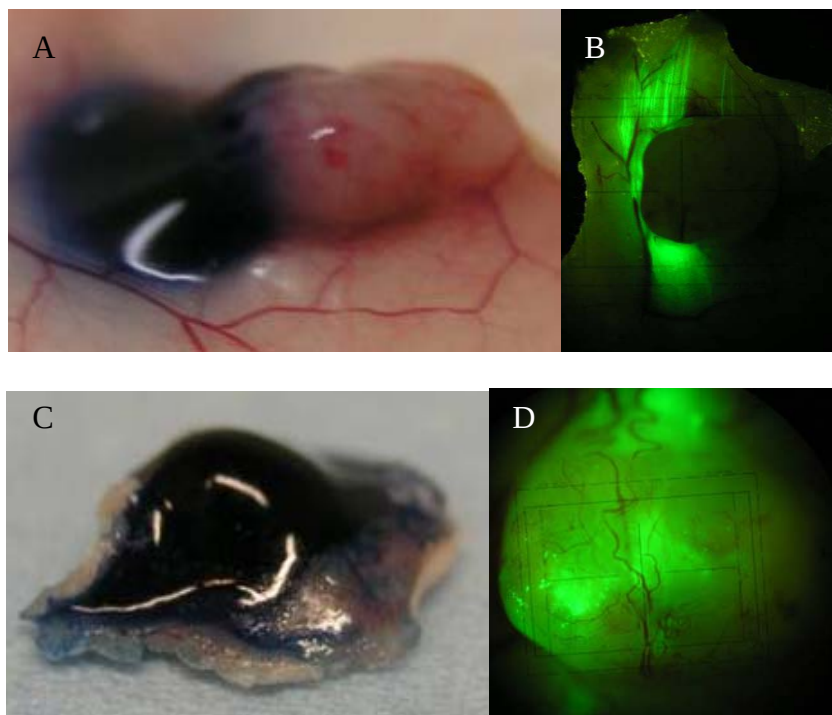


Figure 6 : Observation de la distribution du liquide injecté et de la transfection dans deux types de tumeur. Un adénocarcinome mammaire humain (tumeur MDA) (panneaux A et B) et un mélanome humain (tumeur Na11) (panneaux C et D) transplantés en sous cutané dans des souris nues. Observation de la distribution du liquide injecté dans la tumeur, quelques minutes après injection de 50 μ l de bleu trypan (0,4% dans du PBS) (panneaux A et C). Observation à la loupe binoculaire à fluorescence des zones transfectées 2 jours après électrotransfert (1HV 1000V/cm 100 μ s, 1s délai, 1LV 400ms 100V/cm ; 50 μ l de plasmide pEGFPN1 à 1 μ g/ μ l dans du PBS) (panneaux B et D).

Comme on le voit sur ces deux exemples dans certaines tumeurs, comme les Na 11, le liquide injecté semble bien se distribuer dans tout le tissu, donnant par conséquent un électrotransfert homogène de la tumeur. Mais dans d'autres types de tumeurs, comme les MDA (tumeurs plus solides et plus denses), le liquide injecté fuit toujours quasiment immédiatement en dehors de la tumeur, résultant en un transfert des cellules de la peau entourant la tumeur au lieu de la tumeur elle-même. Pourtant le volume injecté (50 μ l), les dimensions de la tumeur (6mm par 6mm) et les paramètres électriques appliqués (1HV 1000V/cm 100 μ s, 1s délai, 1LV 400ms 100V/cm) sont similaires à ceux de la Na 11. La raison de cette différence de comportement semble être la différence de densité/porosité des différents types de tumeurs. Ainsi, si certaines tumeurs comme les MDA sont difficiles à électrotransférer, ce n'est pas à cause de l'électrotransfert en lui-même mais à cause de l'injection. Dans les divers travaux réalisés sur les tumeurs nous avons donc toujours veillé à utiliser des tumeurs qui s'injectent convenablement.

De manière un peu plus approfondie, l'injection dans les tumeurs de lucifer yellow (un fluorophore jaune non perméant), permet de voir qu'au sein même de la tumeur la distribution du liquide n'est pas non plus homogène, même pour les tumeurs s'injectant relativement bien comme le mélanome B16F10 (figure 7). Le choix d'un fluorophore jaune se justifie par la couleur noire du mélanome B16F10 qui empêche la visualisation du bleu trypan.

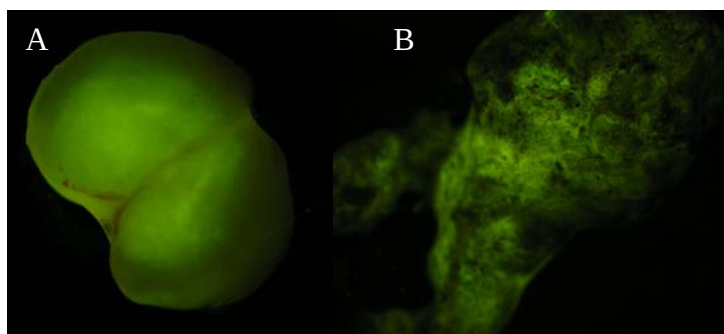


Figure 7 : Mélanome humain (tumeur 1205 L-U) (panneau A) et mélanome murin (tumeur B16F10) (panneau B) observés à la loupe binoculaire à fluorescence quelques minutes après injection avec 50µl de lucifer yellow (2mM dans PBS).

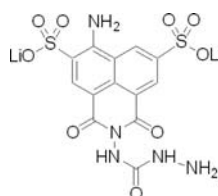


Figure 8 : lucifer yellow, poids moléculaire 457,25 g/mol

Comme pour le bleu trypan, le lucifer yellow est une molécule de petite taille (voir figure 8), il permet donc lui aussi d'avoir une idée de la distribution du liquide injecté, mais pas forcément de l'ADN.

Cependant ces hétérogénéités dans la distribution du liquide injecté sont également observées dans la répartition des zones transfectées (figure 9). On peut donc en déduire que lors des injections dans les tumeurs, le liquide et le plasmide sont distribués de manière hétérogène, ce qui explique l'hétérogénéité des zones transfectées.

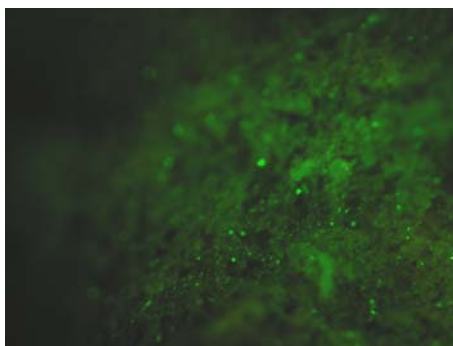


Figure 9 : Mélanomes B16F10 électrotransfectés avec 50µl de pEGFPN1, observé à la loupe binoculaire à fluorescence deux jours après électrotransfert (1HV 1000V/cm 100µs, 1s délai, 1LV 400ms 100V/cm ; 50µl de plasmide pEGFPN1 à 1µg/µl dans du PBS).

3. Cas du foie

Pour l'étude de l'électrotransfert dans le foie, des injections locales ou intraveineuses ont été utilisées.

Par injection intraveineuse : on obtient une très bonne diffusion homogène dans tout le foie (voir figure 11) du marqueur fluorescent injecté (iodure de propidium, voir figure 10). En injection locale il faut clamper la partie supérieure du lobe injecté pour éviter un drainage quasi immédiat de la solution injectée. Lors de l'injection locale avec clamp, le lobe gonfle et blanchit presque totalement au cours de l'injection (250 μ l) (voir figure 12), cet état dure tant que le clamp est maintenu, dès que celui ci est retiré, le sang afflux de nouveau dans le foie et ce dernier reprend sa couleur d'origine.

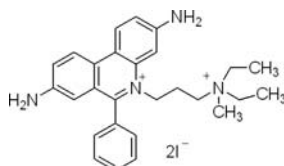


Figure 10 : Iodure de propidium, poids moléculaire : 668,39 g/mol.



Figure 11 : Lobe de foie de souris C57Bl/6 femelle, observé à la loupe binoculaire à fluorescence, sans injection (A) et quelques minutes après injection (B) d'iodure de propidium en intraveineux (2mM dans 100 μ l).

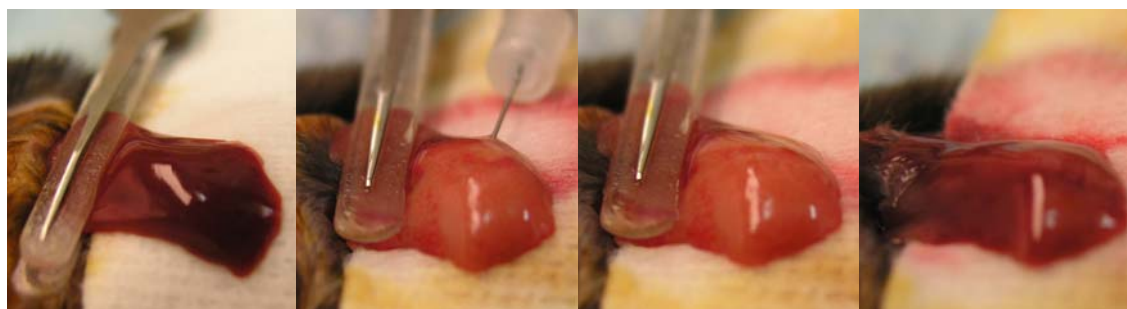


Figure 12 : Gonflement et blanchiment du lobe de foie observé lors de l'injection locale de 250 μ l de PBS.

Ces observations laissent supposer une bonne distribution du liquide et donc du plasmide, ce qui est confirmé par la distribution des cellules transfectées en GFP aussi bien pour l'injection locale que pour l'injection intraveineuse (voir figure 13).

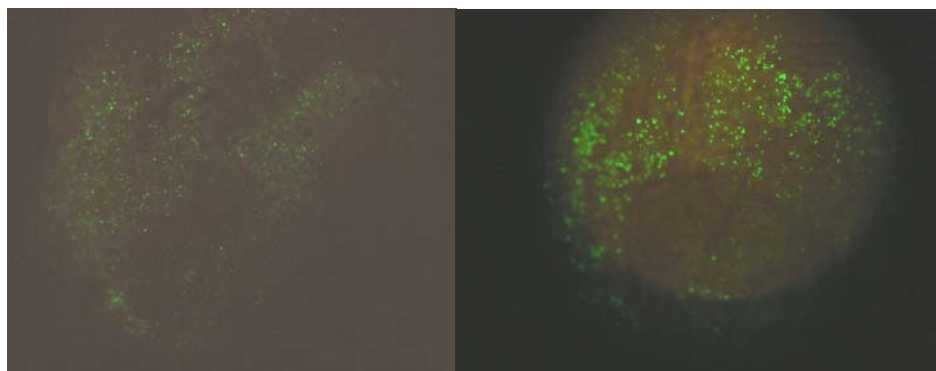


Figure 13 : Distribution des cellules électrotransfectées après injection du plasmide en intraveineux (A) ou en locale (B).

Article 1 :
Influence de la vitesse d'injection.

B. Influence de la vitesse d'injection (Article 1)

Les différentes études publiées auparavant sur l'impact de la vitesse d'injection sur le transfert par injection locale seule, ayant toutes conclu à l'absence d'effet, nous n'avions pas tenu compte de la vitesse d'injection lors de nos premières expériences. Cependant au cours d'une expérience d'électrotransfert sur le muscle tibialis cranialis de souris, les témoins comportant l'injection du plasmide sans impulsion électrique ont donné des valeurs de transfection anormalement élevées, relativement identiques à celles des muscles électrotransférés (voir figure 14).

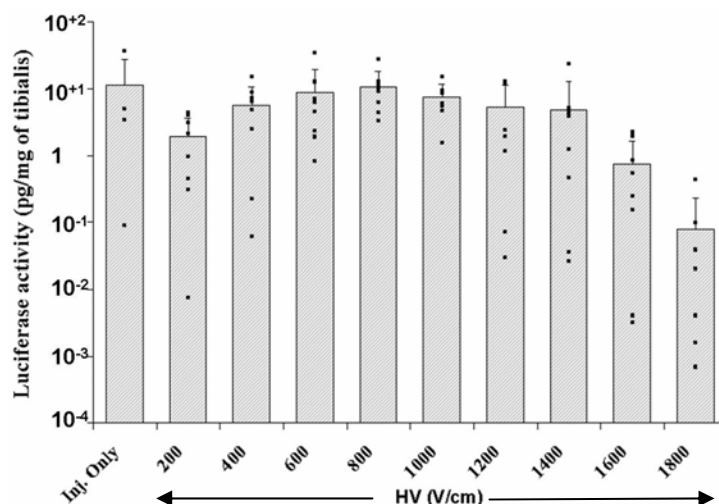


Figure 14 : Activité de la luciférase mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles (1HV 100µs, 0s délai, 1LV 400ms 80V/cm ; 20µl de plasmide pCMVLuc 0,5µg/µl dans du PBS).

Divers paramètres susceptibles d'expliquer ce résultat ont alors été testés (figure 15).

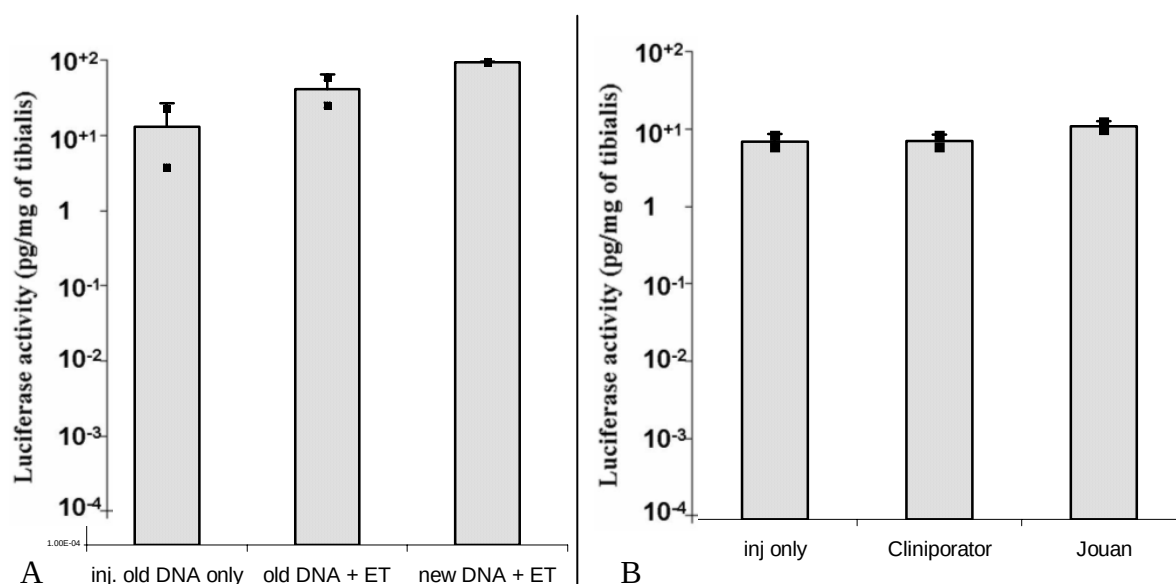


Figure 15 : Activité de la luciférase mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert (ET) de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles (1HV 800V/cm 100µs, 0s délai, 1LV 400ms 80V/cm ; 20µl de plasmide pCMVLuc 0,5µg/µl dans du PBS). (A) : comparaison entre une nouvelle préparation de plasmide (new) et l'ancienne (old) (n=2) ; (B) : comparaison entre le Cliniporator et un générateur de trains d'impulsions carrées (Jouan ; 8x200V/cm 20ms) (n=2).

Même si quelques différences ont été observées, les témoins sont restés très efficaces. La vitesse d'injection a alors été testée (figure 16).

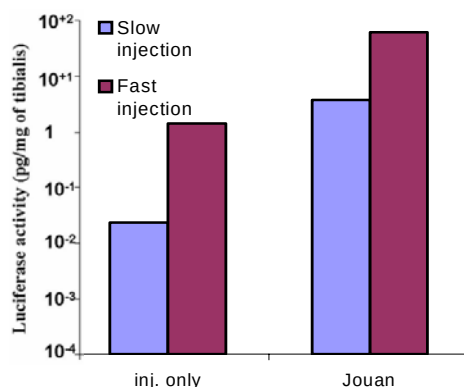


Figure 16 : Activité de la luciférase en fonction de la vitesse d'injection. Activité mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles (Jouan ; 8x200V/cm 20ms ; 20µl de plasmide pCMVLuc 0,5µg/µl dans du PBS).

A la vue du résultat de cette expérience préliminaire, nous avons décidé d'explorer de manière plus approfondie l'influence de la vitesse d'injection ainsi que les possibles mécanismes impliqués. C'est l'objet de l'article 1 de cette thèse.

La vitesse d'injection s'étant révélée avoir une influence sur l'efficacité de transfert dans divers tissus. Pour toutes les expériences suivantes étudiant l'électrotransfert nous avons maintenu la vitesse d'injection constante et lente afin de diminuer la variabilité et d'être sûrs d'étudier l'électrotransfert et non les conséquences d'éventuels effets hydrodynamiques.

ORIGINAL ARTICLE

Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed

FM André^{1,2}, C Cournil-Henrionnet^{1,2,3}, D Vernerey⁴, P Opolon^{1,2} and LM Mir^{1,2}

¹CNRS, UMR 8121, Laboratory of Vectorology and Gene Transfer, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France; ²Univ Paris-Sud, UMR 8121, Laboratory of Vectorology and Gene Transfer, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France; ³UMR7561 CNRS, Université de Nancy I, Vandœuvre Lès Nancy, France and ⁴Biostatistics and Epidemiology Unit, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France

The simple injection of DNA into muscles is known to result in the expression of the injected genes, even though at low and variable levels. We report that this variability in DNA expression is partly dependent on the injection speed. The acceleration of the injection speed from values around 2 $\mu\text{l/s}$ up to ones around 25 $\mu\text{l/s}$ (depending on the tissue) results in a significant increase in gene expression in skeletal muscle (280 times on an average) and in liver (50 times) and a nonsignificant sevenfold increase in tumors. Heparin, which inhibits the spontaneous uptake of the injected DNA, also inhibits the increases related to the injection speed. However, at the highest injection speed, this inhibition is not total

because very fast injections provoke a direct permeabilization of the cells. This 'hydroporation' could be similar to the permeabilization found in the hydrodynamics method based on the fast intravascular injection of a huge volume of DNA. Neither the 'hydroporation' nor the heparin-inhibitable uptake mechanism induces histologically detectable lesions. There is a limited muscle cell stress independent of the injection speed. Heterogeneity in the injection speed might thus be an explanation for the variability in DNA expression after simple injection.

Gene Therapy advance online publication, 27 July 2006;
doi:10.1038/sj.gt.3302827

Keywords: non-viral gene therapy; muscle; liver; tumor; endocytosis; hydroporation

Introduction

Non-viral gene therapy approaches are being actively investigated. It has been proved that the simple injection of DNA into skeletal muscle can result in the expression of the injected gene, although at very low and variable levels.¹ The crucial point that limited the use of this very simple procedure was the extreme variability of gene expression following DNA injection. Until now, the reasons for this variability have remained unsolved. The solution to this problem has been to find other methods for *in vivo* transfection, which would display a reduced variability as well as, of course, a greater efficacy, if possible. Physical methods to facilitate DNA uptake by the means of transient perturbations of the plasma membrane structure have been successfully developed, using ballistics,² ultrasounds^{3,4} or electric pulses.^{5,6} Hydrostatic pressure also facilitates DNA uptake. The hydrodynamics-based method for *in vivo* DNA transfer^{7,8} has been applied to mice and rats to transfer efficiently to their liver various genes.^{9–11}

The direct injection of DNA into the tissue is the easiest procedure, although unfortunately limited to a low and variable level of the foreign gene expression. The problem of the low expression can be solved either

by increasing the amount of DNA injected into the same muscle or into several muscles, or by improving the expression of the injected constructs, but variability is a particularly severe drawback. Indeed, variability prevents any reasonable use of the direct injection of DNA. We analyzed the influence of the injection speed on the level of spontaneous naked DNA uptake and expression in the skeletal muscle, the liver and one tumor type. Contrary to previous reports,^{12,13} we found a statistically significant influence of the injection speed on the efficacy of the gene transfer: the increase in the intratissular injection speed resulted in a moderate increase in the expression of the luciferase reporter gene in tumor and liver (seven and 50 times, respectively) or even in a large increase (between 95 and 2260 times) in the skeletal muscle. In the light of these observations, we analyzed the mechanisms of the *in vivo* spontaneous naked DNA in these tissues. Our experiments revealed that the injection procedure itself is one of the reasons for the variability of the naked DNA injection in *in vivo* tissues.

Results

Local injection of pCMVLuc plasmid in muscle at various speeds

In the figures, the values reported for the 'no injection' control muscles were close to luminometer background values, without any biological meaning. In all cases, the injection of DNA resulted in a significant luciferase gene expression.

Correspondence: Dr LM Mir, Laboratory of Vectorology and Gene Transfer, UMR 8121 CNRS, Institut Gustave-Roussy, Université Paris XI, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif Cédex, France.

E-mail: luismir@igr.fr

Received 7 March 2006; revised 7 June 2006; accepted 7 June 2006

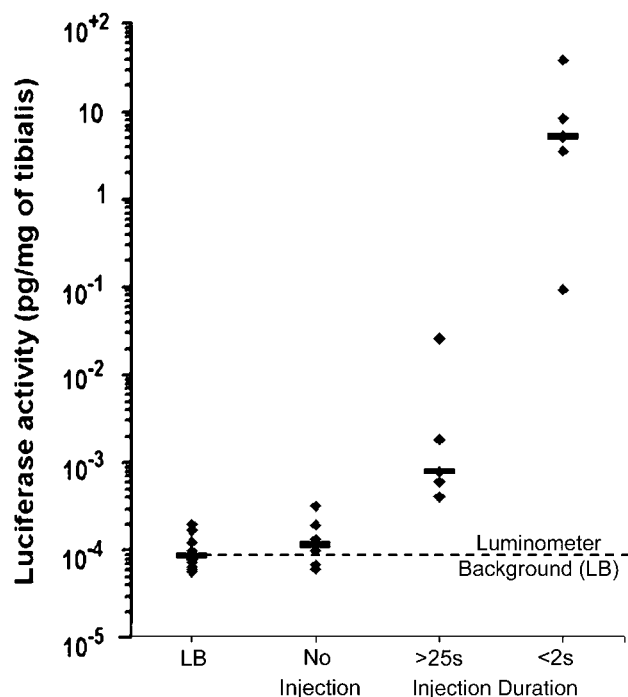


Figure 1 Efficacy of luciferase gene transfer in C57BL/6 mice *tibialis cranialis* muscles as a function of the injection speed. Injections of 10 μ g of pCMVLuc plasmid in 20 μ l of PBS were performed at 25 s or longer injection durations (slow injections), or at 1–2 s injection durations (fast injections). Each closed dot represents one *tibialis* injected with 20 μ l of DNA only. The horizontal bars represent the medians ($n=5$ per experimental condition). The fast injections resulted in a luciferase expression significantly higher than the slow injections ($P<0.01$; Mann–Whitney non-parametric test).

First, we injected the *tibialis cranialis* of C57BL/6 mice with 10 μ g of pCMVLuc plasmid in 20 μ l of phosphate-buffered saline (PBS) at two very different injection durations: one at about 25 s and another at about 1–2 s (Figure 1). When DNA was injected very slowly, we detected a low luciferase activity (on average: 1.5×10^{-3} pg/mg of *tibialis*, $n=5$), which contrasted with the much higher luciferase activity (on average: 3.4 pg/mg, $n=5$, that is 2260 times more) using the rapid injections (Figure 1). The difference was highly significant ($P<0.001$; Student's *t*-test as the logarithms of the data of the two groups had the same variance).

A large experiment was then performed at three different speeds for the injection of either DNA alone or a mixture of DNA and heparin (Figure 2). A two-way analysis of variance (ANOVA) on all the data (with and without heparin) showed that there is a significant effect of the injection speed ($P<0.001$) and of heparin addition ($P<0.001$) as well as of the combination of the speed and heparin addition ($P<0.001$). This means that the effect of the speed is not the same if heparin is added or not. When only DNA was injected very slowly, that is, in 25 s, we detected again a low luciferase activity (on average 3.0×10^{-3} pg/mg of *tibialis*, which is about 30 times above the background level and the 'no injection' level). We observed that the decrease of the injection duration from 25 to 5 s resulted in an increase by more than 13 times in luciferase expression, and that a subsequent reduction to 1 s resulted in an additional gain up to

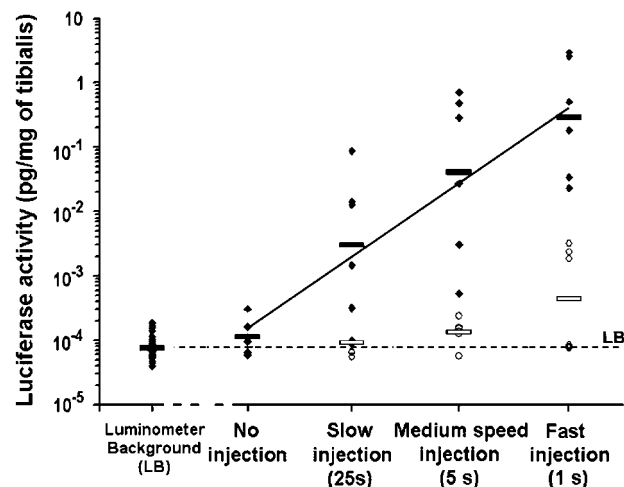


Figure 2 Efficacy of luciferase gene transfer in C57BL/6 mice *tibialis cranialis* muscles as a function of the injection speed, in the presence and in the absence of heparin. Injections of 10 μ g of pCMVLuc plasmid in 20 μ l of PBS were performed at 0.8 μ l/s (slow injections in 25 s), 4 μ l/s (medium speed injections in 5 s) and 20 μ l/s (fast injections in 1 s). Each closed dot represents one *tibialis* injected with 20 μ l of DNA only, whereas open symbols represent *tibialis* injected with 20 μ l of DNA and heparin at 180 IU/ml ($n=6$ per experimental condition). The horizontal bars represent the means. The effects of the injection speed and of heparin addition as well as of the combination of the speed and heparin addition are significant ($P<0.001$; two-way ANOVA).

seven times on the average. To further evaluate the significance of these effects, we performed a one-way ANOVA on the data without heparin ($P<0.001$), followed by a linear regression. The slope of this linear regression was positive and significantly different from zero ($P<0.001$). Therefore, increasing the speed of injection leads to an enhancement of the transfection efficacy in muscle.

We also performed a one-way ANOVA on the values with heparin, and we obtained a P -value equal to 0.08. We first concluded that there were no significant differences between the various speeds of injection when heparin is added. Nevertheless, because the P -value was close to 0.05, we performed a linear regression. Its slope was positive and significantly different from zero ($P<0.05$), suggesting that not all the groups were alike. Figure 2 shows that the positive slope is mainly owing to the three higher values of the 1 s group. Indeed, with heparin, there is no effect of the injection speed on the transfection efficiency at 25 s or at 5 s injection duration as heparin completely blocked DNA uptake and luciferase expression at these injection speeds (values similar to luminometer background). However, at 1 s, heparin could not completely block the transfection.

Membrane permeabilization caused by the high-speed local injections

To understand the reasons of the incomplete heparin inhibition with 1 s injections, we injected 20 μ l of propidium iodide (PI) at fast and slow speeds in the *tibialis cranialis* skeletal muscle. All four muscles injected with PI in 1 to 2 s became fluorescent in less than 10 min after the injection (Figure 3a), whereas muscles injected

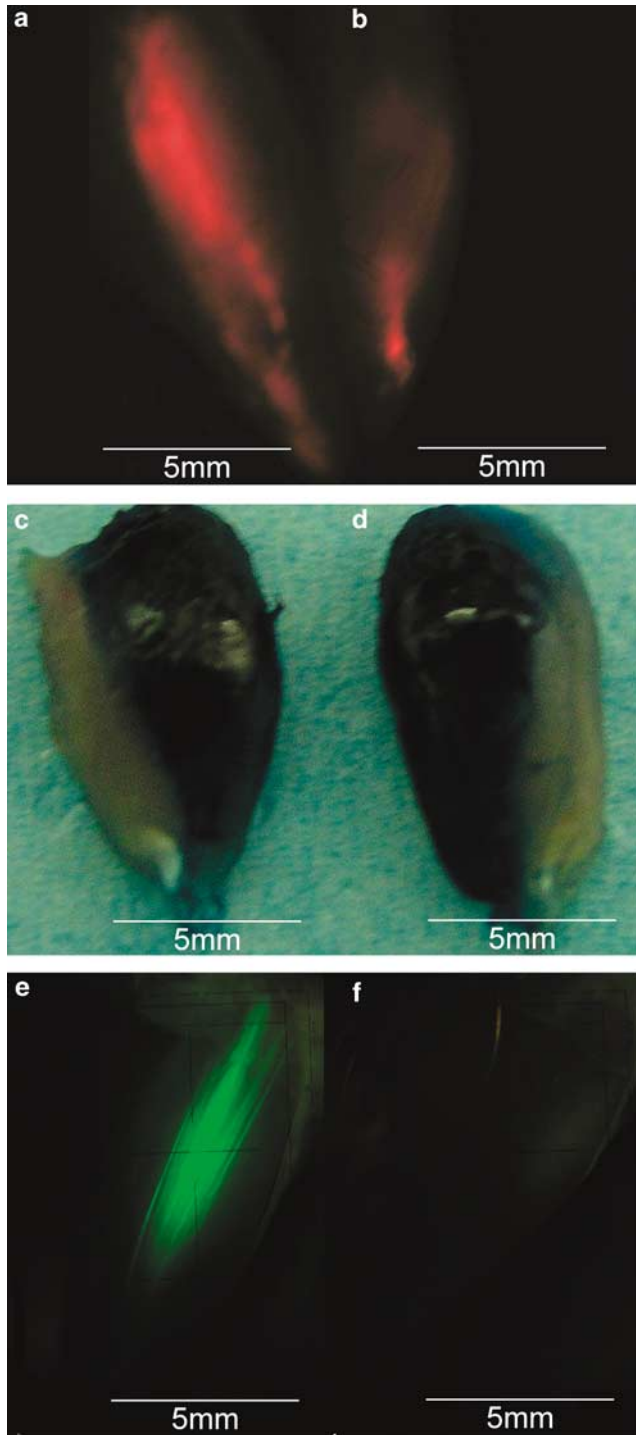


Figure 3 Evaluation of fibers permeabilization using fluorescence stereomicroscopy of PI injected in the mouse *tibialis cranialis* muscle (a, b), volume of distribution of the injected fluid using Evans Blue (c, d) and fluorescence stereomicroscopy of GFP-transfected *tibialis cranialis* muscles (e, f) after injections of 20 μl at fast speed (2 s, 10 $\mu\text{l/s}$; a, c, e) and slow speed (25 s, 0.8 $\mu\text{l/s}$; b, d, f). PI fluorescence and Evans Blue distribution were assessed a few minutes after the injection. GFP expression was assessed 2 days after injection. The examples displayed are representative of four muscles treated under each of the reported conditions.

in about 25 s barely displayed any fluorescence (Figure 3b). As *in vitro* PI is a classical marker to determine membrane permeability, these data suggest that high-

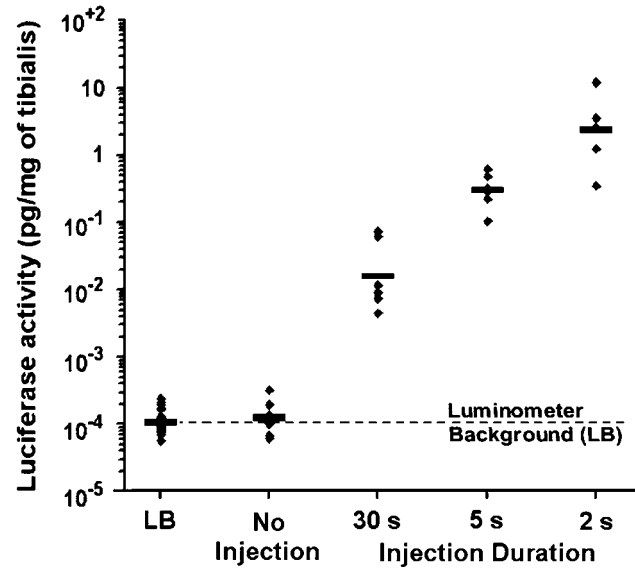


Figure 4 Efficacy of luciferase gene transfer in C57BL/6 mice *tibialis cranialis* muscles as a function of the speed of large volume (50 μl) injections. Injections of 25 μg of pCMVLuc plasmid in 50 μl of 0.9% NaCl were performed at various injection speeds: 1.6 $\mu\text{l/s}$ (injection in 30 s), 10 $\mu\text{l/s}$ (injection in 5 s) and 25 $\mu\text{l/s}$ (injection in 2 s). Each closed dot represents one *tibialis* muscle injected with 50 μl of DNA ($n=6$). The horizontal bars represent the means. The effect of the injection speed on the luciferase activity level obtained is significant ($P<0.001$; one-way ANOVA).

speed local injections actually provoke membrane permeabilization.

Effect of injection speed on fluid distribution and fibers' transfection in muscle

We also studied the effect of the injection speed on the fluid distribution within the muscle using 20 μl of the Evans Blue marker. Evans Blue was used to visualize the distribution of the liquid in the tissue, and not fiber permeabilization nor transfection. No difference in the distribution of the Evans Blue in the muscle was observed between muscles injected in 2 s (Figure 3c) and muscles injected in 25 s (Figure 3d).

Finally, using the same experimental conditions but the plasmid coding for the green fluorescent protein (GFP), we found a large difference in the fluorescence emitted by the muscles injected using either fast or slow injections. This clear difference, which is in full agreement with the luciferase data, can be observed in two representative examples of muscles injected with 20 μl of DNA in 2 s (fast injection; Figure 3e) or in 25 s (slow injection; Figure 3f).

Large volume injections into muscles

We reproduced the experiments using the volume conditions used by Manthorpe *et al.*¹² (Figure 4). We thus injected the pCMVLuc plasmid at the same concentration (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in 50 μl instead of the previous 20 μl . We obtained again a significant luciferase gene expression. When DNA was injected very slowly (in 30 s), luciferase activity was higher than the luciferase activity measured using the same injection duration (30 s) but a lower volume (20 μl) (on average five times more, 1.5×10^{-2} pg/mg of *tibialis* instead of

3.0×10^{-3} pg/mg; Figures 2 and 4) may be owing to the fact that more DNA was injected ($25 \mu\text{g}$ instead of $10 \mu\text{g}$). As in the previous experiment, the decrease in injection duration from 30 to 5 s resulted in a 19-fold increase in luciferase expression, and a further reduction to 2 s resulted in an eightfold supplementary gain. The one-way ANOVA showed again that there is a significant effect of the injection speed on the luciferase activity level obtained ($P < 0.001$). The slope of the linear regression was positive and significantly different from zero ($P < 0.001$). This confirms that the increase in the injection speed significantly improves the efficacy of transfection in muscle, even if large volumes are injected.

No potential damages after high-speed injection

We performed histological analysis and evaluation of the stress proteins induction to detect potential tissue perturbations. Fixed and stained muscles taken 2 days after the DNA transfer showed neither an alteration of muscle structure nor any sign of an inflammatory reaction owing to the rapid injection (Figure 5). The only tissue reaction that we could detect was found at the site

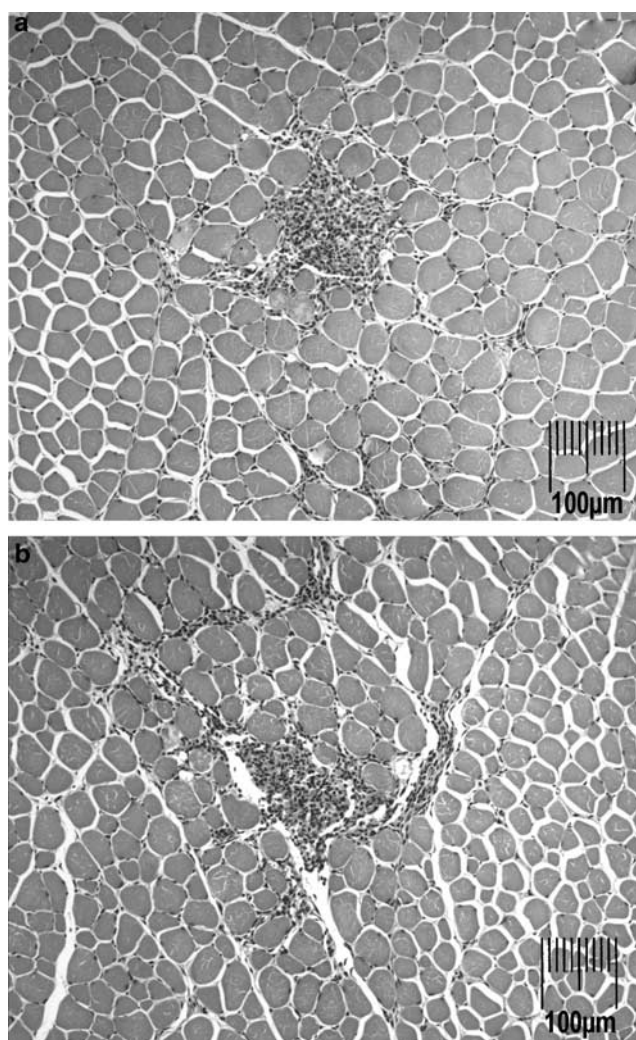


Figure 5 Inflammatory reaction along the injection tract revealed after HES staining of muscles 2 days after injection in 2 s ($10 \mu\text{l/s}$) (a) or in 25 s ($0.8 \mu\text{l/s}$) (b).

of the injection and it resulted from the insertion of the needle used to inject the DNA. Still, these modifications (inflammatory infiltration) were very limited and we observed no difference between muscles injected in 25 s or in 1 s (Figure 5).

The levels of heat-shock protein 70 (Hsp70) expression are related to the levels of cell stress.¹⁴ In particular, the analysis of the HSPs has already been used to evaluate the stress of cells exposed to various transfection methods.¹⁵ The potential induction of the expression of the *Hsp70* gene in the *tibialis* muscle was examined 2, 4, 24, 48 and 72 h after slow (25 s), medium (5 s) or fast (1 s) direct DNA injection. This analysis revealed *Hsp70* expression levels identical to those of the control non-injected muscles, at any time and at any injection speed, except at 24 h after the injections. At this time, we detected a light but significant increase, independent of the injection speed (Mann–Whitney test versus control, $P < 0.05$ whatever the injection speed) (data not shown). Thus, the speed of injection itself does not seem to induce a significant stress of the muscle fibers.

Influence of the injection speed in luciferase expression in tumor and liver

As a general rule, the levels of luminescence for the 'no injection' control tissues were below the detection level of the luminometer. For both, the tumor and the liver, the Kruskal–Wallis tests were significant and allowed us to use a Mann–Whitney test as a post-analysis.

The influence of the injection speed in tumors (Figure 6a) is reduced compared to the influence observed in the

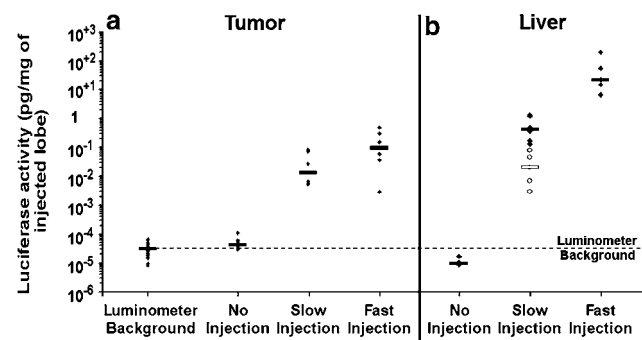


Figure 6 Luciferase expression in tumors and in the liver as a function of the injection speed. (a) Luciferase expression in tumors after injection of $50 \mu\text{g}$ of pCMVLuc plasmid in $50 \mu\text{l}$ of PBS either in 25 s (slow injections at $2 \mu\text{l/s}$) or in 2 s (fast injections at $25 \mu\text{l/s}$). Medians are represented instead of means since a non-parametric test was used. Each point corresponds to one tumor ($n=6$). (b) Luciferase expression in the liver as a function of the injection speed, with or without heparin. Livers were injected with $50 \mu\text{g}$ of pCMVLuc plasmid (in $250 \mu\text{l}$ of PBS) either in 55 s (slow injections at $4.5 \mu\text{l/s}$) or in 15 s (fast injections at $17 \mu\text{l/s}$). The fast injections of DNA and heparin resulted in hemorrhage through the injection track, with increased mouse mortality; for ethical reasons, this group was removed from the initial experimental plan. Each point corresponds to one lobe of the liver ($n=6$ per experimental condition without heparin and $n=5$ with heparin). Closed symbols represent lobes injected with DNA only, whereas open symbols represent lobes injected with a mix of DNA and heparin (400 IU/ml). Medians are represented instead of means as a non-parametric test was used. Differences between slow and fast injections and between slow injections with or without heparin were significant ($P < 0.05$; Mann–Whitney test with Bonferroni's correction for multiple comparisons).

case of the muscle. The increase in efficacy reached only a non-significant sevenfold factor (Mann–Whitney test, $P=0.2$) between the slow (25 s) and the fast (2 s) injections.

In the liver, we observed a 50-fold significant increase in the efficacy of DNA transfer between slow and fast injections ($P<0.05$; Mann–Whitney test with Bonferroni's correction for multiple comparisons) (Figure 6b). In the liver, heparin caused hemorrhage that could only be contained in the case of the slow injections. Heparin addition resulted in a significant 20-fold decrease ($P<0.05$; Mann–Whitney test with Bonferroni's correction for multiple comparisons) of the level of luciferase expression (Figure 6b), but this decrease was not complete, indicating that two uptake mechanisms are also involved in the liver, even in the case of the slow injections.

We performed all the experiments reported here above using different batches of DNA and similar results were always obtained, discarding the possibility that an eventual contaminant in the DNA solution could have been responsible for the observed effects (data not shown).

Discussion

The study reported here was motivated by the fact that, in some of our previous experiments dealing with plasmid transfection in muscle, part of the variability of DNA transfer and expression seemed to be linked to the speed at which we locally injected the DNA. Thus, we decided to systematically analyze the influence of the injection speed in the muscle as well as in the liver and one transplanted tumor.

In the *tibialis cranialis*, we injected 20 μ l because it is an adequate volume with respect to the muscle volume and does not cause histological damages. We found that when accelerating the injection speed in the skeletal muscle from 0.8 μ l/s on the average (slow injection: 20 μ l in 25 s) to 20 μ l/s (fast injection: 20 μ l in 1 s), the expression of the injected gene increased by about 280 times (range: 100 to >2000 times depending on the experiments). In tumors, the acceleration of the injection speed up to 25 μ l/s (50 μ l in 2 s) resulted in a nonsignificant sevenfold increase (Mann–Whitney test, $P=0.2$), whereas in the liver, an acceleration of up to 17 μ l/s (250 μ l in 15 s) induced a significant 50-fold increase ($P<0.05$; Mann–Whitney test with Bonferroni's correction).

Such an obvious parameter as the 'speed' of the injection had already been studied before.^{12,13} In one case,¹³ a very slow delivery, obtained by using a pump, had been compared to injections executed by using a syringe and at various speeds. These speeds were all comparable to our 'slow' conditions and no significant differences in gene expression were detected. Surprisingly, Manthorpe *et al.*,¹² although using the same injection duration as those of our experiments, did not observe any significant effect of the injection speed. As they injected the pCMVint-lux plasmid in a larger volume (50 μ l) in the *rectus femoris* muscle, we repeated our experiments by using the same volume and buffer as Manthorpe *et al.*,¹² although performing the injections in the *tibialis cranialis*. Again, we found a very significant

effect of the injection speed in the *tibialis*, even with such a large volume (Figure 4). Moreover, we also obtained a lower variability through this experiment. We do not know the reasons why our results obtained in the *tibialis* differ from those of Manthorpe *et al.*,¹² obtained in the *rectus femoris*. Moreover, the weight, and therefore the volume of the *rectus* and of the *tibialis*, are more or less similar (about 110 versus 72 mg in our mice).

Such an effect of the injection speed on the DNA transfer efficacy had never been reported before. It might be an explanation for the variability of DNA expression, which is usually observed after a direct injection of naked DNA. Indeed, if no particular attention is focused on the DNA injection, the speed, at which the operation is performed, can be different from one injection to another and it can even not be constant within a given injection (e.g., even if the injection is performed in 10 s, this does not mean that, per second, $\frac{1}{10}$ th of the volume would always be evenly injected).

We also analyzed the causes for the differences observed and the mechanisms for DNA uptake under these conditions. The difference cannot be explained by differences in the distribution of the injected liquid within the muscle owing to speed injection (Figures 3c and d). Different mechanisms for the 'spontaneous' DNA uptake have been reported: on the one hand, after direct injection into the tissue (at least into the muscle), DNA uptake through receptor-mediated endocytosis had been proposed^{16,17} and putative receptors have been described.^{18,19} On the other hand, when a quick intravenous or intra-arterial injection of very huge volumes of DNA suspension is performed within a few seconds (hydrodynamic method), it had been suggested that DNA uptake might result from the generation of transient permeabilization structures in the hepatocytes membrane (hydroporation).⁷ However, a recent study revealed that the mechanism of hydrodynamic liver gene transfer might involve massive fluid endocytic vesicles in pericentral vein hepatocytes.²⁰

To further analyze DNA uptake mechanisms, we injected the DNA at three different speeds in the presence or in the absence of heparin, a polyanionic compound that totally abolishes the spontaneous uptake of oligonucleotide and plasmid DNA by the cells *in vitro*^{21,22} and by the muscle fibers *in vivo*.^{17,23} As expected from previous experiments,¹⁷ addition of heparin to the plasmid solution blocked the DNA uptake when we injected the mixture at slow and medium speeds. Such a complete inhibition of the transgenic expression cannot be attributed to a toxic effect of the heparin, as we have shown previously, under identical experimental conditions (same type of muscle, same reporter gene, same amounts of heparin), that high levels of gene transfer and expression can be achieved if appropriate electric pulses are delivered to the muscle after the injection of the mixture of DNA and heparin.¹⁷ This previous result also proves that the mechanism responsible for the heparin-inhibitable fraction of the DNA uptake cannot be the direct permeabilization of the cell membrane (indeed the electric pulses-mediated DNA uptake, which actually implies the (electro)permeabilization of the cell membrane, is not inhibited by heparin). As suggested previously, the heparin-inhibitable fraction of the DNA uptake could actually be the result of receptor-mediated endocytosis.^{16,17} Moreover, in

agreement with the recent study on the mechanisms of hydrodynamic DNA uptake,²⁰ the increase in pressure resulting from the increase in injection speed from 0.8 to 4 $\mu\text{l/s}$ (from slow to medium speed) could affect the endocytosis: such perturbation could allow one to explain both the increase in DNA uptake as well as its total inhibition after heparin addition.

Besides, as heparin addition did not totally inhibit DNA expression if DNA is injected in 1 or 2 s, we explored whether another mechanism, namely the direct penetration of the plasmid after membrane permeabilization (as suggested for the hydrodynamic DNA uptake^{7,24}) would be also operational under the fastest injection conditions. Permeabilization could result from the high liquid pressure created in the tissue by the rapid injection. Using PI injected under the same conditions, we bring here the first demonstration of the actual permeabilization of the muscle cells by fast injections, that is by the high hydrostatic pressure created by the fast injection speed. This second uptake mechanism, occurring only at the highest injection speed, could explain the discrepancy pointed out by the statistical analyses under the fast injection conditions in the presence of heparin. Thus, at the low and medium injection speeds, only the receptor-mediated endocytosis would be instrumental in DNA uptake (in the absence of heparin), whereas at the fast injection speed, direct permeabilization of the cells could also contribute to DNA uptake. Nevertheless, such permeabilization seems reversible and not detrimental as the histological analysis and determination of the induction of the *Hsp70* gene expression demonstrate that neither histological lesion nor important stress is produced to the muscle fibers.

In the liver, we also observed that we could not totally inhibit the DNA transfer using an excess of heparin, like in the muscle: direct permeabilization could also be involved in the liver. The latter mechanism is in agreement with the mechanism proposed by Liu and Huang,²⁵ in 2002 which helped explain the results of the mechanical massage of the liver (MML) with one's thumbs after the slow injection of a low volume of DNA through the tail vein. In the case of the MML, a linear relationship between transfection efficacy in the liver and venous blood pressure was observed.²⁶ This increase in blood pressure could result also in a hydrostatic pressure within the liver tissue, which could be considered mechanistically close to the liquid pressure in the tissue created by the fast injection of the DNA solution. However, it cannot be excluded that these two DNA transfer methods also share the DNA uptake mechanism not related to the cell membrane direct permeabilization (probably related to receptor-mediated endocytosis).^{16,17} Indeed, even though receptor-mediated endocytosis was rejected in MML²⁵ because liver transfection could not be blocked by the co-injection of a 2.5-fold excess of either single-strand poly I or irrelevant DNA, it must be noted, however, that in our experiments heparin is in a molar excess of 10^6 times with respect to the number of DNA molecules injected.

The influence of the injection speed in tumors is much lower than in the case of the skeletal muscle (Figures 2 and 6). This observation has a trivial explanation: muscle fibers are limited by fascia that do not allow leaks of the injected fluid (liver parenchyma is also limited by a physical barrier, the hepatic capsule), whereas tumors,

with their poorly organized structure and continuous growth, are not limited by such type of physiological membranes. Therefore, when comparing the two extreme cases in our study, that is, muscles and tumors, the presence or absence of a physical barrier limiting the tissue results in two main differences. Indeed, as DNA cannot easily leak in muscles: (i) DNA may have a longer residency time in the muscle tissue, which allows for a longer uptake by receptor-mediated endocytosis, and (ii) the pressure achieved in the muscles at the time of the injection could be higher than the pressure achieved in tumors, provoking transient membrane permeabilization and direct DNA uptake. The liquid leaks during injection into tumors could actually decrease tumor transfectability. Our results thus reinforce the hypothesis that pressure can, directly or indirectly, play an important role in the transfer of the DNA inside the cell. Pressure can also be generated by high injection volumes. However, the influence of the injection volume on gene transfer efficacy is not clear^{12,27–29} and, under our experimental conditions, high volumes do not abolish the speed effect.

Finally, our data reveal a clear and very simple improvement of the method of *in vivo* DNA transfer into the skeletal muscle, consisting in the sole injection of DNA into the tissue. Still, these levels remain much lower than those achieved after DNA electrotransfer.^{23,30} The methodological improvements reported here can also be used with regard to other tissues but its efficacy will depend on the anatomical characteristics of the injected tissue.

Materials and methods

Plasmid DNA

We prepared the plasmids pCMVLuc+ and pEGFP-N1 (Clontech, Montigny-les-Bretonneux, France) in PBS (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) using the EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Courtabeuf, France). In one case, we prepared the plasmid in 0.9% NaCl for comparison of our data with those of a previous report.

Animals

For all experimental procedures, we anesthetized female, 7–9 weeks old, C57BL/6 mice by intraperitoneal administration of anesthetics ketamine hydrochloride (100 mg/kg body weight) and xylazine (40 mg/kg). We housed and handled the animals according to the recommended guidelines.³¹

Tumor model

We cultured B16 F1 melanoma cells *in vitro* by using classical procedures and minimum essential medium (MEM) culture medium supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin and 8% fetal calf serum (Invitrogen). We subcutaneously inoculated young (6–8 weeks old) C57BL/6 female mice in the left flank with 1×10^6 syngenic B16 cells (in 100 μl of MEM culture medium). We treated the tumors as soon as they had reached an average diameter of 6–7 mm (7–8 days after inoculation).

DNA, PI and Evans Blue injections

In the *tibialis cranialis* muscle, we locally injected 20 μ l of either plasmid DNA at 0.5 μ g/ μ l, PI at 10 μ M in 0.9% NaCl or Evans Blue at 0.4% in 0.9% NaCl. We also injected 50 μ l of pCMVLuc+ plasmid at 0.5 μ g/ μ l in 0.9% NaCl into the *tibialis cranialis* in order to be able to compare our data with those of a previous report. We injected into the tumors 50 μ g of DNA in 50 μ l. We did all these injections by using an RN type Hamilton syringe with type 4, 26-G, 16-mm-long needles. For the injection into the liver, we performed a subxyphoid incision to expose the biggest left lobe of the liver and local injection of 50 μ g of plasmid DNA in 250 μ l by using a BD U-100 insulin syringe of 500 μ l with a 30-G needle. Then, we sutured the abdominal muscles and the skin incision. We manually controlled the injection speed by evenly pushing the solution within the times reported in the various figures. Unless otherwise stated, six tissue samples (muscles, livers or tumors) were injected under each experimental condition tested.

Luciferase activity measurement

We killed the mice 48 h after DNA injection, except for the experiments on liver (24 h). We removed the treated tissue and weighted it (72 ± 7 mg for the *tibialis* muscle, 144 ± 71 mg for the B16 tumor and 359 ± 35 mg for the treated lobe of the liver). Then, we put the tissue in a tube of lysing matrix (Bio 101 Systems Lysing Matrix A tube) (Q-Biogene, Illkirch, France) containing 1 ml of chilled cell culture lysis reagent solution (two tubes for the lobe of the liver). We prepared this solution by mixing 10 ml of $5 \times$ cell culture lysis reagent (Promega, Charbonnières, France) with 40 ml distilled water supplemented with one tablet of protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). We then disrupted tissues using a high-speed benchtop homogenizer Fast Prep Instrument (Q-Biogene). After the lysis, we centrifuged the tubes at 12 000 r.p.m. for 10 min. We measured the luciferase activity on 20 μ l of the supernatant, using a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold France SA, Thoiry, France), by integration of the light produced during 10 s, starting after the addition of 100 μ l of Luciferase Assay Substrate (Promega) to the sample lysate. We collected the results from the luminometer in relative light units (RLU). Calibration with several concentrations of purified firefly luciferase protein was performed to convert RLU in pg of luciferase using then the following linear conversion: $\text{Log (pg)} = 1.24 \text{ log (RLU)} - 4.83$. Then we expressed the final results as pg of luciferase per mg of tissue. In these figures, the discontinuous horizontal line represents the background noise of the luminometer (around 130 RLU).

Observation of the GFP expression, PI incorporation and Evans Blue distribution

We killed the mice 2 days after the injection of the pEGFP-N1 plasmid and observed the transfected tissue using a Leica MZ12 fluorescence stereomicroscope with a Leica GFP Plus filter set (Leica, Rueil-Malmaison, France). We assessed PI incorporation in the *tibialis* of anesthetized mice, a few minutes after the PI injection, using a Leica MZ FLIII fluorescence stereomicroscope with a Leica green filter set (excitation filter 546/10 nm, barrier filter 590 nm). We observed the distribution of the

Evans Blue a few minutes after the injection. In all cases, we removed the skin to assess directly the experiment results and to take pictures with an Olympus digital camera Camedia C-5050ZOOM.

In vivo inhibition of spontaneous DNA uptake by heparin

We supplemented the DNA solution with 180 IU/ml (*tibialis*) or 400 IU/ml (liver) of polyanionic heparin (Lab. Leo, Saint-Quentin, France). Because heparin is an anticoagulant compound, it provoked some bleeding in the treated tissues, especially in the liver where its fast injection led to some mortality of the injected mice. In these experiments 1 mg heparin (MW 10–12 kDa) corresponded to ~ 137 IU.

Expression of Hsp70 mRNA by reverse transcription-polymerase chain reaction

The whole *tibialis* were seeded in a tube containing ceramic spheres (Bio 101 Systems Lysing Matrix A tube) (Q-Biogene) and 1 ml of RNA Later (Ambion, Austin, TX, USA) to protect mRNA until extraction, and disrupted using a high-speed benchtop homogenizer. After the lysis, tubes were centrifuged at 12 000 r.p.m. for 10 min and supernatants collected. We extracted total RNA by the guanidium thiocyanate–phenol–chloroform method³² using Trizol (Invitrogen). We quantified total RNA amount by spectrophotometry at 260 nm. We obtained cDNA by reverse transcription using 2 μ g of total RNA and poly-DT(12–18) primers. Then, we performed polymerase chain reaction amplification using specific primers for mouse *Hsp70* (forward 5'-GGAGGT CATCTCCTGGCTGGACTC-3'; reverse 5'-CGCCTGGG CCCCAGAGCCCCCAGC-3'; 158-bp product), and mouse *Gapdh* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (forward 5'-GACAACTCACTCAAGATTGTCAG-3'; reverse 5'-CATTGTCATACCAGGAAATG-3'; 531-bp product). We first heated the samples at 94°C for 15 min. We performed *Gapdh* fragment amplification by means of 23 cycles at 94°C for 45 s, 56°C for 45 s and 72°C for 45 s and *Hsp70* fragment amplification by means of 27 cycles at 94°C for 45 s, 71°C for 45 s and 72°C for 45 s, using a thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Le Pecq, France). The final extension step lasted 10 min (72°C). We resolved amplification products by electrophoresis in a 1.2% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml) and photographed under UV light by a computer-assisted camera. We assessed expression level of the genes using densitometry analysis software (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MD, USA) on each band and we expressed results as the ratio *Hsp70*/*Gapdh* in arbitrary units (a.u.).

Evaluation of histological damages in the muscle

Two days after injection, upon mice killing, we dissected the *tibialis* muscle and fixed it for 24 h in Glyo-Fixx (Shandon, Pittsburgh, PA, USA). After paraffin embedding, we stained muscle histological sections (4 μ m) with hematoxylin–eosin–safranin (HES).

Statistics

The statistical analysis was performed using the SAS (8.2) software for Windows. *P*-values were two-sided. Because the data of the experimental groups displayed

very different variances, we first performed a logarithmic transformation of the data as classically recommended for a rigorous use of the statistical tools.

Then we used the parametric one-way ANOVA for the experiments dealing only with the injection speed, to evaluate the significance of the effect of the injection speed on the measured luciferase activity. In the case of the experiments with two parameters (speed of injection and presence or absence of heparin), we performed a two-way ANOVA to analyze the effect of the injection speed, the influence of the addition of heparin and the interaction between these two parameters. To further characterize the changes in luciferase activity as a function of the injection speed, we also made linear regressions. Linear regressions were calculated with or without the 'no injection' controls and the same statistical significance was observed. When the 'no injection' values were not included, real injection times were used for the calculation of the linear regression coefficients. In the case of the use of the 'no injection' values, linear regression was made using the appropriate classical transformation of the groups into coded integer numbers. In the figures, we only displayed the regressions featuring the 'no injection' group.

To analyze experiments with a lower number of groups (and thus with an insufficient number of data to rigorously perform an ANOVA test), we used non-parametric tests (Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests). When multiple tests were performed, we applied the Bonferroni's correction to reduce the risk of statistical type one error. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Abbreviations

ANOVA, analysis of variance; GFP, green fluorescent protein; HES, hematoxylin–eosin–safranin; Hsp70, heat-shock protein 70; MEM, minimum essential medium; MML, mechanical massage of the liver; PBS, phosphate-buffered saline; PI, propidium iodide; RLU, relative light units

Acknowledgements

We acknowledge the excellent technical assistance of Elisabeth Connault (UMR 8121) for preparing and staining the material for the histological analysis; of Patrice Ardouin, Jennifer Huard and Désiré Challuau (SCEA IGR/CNRS) for their help with animal handling and housing and of Dorothee Peitzmann (UMR 8121) for the linguistic support. We acknowledge the financial support of the CNRS, IGR, AFM and the EU Commission through the Cliniporator project (QLK3-1999-00484) coordinated by LMM. We also acknowledge all our colleagues for fruitful discussions and collaborative work. FA is the recipient of an 'aide aux études' from the AFM (Association Française contre les Myopathies).

References

- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; **247**: 1465–1468.
- Dileo J, Miller Jr TE, Chesnoy S, Huang L. Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design. *Hum Gene Ther* 2003; **14**: 79–87.
- Li T, Tachibana K, Kuroki M. Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice – initial results. *Radiology* 2003; **229**: 423–428.
- Miller DL, Song J. Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound *in vivo*. *Ultrasound Med Biol* 2003; **29**: 887–893.
- Cemazar M, Grosel A, Glavac D, Kotnik V, Skobrne M, Kranjc S *et al.* Effects of electrogenetherapy with p53wt combined with cisplatin on survival of human tumor cell lines with different p53 status. *DNA Cell Biol* 2003; **22**: 765–775.
- Trochon-Joseph V, Martel-Renoir D, Mir LM, Thomaidis A, Opolon P, Connault E *et al.* Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res* 2004; **64**: 2062–2069.
- Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 1735–1737.
- Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 1999; **6**: 1258–1266.
- Alino SF, Crespo A, Dasi F. Long-term therapeutic levels of human alpha-1 antitrypsin in plasma after hydrodynamic injection of nonviral DNA. *Gene Therapy* 2003; **10**: 1672–1679.
- Dagnaes-Hansen F, Holst HU, Sondergaard M, Vorup-Jensen T, Flyvbjerg A, Jensen UB *et al.* Physiological effects of human growth hormone produced after hydrodynamic gene transfer of a plasmid vector containing the human ubiquitin promoter. *J Mol Med* 2002; **80**: 665–670.
- He CX, Shi D, Wu WJ, Ding YF, Feng DM, Lu B *et al.* Insulin expression in livers of diabetic mice mediated by hydrodynamics-based administration. *World J Gastroenterol* 2004; **10**: 567–572.
- Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M *et al.* Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 419–431.
- Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Biotechniques* 1991; **11**: 474–485.
- Aufricht C. Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatr Nephrol* 2005; **20**: 707–713.
- Andrews JM, Newbound GC, Lairmore MD. Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs following induction of the cellular stress response. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 1082–1084.
- Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA. Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells *in vivo* by a receptor-mediated process. *J Gene Med* 2000; **2**: 76–88.
- Satkauskas S, Bureau MF, Mahfoudi A, Mir LM. Slow accumulation of plasmid in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis. *Mol Ther* 2001; **4**: 317–323.
- Siess DC, Vedder CT, Merckens LS, Tanaka T, Freed AC, McCoy SL *et al.* A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein. *J Biol Chem* 2000; **275**: 33655–33662.
- Levy MY, Barron LG, Meyer KB, Szoka Jr FC. Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood. *Gene Therapy* 1996; **3**: 201–211.
- Crespo A, Peydro A, Dasi F, Benet M, Calvete JJ, Revert F *et al.* Hydrodynamic liver gene transfer mechanism involves transient sinusoidal blood stasis and massive hepatocyte endocytic vesicles. *Gene Therapy* 2005; **12**: 927–935.
- Takakura Y, Takagi T, Hashiguchi M, Nishikawa M, Yamashita F, Doi T *et al.* Characterization of plasmid DNA binding and

- uptake by peritoneal macrophages from class A scavenger receptor knockout mice. *Pharm Res* 1999; **16**: 503–508.
- 22 Benimetskaya L, Loike JD, Khaled Z, Loike G, Silverstein SC, Cao L *et al*. Mac-1 (CD11b/CD18) is an oligodeoxynucleotide-binding protein. *Nat Med* 1997; **3**: 414–420.
- 23 Satkauskas S, Bureau MF, Puc M, Mahfoudi A, Scherman D, Miklavcic D *et al*. Mechanisms of *in vivo* DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporability and DNA electrophoresis. *Mol Ther* 2002; **5**: 133–140.
- 24 Kobayashi N, Nishikawa M, Hirata K, Takakura Y. Hydrodynamics-based procedure involves transient hyperpermeability in the hepatic cellular membrane: implication of a nonspecific process in efficient intracellular gene delivery. *J Gene Med* 2004; **6**: 584–592.
- 25 Liu F, Huang L. Noninvasive gene delivery to the liver by mechanical massage. *Hepatology* 2002; **35**: 1314–1319.
- 26 Liu F, Lei J, Vollmer R, Huang L. Mechanism of liver gene transfer by mechanical massage. *Mol Ther* 2004; **9**: 452–457.
- 27 Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M *et al*. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 2000; **165**: 2850–2858.
- 28 Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vivo*: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* 1993; **4**: 151–159.
- 29 Hartikka J, Sukhu L, Buchner C, Hazard D, Bozoukova V, Margalith M *et al*. Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188. *Mol Ther* 2001; **4**: 407–415.
- 30 Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM *et al*. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4262–4267.
- 31 United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR). Guidelines for the welfare of animals in experimental neoplasia (second edition). *Br J Cancer* 1998; **77**: 1–10.
- 32 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156–159.

*Etude des altérations induites par
l'électrotransfert.*

II. Etude des altérations induites par l'électrotransfert

Afin d'être sûr de ne pas avoir d'artefacts dus aux lésions tissulaires ou au stress cellulaire, nous avons réalisé une étude des lésions histologiques et de l'expression d'une protéine de stress (Hsp70) pouvant résulter de l'électrotransfert.

Cette étude de l'innocuité de l'électrotransfert de gènes dans le muscle est aussi intéressante dans le cadre de futures applications cliniques.

A. Lésions histologiques

L'évaluation de lésions histologiques potentielles, induites par les impulsions électriques du générateur, a été faite dans le muscle squelettique de souris soit par (i) injection seule ou (ii) injection suivie d'une combinaison d'un HV et d'un LV scindé en 8 impulsions ou (iii) injection suivie d'une combinaison d'un HV et d'un LV (unique, mais de même durée totale que les 8 LVs précédents) optimaux ou (iv) injection suivie d'impulsions optimales délivrées avec le générateur Jouan (générateur de trains d'impulsions carrées longues répétées).

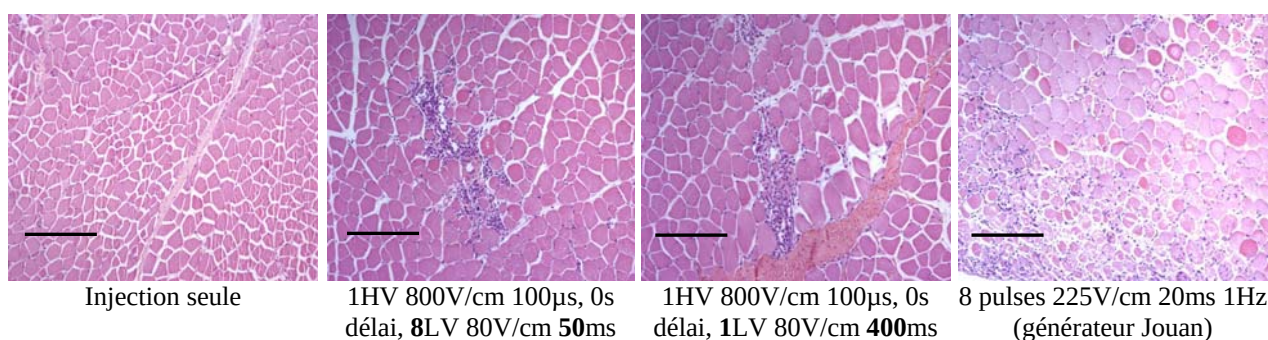


Figure 17 : Coupes histologiques de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles (coloration HES) après divers traitements. La barre d'échelle fait 200µm.

Comme on le voit sur la figure 17 il n'y a pas de différences entre les groupes (ii) et (iii), seule une légère infiltration de cellules immunitaires est observable. A l'inverse, avec les impulsions de type carrées longues répétées, des zones d'intenses altérations morphologiques sont observables.

B. Induction de l'expression de protéines de stress (HSP)

L'induction de l'expression de HSPs (heat shock proteins) est un indicateur de stress cellulaire. En effet les HSPs sont un ensemble de protéines conservées au sein des organismes procaryotes et eucaryotes, dont l'expression est induite par divers types de stress cellulaires ou durant le développement embryonnaire. De fait, le stress cellulaire peut être induit par une variété de stimuli comme l'augmentation de la température, l'éthanol, des agents mitogènes, des cytokines, l'hypoxie ou une infection virale, mais également par l'exposition à des métaux lourds, aux UV, au manque de glucose, en cas d'apport d'antibiotiques... Les HSPs jouent aussi un rôle protecteur dans les cellules en tant que molécules chaperonnes, en facilitant le repliement, le transport intracellulaire, l'assemblage et le désassemblage d'autres protéines. Les HSP protègent aussi les cellules des dégradations dues aux radicaux libres, à la fois *in vivo* et *in vitro* et protègent aussi les cellules de la nécrose ou de l'apoptose.

De plus, Andrew *et al.* (Andrews, Newbound *et al.* 1997) ont rapporté que les méthodes classiquement utilisées pour les transfections transitoires induisaient une réponse au stress cellulaire et ils ont démontré que l'électroporation induisait l'expression d'Hsp72 dans des cellules HUT 78. Ils supposent que les impulsions électriques de fort voltage, utilisées pour l'électroporation entraînent des lésions membranaires et des altérations de la structure des protéines (dénaturation), qui sont connues pour induire la réponse au stress.

A l'inverse, Pazmany *et al.* (Pazmany, Murphy *et al.* 1995) ont rapporté que l'exposition de cellules à une impulsion électrique unique (250-1250 V/cm) provoque l'activation rapide et persistante de la capacité de fixation à l'ADN d'un certain nombre de facteurs de transcription, incluant AP-1, SP1, AP-2, NF- κ B, fos et jun. Mais ils ont démontré que l'exposition des cellules à leurs impulsions électriques n'entraîne pas l'induction de la protéine Hsp 70.

C'est pourquoi nous avons étudié le niveau d'expression de l'ARNm du gène de Hsp 70 (70 kilodaltons) dans le cadre d'impulsions électriques délivrées *in vivo* sur des muscles de souris avec deux types de générateurs. Le premier générateur est un électroporateur PS-15 Jouan (GHT 1281, Jouan, St Herblain, France) dont les impulsions sont visualisées et contrôlées par un oscilloscope (VC 6025, Hitachi, Tokyo, Japon), le second générateur est le Cliniporator qui délivre des combinaisons d'impulsions électriques de haut voltage (HV) et de bas voltage (LV).

Les résultats obtenus pour l'article 1 (Andre, Cournil-Henrionnet *et al.* 2006) sur l'influence de la vitesse d'injection montrent que l'injection rapide peut déjà entraîner une très légère augmentation de l'expression de Hsp70 et donc provoquer un léger stress. Les injections ont donc toutes été faites à vitesse lente. Dans un premier temps nous avons mesuré l'expression de l'ARN messager de Hsp 70 en fonction du générateur utilisé et de la concentration en ADN. En effet certains groupes ont rapporté un possible effet toxique de l'ADN sur les cellules (Heller, Jaroszeski *et al.* 1996; Matsumoto, Komori *et al.* 2001). Nous avons donc injecté des muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 avec 20 μ l d'une solution contenant soit uniquement du PBS soit du PBS avec 0,5 μ g/ μ l ou 2,5 μ g/ μ l de plasmide pEGFPN1. Les muscles injectés ont ensuite été électropulsés soit avec le générateur Jouan (230 V/cm, 8 pulses, 20 ms), soit avec le Cliniporator (1HV de 800 V/cm 100 μ s suivi de 1LV 80V/cm 400ms). Le niveau d'expression d'Hsp70 a ensuite été mesuré à 24 et 48h. (voir figure 18). Le niveau d'ARN messager pour Hsp70 a été déterminé dans des extraits de muscle par transcription reverse suivie d'une amplification par PCR et d'une comparaison sur gel avec le niveau d'expression d'un ARN messager constitutif : la GAPDH (glyceraldehyde phosphate dehydrogenase). Les résultats sont présentés sous forme de rapport Hsp70 sur GAPDH en unité arbitraire.

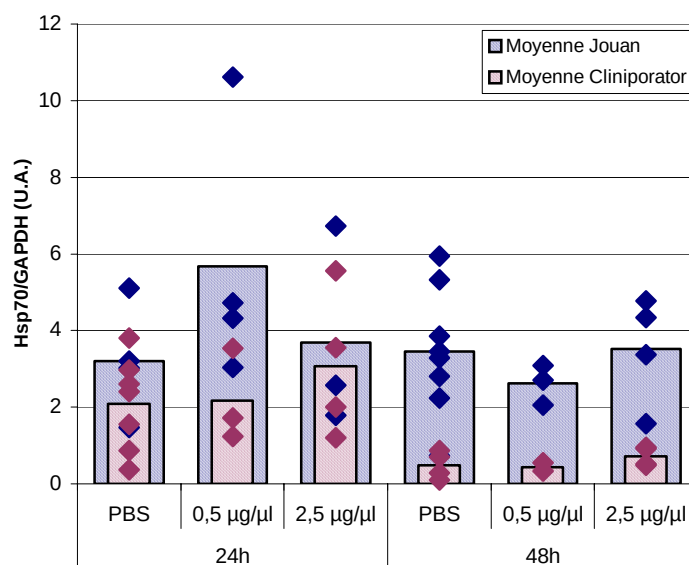


Figure 18: Expression de Hsp70 dans le muscle tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles, 24 et 48h après électrotransfert, en fonction de la concentration en ADN (pEGFPN1 dans 20µl de PBS) et du générateur utilisé (Cliniporator : 1HV 100µs 800V/cm, 1s délai, 1LV 400ms 80V/cm ; Jouan : 8 x 20ms 230V/cm 1Hz).

On voit sur la figure 18 qu'aux concentrations utilisées, il n'y a pas d'effet de la concentration en ADN sur le stress induit par les impulsions électriques. A 48h les impulsions du Jouan génèrent significativement ($p < 0,001$, test de rang Mann-Whitney) plus de stress que celles utilisées pour le Cliniporator. En se basant sur ces résultats nous avons approfondi l'étude de l'effet des impulsions électriques sur l'expression de Hsp 70, en n'injectant que du PBS puisqu'il n'y a pas d'effet de l'ADN, quel que soit le générateur utilisé et la concentration.

Nous avons donc ensuite mesuré les niveaux d'expression d'ARN messager pour Hsp70 dans les fibres musculaires à différents temps après divers types de traitements : injection seule, HV seul, combinaison de HV et LV, et train d'impulsions carrées longues répétées délivrées avec le Jouan.

Concernant les différents types d'impulsions, on voit (figure 19) que le HV seul entraîne une légère augmentation de l'expression de Hsp70 à 6 heures après l'impulsion alors que l'utilisation de 8 impulsions entraîne une forte augmentation de l'expression de Hsp70 dès 30 minutes.

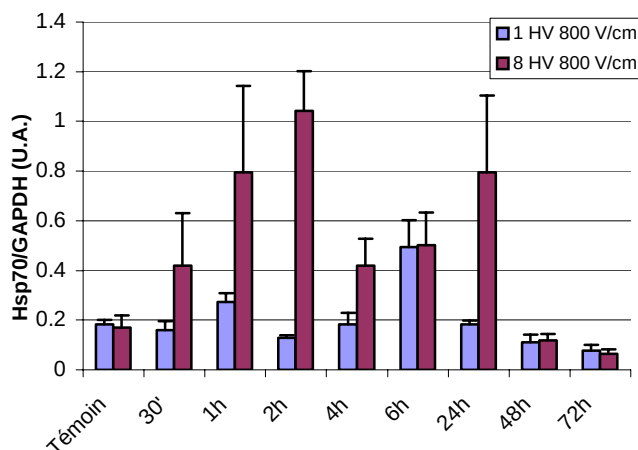


Figure 19 : Expression de Hsp70 dans le muscle tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles à différent temps après injection de 20µl PBS et application d'1 HV (800V/cm, 100µs) ou de 8 HV (800V/cm, 100µs, 1Hz).

Les résultats concernant la combinaison HV+LV (figure 20) montrent clairement un accroissement de l'expression de Hsp70 plus important que le HV seul (figure 19). Cependant cette augmentation est réduite par rapport à l'induction générée par les impulsions du générateur Jouan à partir de 6 heures après les impulsions. Le LV utilisé après le HV induit plus ou moins d'expression selon qu'il est scindé en plusieurs impulsions ou non. Lorsqu'il est composé d'une seule impulsion de 400ms il provoque un accroissement de l'expression de Hsp70 maximal à 24h alors que ce n'est plus le cas avec le LV scindé en 8 impulsions de 50ms chacune. Ce résultat est en accord avec une autre analyse théorique réalisée au laboratoire (Davalos, Rubinsky *et al.* 2003) qui montre que la température lors de l'impulsion unique de 400ms peut atteindre plus de 50°C pendant une seconde, alors qu'avec les 8 impulsions de 50ms (même durée totale de 400ms), la température n'atteint pas les 50°C grâce à la dissipation thermique se produisant durant l'intervalle entre les pulses.

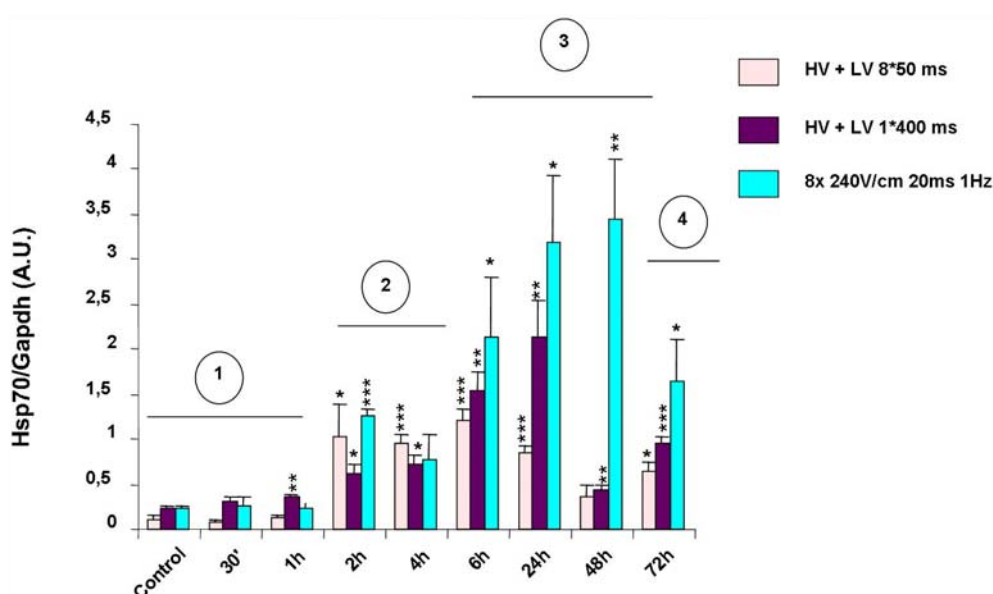


Figure 20 : Expression de Hsp70 dans le muscle tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles à différent temps après injection de 20µl PBS et application de divers types d'impulsions.

On peut donc en conclure que les lésions et le stress, induits par la combinaison d'impulsions HV+LV, sont moindres que dans le cas des impulsions classiques carrées longues répétées. De plus elles demeurent suffisamment basses et transitoires pour ne pas interférer dans l'étude de l'électrotransfert.

Etude des paramètres électriques.

III. Etude des paramètres électriques

Les différentes sources d'artefacts étant connues et contrôlées, nous avons étudié le rôle et l'effet des différents paramètres électriques de l'électrotransfert *in vivo* sur divers tissus.

Article 2 :
Rôles des impulsions HV et LV dans le
muscle.

A. Rôles des impulsions HV et LV dans le muscle (Article 2)

Une première expérience (voir figure 21) a été réalisée pour confirmer *in vivo* le rôle de l'impulsion HV : une injection lente de 20µl de plasmide pEGFPN1 (0,5µg/µl) dans du PBS dans le muscle tibialis cranialis de souris C57Bl/6, suivie de l'application d'impulsions électriques (1HV 100µs, délai de 1s, 1LV 80V/cm 400ms).

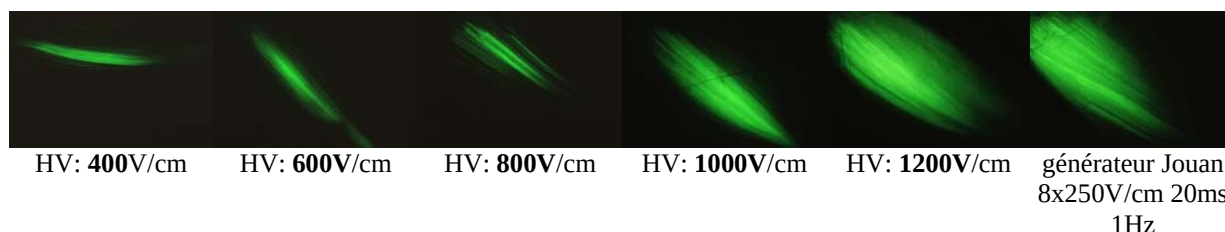


Figure 21 : Expression de GFP dans le tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles pour différentes valeurs de HV. Observation faite à la loupe binoculaire 2 jours après l'électrotransfert (1HV 100µs, 1s délai, 1LV 400ms 80V/cm ; 20µl de plasmide pEGFPN1 0,5µg/µl dans du PBS). N.B. : dans cette expérience les valeurs de champs efficaces sont plus élevées que dans les autres expériences car l'électrotransfert a été effectué en absence de rasage des pattes des souris.

On voit sur la figure 21 que lorsque l'on augmente le voltage de l'impulsion HV (le LV restant constant), on observe une augmentation du nombre de fibres exprimant la protéine mais pas une augmentation de l'expression de la protéine par fibres. Ainsi on voit que *in vivo* l'impulsion **HV est responsable** du nombre de fibres transfectées et donc du niveau de **perméabilisation** des fibres.

Dans l'article 2 (Satkauskas, Andre *et al.* 2005), une étude de l'importance de l'impulsion LV dans l'efficacité de l'électrotransfert a été effectuée. Dans le cadre de ce travail, les études préliminaires sur l'influence de l'injection se sont révélées utiles pour permettre une bonne distribution et une bonne reproductibilité. Ainsi toutes les injections ont été réalisées à vitesse lente éliminant des artefacts dus aux effets hydrodynamiques et réduisant la variabilité.

La figure 5 de l'article 2 (Satkauskas, Andre *et al.* 2005), avec des images obtenues au moyen d'une loupe binoculaire à fluorescence, confirme qualitativement et semi quantitativement, avec un plasmide pEGFPN1, l'augmentation de l'efficacité de l'électrotransfert dans les fibres musculaires avec le voltage de l'impulsion LV. Cette augmentation avait déjà été observée quantitativement dans la figure 3 de l'article 2 (Satkauskas, Andre *et al.* 2005), avec le plasmide pCMVLuc. La figure 5 montre aussi que cet accroissement général n'est pas dû à une augmentation du nombre de fibres transfectées mais à une augmentation de l'expression de la GFP par chacune des fibres transfectées.

Le HV demeurant fixe dans cette expérience, le nombre de fibres transfectées reste constant, confirmant ainsi (i) que le HV est responsable du niveau de perméabilisation et (ii) l'absence d'effet perméabilisant de l'impulsion LV. L'augmentation de l'expression de la GFP par chacune des fibres avec l'augmentation du voltage du LV s'explique par l'augmentation de la force électrophorétique et donc de la quantité de plasmide qui pénètre dans chacune des fibres perméabilisées par le HV.

Ces deux expériences permettent donc de confirmer *in vivo* l'hypothèse que le HV est responsable de la perméabilisation des cellules alors que le LV contrôle la partie électrophorétique de l'électrotransfert.

Electrophoretic Component of Electric Pulses Determines the Efficacy of *In Vivo* DNA Electrotransfer

SAULIUS ŠATKAUSKAS,^{1,2} FRANCK ANDRÉ,¹ MICHEL F. BUREAU,³ DANIEL SCHERMAN,³
DAMIJAN MIKLAVČIČ,⁴ and LLUIS M. MIR¹

ABSTRACT

Efficient DNA electrotransfer can be achieved with combinations of short high-voltage (HV) and long low-voltage (LV) pulses that cover two effects of the pulses, namely, target cell electroporation and DNA electrophoresis within the tissue. Because HV and LV can be delivered with a lag up to 3000 sec between them, we considered that it was possible to analyze separately the respective importance of the two types of effects of the electric fields on DNA electrotransfer efficiency. The tibialis cranialis muscles of C57BL/6 mice were injected with plasmid DNA encoding luciferase or green fluorescent protein and then exposed to various combinations of HV and LV pulses. DNA electrotransfer efficacy was determined by measuring luciferase activity in the treated muscles. We found that for effective DNA electrotransfer into skeletal muscles the HV pulse is prerequisite; however, its number and duration do not significantly affect electrotransfer efficacy. DNA electrotransfer efficacy is dependent mainly on the parameters of the LV pulse(s). We report that different LV number, LV individual duration, and LV strength can be used, provided the total duration and field strength result in convenient electrophoretic transport of DNA toward and/or across a permeabilized membrane.

INTRODUCTION

ELECTRICALLY MEDIATED GENE TRANSFER, also termed DNA electrotransfer or electrogene therapy, has gained real interest as it is one of the most effective methods of *in vivo* non-viral gene transfer (André and Mir, 2004). The method has been shown to be effective in electrotransferring plasmid DNA to various tissues: muscles (Aihara and Miyazaki, 1998; Mir *et al.*, 1998a, 1999), liver (Heller *et al.*, 1996; Suzuki *et al.*, 1998), skin (Titomirov *et al.*, 1991; Zhang *et al.*, 1996), tumors (Heller *et al.*, 2000; Wells *et al.*, 2000; Heller and Coppola, 2002), mouse testis (Muramatsu *et al.*, 1997, 1998), and so on (André and Mir, 2004).

The mechanisms by which electric pulses mediate DNA transfer into target cells are not well understood. Nevertheless, there is common agreement that for improved DNA transfer into tissue, cells in that tissue must be permeabilized. Such permeabilization can be achieved using simple runs of short square-wave electric pulses (in the range of 100 μ sec) (Mir *et al.*, 1991b; Gehl *et al.*, 1999; Miklavčič *et al.*, 2000). This kind

of pulse has been widely used for the local delivery of non-permeant anticancer drugs (such as bleomycin or cisplatin) in a form of treatment termed “antitumor electrochemotherapy” (Mir *et al.*, 1991a, 1998b; Glass *et al.*, 1997; Sersa *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 2002). Indeed, the delivery to tumors of, for example, eight pulses of 1300 V/cm and 100 μ sec either *in vitro* or *in vivo* is sufficient to induce transient rearrangements of the cell membrane that allow nonpermeant anticancer molecules such as bleomycin to enter the cell by diffusion and to fully exert their cytotoxic activity (Mir *et al.*, 1991b; Poddevin *et al.*, 1991; Gehl *et al.*, 1998).

These short permeabilizing electric pulses have also been shown to increase the transfer of plasmid DNA into several tissue types (Heller *et al.*, 1996, 2000). However, another type of square-wave electric pulse was applied to muscles (Aihara and Miyazaki, 1998; Mir *et al.*, 1999), tumors (Rols *et al.*, 1998), liver (Suzuki *et al.*, 1998), and some other tissues (André and Mir, 2004), and was found to be more effective for DNA electrotransfer (Mir *et al.*, 1999; Heller *et al.*, 2000). These pulses usually are of lower voltage but much longer duration (in the

¹Vectorology and Gene Transfer, UMR 8121 CNRS, Institute Gustave Roussy, F-94805 Villejuif, France.

²Department of Biology, Vytautas Magnus University, LT-44404 Kaunas, Lithuania.

³U 266 INSERM-FRE 2463 CNRS, Faculté de Pharmacie, Université Paris 5, F-75270 Paris, France.

⁴Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.

range of tens of milliseconds) (Aihara and Miyazaki, 1998; Rols *et al.*, 1998; Mir *et al.*, 1999; Bettan *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001). It is assumed that this type of pulse mediates DNA transfer into cells by inducing two distinct effects that include cell permeabilization (like the short pulses) and DNA electrophoretic migration during the delivery of the electric field (Klenchin *et al.*, 1991; Sukharev *et al.*, 1992; Neumann *et al.*, 1996; Mir *et al.*, 1999; Golzio *et al.*, 2002). The double role of the electric pulses in *in vivo* DNA electrotransfer was demonstrated by using combinations of electric pulses consisting of high-voltage, short pulses (or HVs; e.g., 800 V/cm and 100 μ sec) followed by low-voltage, long pulses (or LVs; e.g., 80 V/cm and 100 msec) (Bureau *et al.*, 2000; Šatkauskas *et al.*, 2002). In a previous study we found that these HV and LV pulses can be separated by various lag times between the HV and LV pulses without significant loss in transfection efficiency. These lag times ranged up to 300 sec for a combination of one HV and one LV, and up to 3000 sec for a combination of one HV and four LV (Šatkauskas *et al.*, 2002).

Taking into account these lag times between the HV and LV pulses, we thought it possible to characterize separately the respective importance of the two effects of the electric fields—electroporation and electrophoresis—on DNA electrotransfer efficacy.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid DNA

We used plasmid pXL3031 (pCMV-Luc+) containing the cytomegalovirus promoter (nucleotides 229–890 of pcDNA3; Invitrogen, Carlsbad, CA) inserted upstream of the sequence for *luc*, encoding a modified cytosolic wild-type firefly luciferase (Soubrier *et al.*, 1999). We prepared plasmid DNA according to the usual procedures (Ausubel *et al.*, 1994). Alternatively, we also used plasmid pEGFP-N1 (BD Biosciences Clontech, Saint Quentin Yvelines, France), featuring the gene encoding green fluorescent protein (GFP) under the control of the CMV promoter and prepared in phosphate-buffered saline (PBS; GIBCO/Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with an EndoFree Plasmid Giga kit (Qiagen, Courtabeuf, France).

Animals

For all experimental procedures we anesthetized female, 7- to 9-week-old C57BL/6 mice by intraperitoneal administration of the anesthetics ketamine (Ketalar, 100 mg/kg; Panpharma, Fougères, France) and xylazine (Rompun, 40 mg/kg; Bayer, Puteaux, France). Before performing the experiments subject legs were shaved with an electric shaver. At least 10 muscles (5 mice) were included in each experimental group for luciferase determinations. In the case of the GFP qualitative data, four muscles were used for each experimental condition.

DNA injection

For the luciferase experiments, we injected 3 μ g of plasmid DNA prepared in 30 μ l of 0.9% NaCl. In most of our experiments (see Figs. 1–3) we supplemented the DNA solution with heparin (120 IU/ml; Laboratoires Leo, Saint Quentin en Yvelines, France;

1 mg of the heparin [MW 10,000–12,000] corresponded to approximately 137 IU). We injected the DNA into tibialis cranialis muscles, using a Hamilton syringe with a 26-gauge needle. Because the quality of injection of the plasmid may affect transfection efficacy, all injections within a given experiment were performed by the same well-trained investigator. For GFP experiments, 4 μ g in 20 μ l of PBS was injected into each treated tibialis cranialis muscle, always in the absence of heparin.

DNA electrotransfer

HV and LV pulse combinations were generated by a device consisting of square-wave electropulsator (PS-15; Jouan, St. Herblain, France) and a microprocessor-driven switch/function generator built at the Faculty of Electrical Engineering at the University of Ljubljana (Ljubljana, Slovenia). The device allowed for precise control of every electrical parameter of HV and LV pulse combinations (Šatkauskas *et al.*, 2002).

HV and LV pulse combinations were delivered soon (40 ± 15 sec) after intramuscular DNA injection. In all the experiments we fixed the lag between HV and LV to 1 sec. For pulse delivery to the muscles we used stainless plate electrodes 4.4 mm apart. The 1-cm plates encompassed the whole leg of each mouse. To ensure good contact between the tibialis cranialis muscle of the exposed leg and the plates of the electrodes a conductive gel was used. Electric field values (in volts per centimeter) are always expressed in terms of the ratio of the voltage applied (volts) to the distance between the electrodes (centimeters).

For the GFP experiments the pulse combinations were delivered with a Cliniporator (IGEA, Carpi, Modena, Italy) generator and electrodes (5 mm apart) from the same company.

Luciferase activity measurement

We killed the mice 2 days after DNA electrotransfer. We removed and homogenized the muscles (net weight, approximately 60 mg) in 1 ml of cell culture lysis reagent solution (10 ml of cell culture lysis reagent; Promega, Charbonnières, France), diluted with 40 ml of distilled water and supplemented with one protease inhibitor cocktail tablet (Roche, Mannheim, Germany). After centrifugation at 12,000 rpm for 10 min at 4°C, we assessed the luciferase activity in 10 μ l of the supernatant, using a Wallac Victor² luminometer (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA), by integration of the light produced over 1 sec, starting after the addition of 50 μ l of luciferase assay substrate (Promega) to the muscle lysate. We collected the results from the luminometer in relative light units (RLU). Calibration with purified firefly luciferase protein showed that 10^6 RLU corresponds to approximately 70 ng of expressed luciferase. We expressed the final results as picograms of luciferase per muscle.

GFP fluorescence observations

We killed the mice 3 days after the injection of pEGFP-N1 plasmid and observed the transfected tissue with an MZ12 fluorescence stereomicroscope with a GFP Plus filter set (excitation filter, 480/40 nm; dichroic mirror, 505 nm LP; barrier filter, 510 nm LP) (Leica, Rueil-Malmaison, France). After removal of the leg skin, pictures were taken with a digital cooled

color camera (AxioCam HRc; Zeiss, Le Pecq, France), and quantification of GFP expression was made by software (AxioVision Light Edition, release 4.1.1.0; Zeiss) integration of the light detected by the camera. Pictures were taken either at a constant exposure time (100 msec) or at a variable exposure time, that is, allowing the camera to adjust the exposure time to acquire an equivalent amount of light from picture to picture. Each experimental condition was repeated four times (four muscles treated). Quantitative analysis was done by determining the mean density of the green color in these images, using a relative scale with 256 levels of intensity.

Statistical analysis

For statistical comparison of several groups we used the two-tailed Student *t* test for unpaired values. In the figures we reported luciferase expression data as means $\pm$ SD.

RESULTS

In the luciferase experiments, because of the high sensitivity of the measurements, we injected a solution of plasmid DNA supplemented with low amounts of heparin (120 IU/ml). Heparin at this dose causes a large decrease in the spontaneous uptake of DNA by the muscle but does not significantly impair the efficacy of DNA electrotransfer into the muscle fibers (Šatkauskas *et al.*, 2001). Therefore, the respective contributions of HV and LV pulses to the efficiency of DNA electrotransfer can be analyzed more precisely in the presence of heparin. In addition, we fixed the lag time between HV and LV pulse(s) to 1 sec.

Influence of HV pulse duration and number

To analyze the role of the electropermeabilizing (HV) pulses we used LV pulses giving the best level of gene expression according to previous data (Šatkauskas *et al.*, 2002). Therefore we fixed the LV component parameters to four LVs of 80 V/cm and 100-msec duration, with a delay between pulses of 1 sec.

We tried to improve muscle permeabilization by increasing either the number (from one to eight) or the duration (from 100 to 500 μ sec) of the HV pulses. As shown in Fig. 1, neither an increase in HV duration, nor an increase in HV pulse number, significantly enhanced muscle transfection.

Influence of LV pulse number

As a consequence of the results shown in Fig. 1, we always used a single HV pulse of 800 V/cm and 100 μ sec to analyze the role of the LV component. First, we examined the influence of the number of LVs. We fixed LV pulse strength at 80 V/cm, with a duration of 100 msec, and the delay between LVs at 1 sec. Luciferase expression markedly increased when we increased LV number from one to four (Fig. 2A). Consistent with previous data (Šatkauskas *et al.*, 2002), with four LVs the luciferase expression was 10 times higher than with one LV. No further significant increase was observed with a larger number (six or eight) of LV pulses (Fig. 2A).

Subsequent experiments on the influence of pulse number on gene transfer efficacy were performed with 50-msec LV(s) (Fig. 2B). We observed the same trend as in the case of 100-msec

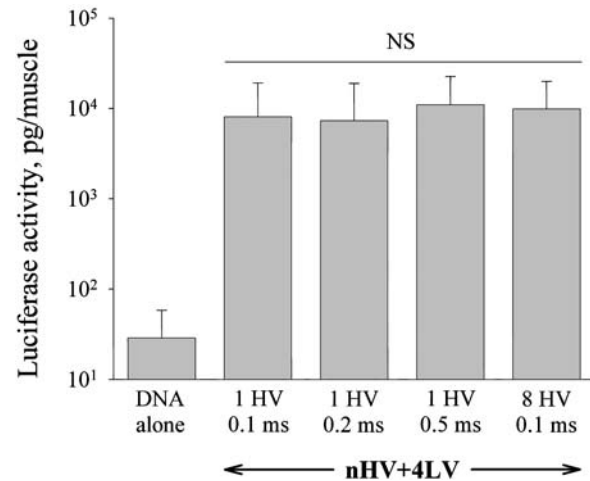


FIG. 1. Luciferase expression after DNA electrotransfer based on combinations of one or eight HV pulses (800 V/cm; 0.1, 0.2, or 0.5 msec) and four LV pulses (80 V/cm and 100 msec) (*n*HV+4LV pulse combination). Data are presented as means $\pm$ SD. The significance of differences between each of the *n*HV+4LV groups was calculated by *t* tests; NS, not significant. Each column represents results from at least 18 muscles treated in two experiments.

LV(s) (Fig. 2A). In both cases the beginning of the plateau in luciferase gene expression started at a total pulse duration of 400 msec. Again, no further significant increase was observed with increased number (12 or 16) of LV pulses. These data also suggested that similar levels of DNA electrotransfer and gene expression may be achieved with different combinations of LV pulse number and duration. To test this hypothesis, we used four different combinations of number (*n*) and duration (*d*) of LVs, such that the product $n \times d$ was constant and equal to 400 msec (Fig. 2C). A tendency to a progressive decrease in luciferase gene expression with the concomitant decrease in individual pulse duration and increase in pulse number was found (Fig. 2C). For instance, HV and LV combinations using one LV of 400 msec resulted in about two times higher luciferase gene expression compared with eight LVs of 50 msec ($p < 0.001$).

Influence of LV pulse strength

Figure 3 shows the dependence of DNA electrotransfer and expression on the electric field strength of the LV pulses. We examined LV pulse strengths ranging from 20 to 100 V/cm. At low electric field strengths (20 and 40 V/cm), luciferase expression was not significantly increased ($p > 0.05$) in comparison with that achieved with the HV pulse alone. At 60 V/cm LV pulses started to play a significant role and luciferase expression was already more than 100 times higher than that obtained by HV pulse alone. We obtained the highest values of luciferase expression with LVs of 100 V/cm (Fig. 3).

Combination of LV pulse strength and duration

In this set of experiments, we aimed to analyze whether the decrease in efficacy when using LVs of lower field strength

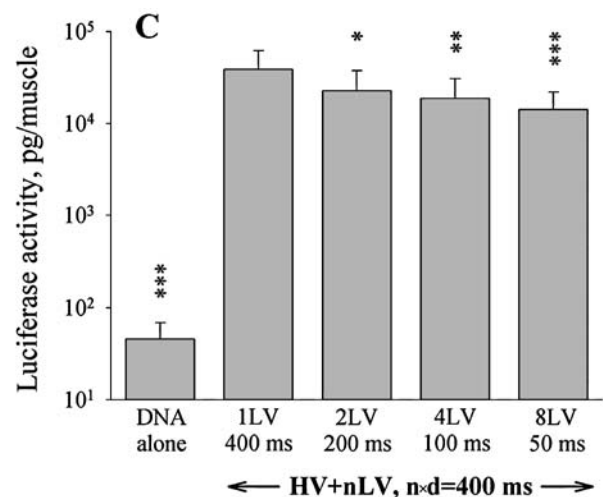
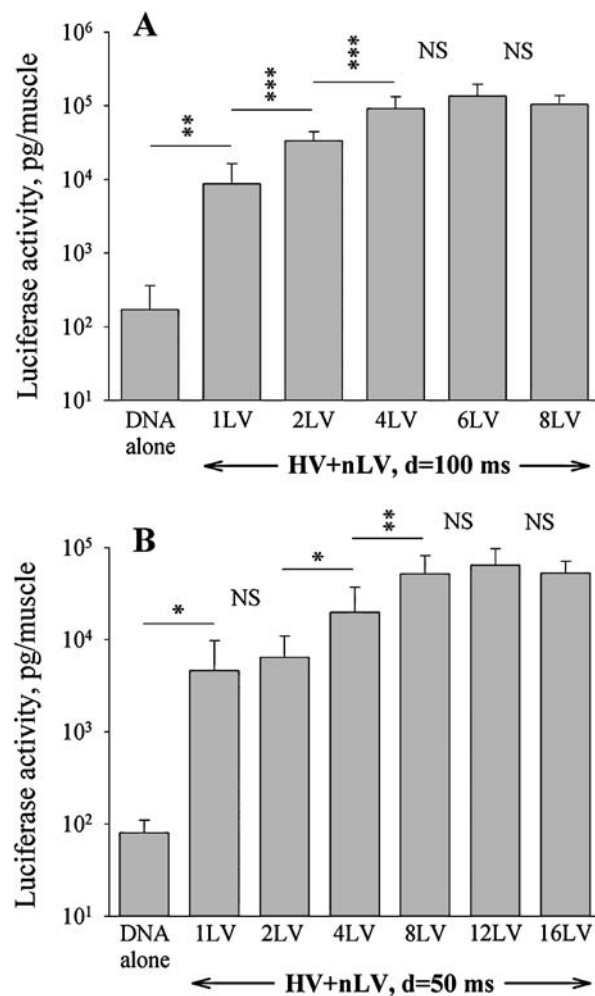


FIG. 2. Luciferase expression after DNA electrotransfer based on a combination of one HV pulse (800 V/cm and 100 μ sec) and a various number of LV pulses (80 V/cm and 100 msec) (HV+nLV pulse combinations): (A) using various numbers (n) of LV pulses, each with a duration d of 100 msec; (B) using various numbers (n) of LV pulses, each with a duration d of 50 msec; (C) using various numbers (n) of LV pulses of various durations d such that the product $n \times d$ is constant and equal to 400 msec. Data are presented as means $\pm$ SD. The significance of differences between neighboring groups was calculated by t tests and is indicated by asterisks (* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; NS, not significant). Each column represents results from 10 muscles treated during one experiment (A and B) or from at least 16 muscles treated in two experiments (C).

(e.g., 60 V/cm, as in Fig. 3) could be counterbalanced by the use of longer pulses. We thus compared several combinations of one HV and four LVs, using LVs of either 60 or 80 V/cm and individual pulse durations between 100 and 800 msec (Fig. 4).

With one HV and four LVs at a pulse strength of 80 V/cm we obtained similar luciferase expression at the three LV pulse durations tested (100, 200, and 400 msec) (Fig. 4). With one HV and four LVs at a pulse strength of 60 V/cm and a pulse duration of 400 msec we obtained a result similar to those achieved under the previously tested conditions at 80 V/cm, whereas at a longer pulse duration (800 msec), luciferase expression was significantly higher with respect to the 80-V/cm, 100-msec pulses (Fig. 4).

GFP fluorescence observations

The distribution and intensity of the fluorescence within muscles after electrotransfer of the GFP gene were qualitatively and semiquantitatively measured with a fluorescence stereo microscope (Fig. 5). For the electrotransfer of the GFP gene we used one HV of 100 μ sec and 800 V/cm followed after a 1-sec delay by one 400-msec LV pulse of either 60, 80, or 100 V/cm. Pictures were taken either at a constant exposure time (100 msec; Fig. 5A–C) or

at a variable exposure time, that is, allowing the camera to adjust the exposure time to acquire an equivalent amount of light from picture to picture (Fig. 5D–F). These pictures represent the images observed in four muscles for each experimental condition. Two series of pictures are reported to show the reproducibility of the results as well as the large increase in fluorescence with the increase in field strength of the LV pulses (Fig. 5A–C). Quantitative analysis of the mean density of the green color in these images sustains the qualitative data: at a relative scale with 256 levels of intensity, levels 41 (left muscle) and 33 (right muscle) were reached at 60 V/cm (Fig. 5A), whereas levels 111 and 89 were reached at 80 V/cm (Fig. 5B) and levels 138 and 127 were reached at 100 V/cm (Fig. 5C). These pictures also show that the volume of transfected (fluorescent) muscle is similar whatever the LV field strength (Fig. 5D–F). These data suggest that the overall increase in fluorescence results from an increase in the fluorescence of each fiber, and not from an increase in the volume (and thus the number) of muscle fibers susceptible to fluorescence.

DISCUSSION

Using combinations of HV and LV pulses, we previously showed that *in vivo* DNA electrotransfer is a multistep process

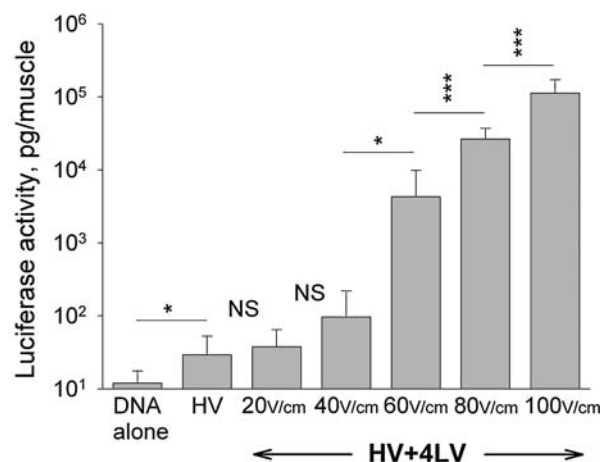


FIG. 3. Luciferase expression after DNA electrotransfer based on a combination of one HV pulse (800 V/cm and 100 μ sec) and four 100-msec LV pulses as a function of the strength of the LV pulses. Data are presented as means $\pm$ SD. The significance of differences between neighboring groups was calculated by *t* tests and is indicated by asterisks (**p* < 0.05; ****p* < 0.001; NS, not significant). Each column represents results from 10 muscles treated in one experiment.

that includes DNA distribution, cell permeabilization, and DNA electrophoresis (Šatkauskas *et al.*, 2002). We found that the role of the HV pulse was limited mainly to cell permeabilization, whereas LV pulses had a direct effect on DNA, probably DNA electrophoresis. However, the interplay between HV and LV pulses, and how the parameters of HV and LV pulses influenced DNA electrotransfer, were still unclear. In elegant *in vitro* experiments using 1, 2, and 3% agarose gels and pulses similar to our LV pulses, Zaharoff and Yuan (2004) analyzed DNA electromobility: they showed that, using pulses of 10 to 99 msec at 100 to 400 V/cm (comparable to our LV pulses), plasmids were transported over distances longer, by two to three orders of magnitude, than those achieved with pulses of 99 μ sec at 2.0 kV/cm (comparable to our HV pulses). We discuss here both old and new data on the influence of HV and LV pulses on DNA electrotransfer efficacy in light of these *in vitro* data.

It was known that one 100- μ sec HV pulse alone is not sufficient for efficient DNA electrotransfer (Šatkauskas *et al.*, 2002); this could be due to insufficient electrophoretic transport of DNA into the tissue. Interestingly, the data reported here show that neither HV pulse duration nor the number of HV pulses had an effect on DNA electrotransfer efficiency. Because eight HVs permeabilize muscle to a significantly greater extent than one HV (Bureau *et al.*, 2000), it seems possible that the achievement of optimal permeabilization by the HV is not critical for effective DNA electrotransfer, at least under the experimental conditions in which LV pulses are optimal or close to optimal (e.g., four LVs at 80 V/cm and 100 msec). Thus muscle must be permeabilized to some extent but not necessarily to the optimal level. This is also supported by our previous studies on the kinetics of membrane resealing after the permeabilization of muscle with one HV of 800 V/cm and 100 μ sec: even though the level of muscle permeabilization after one HV pulse significantly decreased after 300 sec, high and similar lev-

els of DNA electrotransfer and gene expression were still reached with combinations of HV and LVs in which the four LVs were delivered even 3000 sec after the HV (Šatkauskas *et al.*, 2002). Nevertheless, HV delivery is prerequisite, because the reverse order of the pulses, that is, an LV plus HV sequence, resulted in levels of DNA expression as low as those obtained by the delivery of one HV pulse alone (Šatkauskas *et al.*, 2002).

Contrary to the HV pulse, DNA electrotransfer efficacy is highly dependent on the electrical parameters of the LV pulses. For individual LV durations of 100 or 50 msec (Fig. 2A and B), DNA electrotransfer efficacy increased with the number and/or individual duration of the LV pulses until a plateau was reached, when the total duration of the LVs reached 400 msec. It is interesting to note that, with respect to total LV pulse duration, patterns of luciferase expression for both individual LV durations were similar (Fig. 2A and B). Because electrophoretic transport (and thus migration distance) in a given medium and at a given voltage depends mainly on the duration of the applied electric field, the results in Fig. 2A and B argue in favor of a true electrophoretic role for the LV pulses. The importance of the electrophoretic effects on DNA electrotransfer efficacy can be explained by the fact that DNA must overcome physical barriers in the interstitial space before achieving close contact with the permeabilized plasma membrane and crossing it. Electrophoretic transport should thus ensure DNA interaction with the permeabilized cell membrane, which explains why the efficiency of DNA electrophoresis governs the efficacy of DNA electrotransfer.

When comparing transfection efficacy levels produced by an identical total duration of LV pulses, but using four different durations for the individual LV pulses, significantly higher levels of gene expression were achieved with the longest individual LV pulses (Fig. 2C). At first glance, this does not seem compatible with the electrophoretic effect of LV pulses suggested previously. However, "compatibility" with a pure electrophoretic effect can

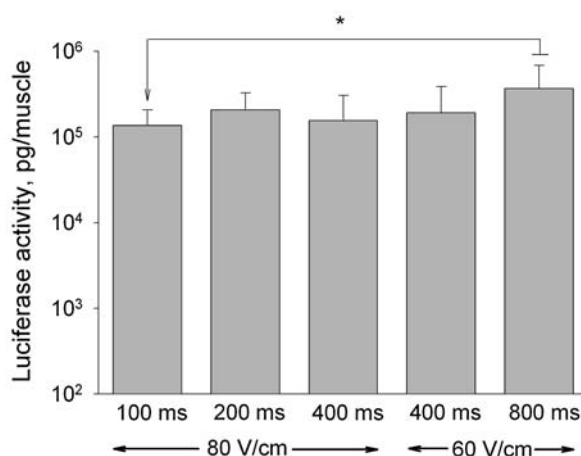


FIG. 4. Luciferase expression after DNA electrotransfer by combinations of one HV pulse (800 V/cm, 100 μ sec) and four LV pulses as a function of LV pulse strength and duration. Data are presented as means $\pm$ SD. A statistically significant difference, calculated by *t* tests, was found only between the 60-V/cm, 800-msec group and the 80-V/cm, 100-msec group, and is indicated by an asterisk (**p* < 0.05). Each column represents results from 10 muscles treated in one experiment.

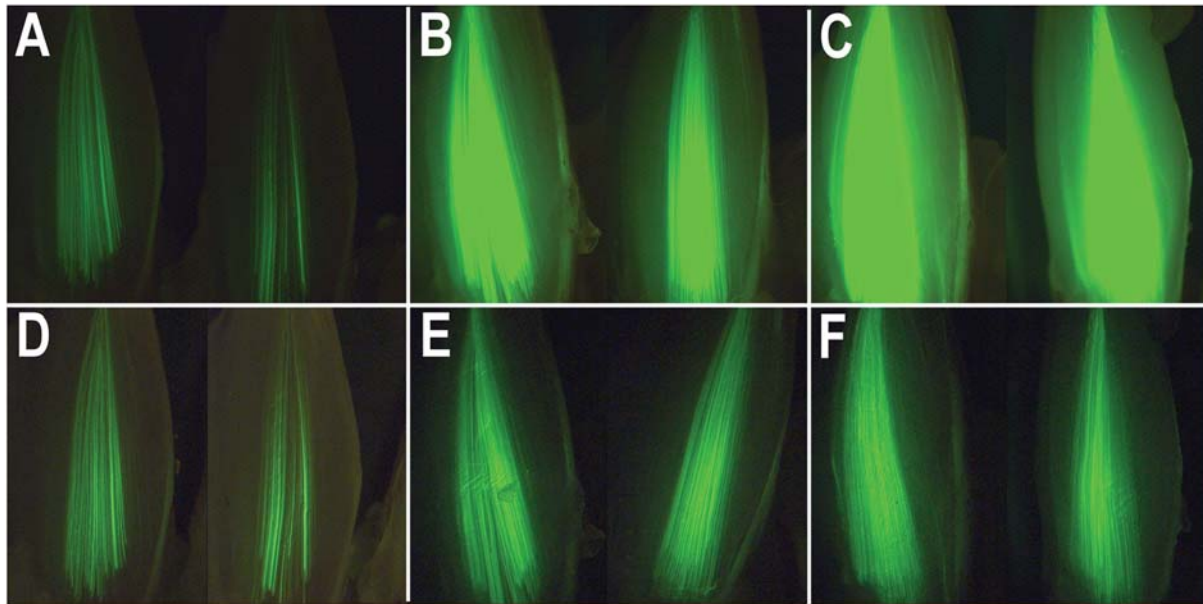


FIG. 5. GFP expression in tibialis cranialis muscles after DNA electrotransfer by combinations of one HV pulse (800 V/cm, 100 μ sec) and one LV pulse of 400 msec and either 60, 80, or 100 V/cm. (A and D) LV of 60 V/cm; (B and E) LV of 80 V/cm; (C and F) LV of 100 V/cm. (A–C) Camera exposure time was fixed at 100 msec. (D) Exposure times were 243 msec (left muscle) and 392 msec (right muscle). (E) Exposure times were 36 msec (left muscle) and 55 msec (right muscle). (F) Exposure time was 23 msec for both muscles. Representative images of four muscles treated under each of the experimental conditions are shown.

be shown by taking into account the *in vitro* results of Zaharoff and Yuan (2004) on the mobility in agarose gels of DNA molecules exposed to pulse durations similar to those of the LV pulses described here. The agarose gels used by these authors are supposed to mimic interstitial barriers in biological tissues. They found that the dependence of plasmid electromobility on pulse duration was not linear and displayed a sigmoid shape: at shorter durations electromobility is low, whereas with longer durations it increases, reaching a plateau at 50 msec in 1% agarose gels, and at higher pulse duration (80–100 msec) in more concentrated gels (2–3% agarose). Indeed, for a plasmid to move through the narrow passages in agarose gels, random coiled DNA should elongate in the direction of motion and shrink in the perpendicular direction (Zaharoff and Yuan, 2004). Then, if a long LV pulse is substituted by multiple shorter LV pulses, separated by 1 sec, the elongated plasmid relaxes between the pulses. The consecutive LV pulses must again align the plasmid along the direction of the electric field. This alignment takes time and therefore electrophoresis of the plasmid is not as efficient as in the case of a single but long pulse. Moreover, because tissue structure is much more complex than an agarose gel, electromobility of the plasmid should still be more dependent on pulse duration.

Plasmid DNA electrophoresis in tissues is further supported by another study by Zaharoff *et al.* (2002) showing that in tumors, electric pulses similar to the LV pulses used here can actually produce the electrophoretic migration of DNA over distances of about 1 μ m. Thus the LV pulses should be sufficient to bring the DNA from the bulk of the injected liquid into close contact with the permeabilized plasma membrane of the muscle cell and/or to contribute to translocation of the DNA through the permeabilized membrane. In addition to pure electrophoretic effects, it cannot be excluded that LV pulses might increase the myofiber perme-

abilization created by the HV pulse (in particular for the longest and more intense LV pulses). This might contribute to enhanced electrotransfer efficacy. However, the results of Fig. 1 clearly show that the level of cell permeabilization is not of primary importance. Moreover, the results of Fig. 2 strongly argue in favor of the hypothesis that efficacy of gene electrotransfer is governed mainly by the electrophoretic forces of the LV pulses.

When we tested various LV pulse field strengths (Fig. 3), the same low level of luciferase expression was achieved with LV pulses up to 40 V/cm than with the HV pulse alone (equivalent to the delivery of an LV at 0 V/cm). Low transfection efficiency using LV pulses of 20 or 40 V/cm may be explained by the absence of an “electrophoretic field” in the muscle, caused by the voltage drop across the skin. Indeed, even if skin is electroporeabilized, it still remains highly nonconductive, provoking a substantial voltage drop (data not shown). Thus, on the one hand, it is possible that with LVs of 20 or 40 V/cm the electrophoretic force in the muscle tissue was negligible and, on the other hand, that an increase in LV pulse amplitude from 60 to 100 V/cm resulted in a progressive increase in luciferase expression (Fig. 3), according to the basic rules of electrophoresis. Pulses of 60 V/cm and 20 to 83 msec in duration do not contribute to muscle fiber permeabilization (Gehl and Mir, 1999; Bureau *et al.*, 2000), even if they are delivered after one 100- μ sec HV (Mir *et al.*, in preparation). Thus, using pulses of 60 V/cm, only the electrophoretic effects of such pulses should be observed. Interestingly, the data reported in Fig. 4 demonstrate that long-enough pulses (400 msec) at 60 V/cm result in luciferase expression similar to that achieved with the 80-V/cm pulses, and that much longer pulses (800 msec) result in still higher luciferase expression. So, the decreased electrotransfer efficacy with the 60-V/cm LVs (at a du-

ration of 100 msec) can be fully compensated by an increase in pulse duration, which is in clear agreement with electrophoresis principles.

As expected from the results with the luciferase gene, the increase in field strength of the LVs resulted in an increase in GFP fluorescence (Fig. 5). Qualitative and quantitative data clearly showed that this increase in fluorescence resulted from the greater fluorescence of each fiber; the volume of tissue affected by the electrotransfer remained the same. This is in agreement with the previous assignment of roles of the HV and LV pulses. The experiments reported in Fig. 5D–F show that the same volume of tissue was affected by the DNA electrotransfer, which was expected because the same HV pulse was used under the three experimental conditions. Within the volume of tissue affected by the HV pulse, the fluorescence of the individual fibers increased with an increase in the strength of the LVs from 60 to 100 V/cm (Fig. 5A–C). The increase in electrophoretic effect should bring more plasmid molecules in contact with the electroporabilized membrane and, consequently, more plasmid molecules should be able to cross the plasma membrane, resulting in the observed enhancement of the efficacy of DNA electrotransfer.

The electrophoretic effect of LV pulses may contribute to increased transfection efficacy in several ways. First, they may induce sufficient DNA electrophoresis to bring plasmid DNA from the bulk of the interstitium into contact with permeabilized membranes. Second, when the plasmid molecules are already in contact with permeabilized membranes, the electrophoretic force of LV pulses may facilitate translocation of the plasmid molecules into the cells.

In conclusion, consistent with previous *in vitro* reports and our previous *in vivo* work, the present study confirms that efficient electrogene transfer is based on at least two distinct effects exerted by the electric pulses: cell permeabilization and DNA electrophoresis. The results of the current study highlight the importance of *in vivo* DNA electrophoresis in electrotransfer efficacy. We demonstrate that, provided some muscle permeabilization is achieved by the prerequisite HV pulse, DNA electrotransfer efficiency is governed by the electrophoretic effect of the LV pulse(s). These results provide new avenues for further optimization of *in vivo* electrogene therapy.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has been supported through various grants from the CNRS; the Institut Gustave-Roussy; Aventis-Gencell; the EU Commission (Project QLK3-1999-00484 within the fifth FP); the Ministry of Education, Science, and Sports (MESS) of the Republic of Slovenia; and the Lithuanian State Science and Studies Foundation (K-C 17/2). Exchanges have been possible also thanks to the bilateral program of scientific, technological, and cultural cooperation between the CNRS (Project 5386) and MESS (Proteus program). The authors acknowledge Tamsin Wright Carpenter for linguistic revisions of this paper and also thank the staff of the Service Commun d'Expérimentation Animale of the IGR for animal maintenance. During part of this work, S.Š. was the recipient of a research grant from Aventis to L.M.M.

REFERENCES

- AIHARA, H., and MIYAZAKI, J. (1998). Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* **16**, 867–870.
- ANDRÉ, F., and MIR, L.M. (2004). DNA electrotransfer: Its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther.* **11**(Suppl. 1), S33–S42.
- AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., and STRUHL, K. (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. (John Wiley & Sons, New York).
- BETTAN, M., EMMANUEL, F., DARTEIL, R., CAILLAUD, J.M., SOUBRIER, F., DELAERE, P., BRANELEC, D., MAHFOUDI, A., DUVERGER, N., and SCHERMAN, D. (2000). High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol. Ther.* **2**, 204–210.
- BUREAU, M.F., GEHL, J., DELEUZE, V., MIR, L.M., and SCHERMAN, D. (2000). Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 353–359.
- GEHL, J., and MIR, L.M. (1999). Determination of optimal parameters for *in vivo* gene transfer by electroporation, using a rapid *in vivo* test for cell permeabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 377–380.
- GEHL, J., SKOVSGAARD, T., and MIR, L.M. (1998). Enhancement of cytotoxicity by electroporation: An improved method for screening drugs. *Anticancer Drugs* **9**, 319–325.
- GEHL, J., SØRENSEN, T.H., NIELSEN, K., RASKMARK, P., NIELSEN, S.L., SKOVSGAARD, T., and MIR, L.M. (1999). *In vivo* electroporation of skeletal muscle: Threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**, 233–240.
- GLASS, L.F., JAROSZESKI, M., GILBERT, R., REINTGEN, D.S., and HELLER, R. (1997). Intralesional bleomycin-mediated electrochemotherapy in 20 patients with basal cell carcinoma. *J. Am. Acad. Dermatol.* **37**, 596–599.
- GOLZIO, M., TEISSIE, J., and ROLS, M.P. (2002). Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1292–1297.
- HELLER, L., JAROSZESKI, M.J., COPPOLA, D., POTTINGER, C., GILBERT, R., and HELLER, R. (2000). Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas *in vivo*. *Gene Ther.* **7**, 826–829.
- HELLER, L.C., and COPPOLA, D. (2002). Electrically mediated delivery of vector plasmid DNA elicits an antitumor effect. *Gene Ther.* **9**, 1321–1325.
- HELLER, R., JAROSZESKI, M., ATKIN, A., MORADPOUR, D., GILBERT, R., WANDS, J., and NICOLAU, C. (1996). *In vivo* gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.* **389**, 225–228.
- KLENCHIN, V.A., SUKHAREV, S.I., SEROV, S.M., CHERNOMORDIK, L.V., and CHIZMADZHEV, Y. (1991). Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis. *Biophys. J.* **60**, 804–811.
- MATSUMOTO, T., KOMORI, K., SHOJI, T., KUMA, S., KUME, M., YAMAOKA, T., MORI, E., FURUYAMA, T., YONEMITSU, Y., and SUGIMACHI, K. (2001). Successful and optimized *in vivo* gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse. *Gene Ther.* **8**, 1174–1179.
- MIKLAVČIČ, D., ŠEMROV, D., MEKID, H., and MIR, L.M. (2000). A validated model of *in vivo* electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1523**, 73–83.
- MIR, L.M., BELEHRADEK, M., DOMENGE, C., ORLOWSKI, S., PODDEVIN, B., BELEHRADEK, J., SCHWAAB, G., LUBOINSKI, B., and PAOLETTI, C. (1991a). [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C. R. Acad. Sci. III* **313**, 613–618.
- MIR, L.M., ORLOWSKI, S., BELEHRADEK, J., and PAOLETTI, C. (1991b). Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur. J. Cancer* **27**, 68–72.

- MIR, L.M., BUREAU, M.F., RANGARA, R., SCHWARTZ, B., and SCHERMAN, D. (1998a). Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C. R. Acad. Sci. III* **321**, 893–899.
- MIR, L.M., GLASS, L.F., SERSA, G., TEISSIE, J., DOMENGE, C., MIKLAVČIČ, D., JAROSZESKI, M.J., ORLOWSKI, S., REINTGEN, D.S., RUDOLF, Z., BELEHRADEK, M., GILBERT, R., ROLS, M.P., BELEHRADEK, J., BACHAUD, J.M., DECONTI, R., STABUC, B., CEMAZAR, M., CONINX, P., and HELLER, R. (1998b). Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br. J. Cancer* **77**, 2336–2342.
- MIR, L.M., BUREAU, M.F., GEHL, J., RANGARA, R., ROUY, D., CAILLAUD, J.M., DELAERE, P., BRANELLEC, D., SCHWARTZ, B., and SCHERMAN, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4262–4267.
- MURAMATSU, T., SHIBATA, O., RYOKI, S., OHMORI, Y., and OKUMURA, J. (1997). Foreign gene expression in the mouse testis by localized *in vivo* gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 45–49.
- MURAMATSU, T., NAKAMURA, A., and PARK, H.M. (1998). *In vivo* electroporation: A powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals [review]. *Int. J. Mol. Med.* **1**, 55–62.
- NEUMANN, E., KAKORIN, S., TSONEVA, I., NIKOLOVA, B., and TOMOV, T. (1996). Calcium-mediated DNA adsorption to yeast cells and kinetics of cell transformation by electroporation. *Biophys. J.* **71**, 868–877.
- PODDEVIN, B., ORLOWSKI, S., BELEHRADEK, J., and MIR, L.M. (1991). Very high cytotoxicity of bleomycin introduced into the cytosol of cells in culture. *Biochem. Pharmacol.* **42**(Suppl.), S67–S75.
- RODRIGUEZ, C., BARROSO, B., ALMANZA, E., CRISTOBAL, M., and GONZALEZ, R. (2002). Electrochemotherapy in primary and metastatic skin tumors: Phase II trial using intralesional bleomycin. *Arch. Med. Res.* **32**, 273–276.
- ROLS, M.P., DELTEIL, C., GOLZIO, M., DUMOND, P., CROS, S., and TEISSIE, J. (1998). *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat. Biotechnol.* **16**, 168–171.
- ŠATKAUSKAS, S., BUREAU, M.F., MAHFOUDI, A., and MIR, L.M. (2001). Slow accumulation of plasmid in muscle cells: Supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis. *Mol. Ther.* **4**, 317–323.
- ŠATKAUSKAS, S., BUREAU, M.F., PUC, M., MAHFOUDI, A., SCHERMAN, D., MIKLAVČIČ, D., and MIR, L.M. (2002). Mechanisms of *in vivo* DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporabilization and DNA electrophoresis. *Mol. Ther.* **5**, 133–140.
- SERSA, G., STABUC, B., CEMAZAR, M., JANCAR, B., MIKLAVČIČ, D., and RUDOLF, Z. (1998). Electrochemotherapy with cisplatin: Potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. *Eur. J. Cancer* **34**, 1213–1218.
- SOUBRIER, F., CAMERON, B., MANSE, B., SOMARRIBA, S., DUBERTRET, C., JASLIN, G., JUNG, G., CAER, C.L., DANG, D., MOUVAULT, J.M., SCHERMAN, D., MAYAUX, J.F., and CROUZET, J. (1999). pCOR: A new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Ther.* **6**, 1482–1488.
- SUKHAREV, S.I., KLENCHIN, V.A., SEROV, S.M., CHERNOMORDIK, L.V., and CHIZMADZHEV, Y. (1992). Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells: The effect of DNA interaction with electropores. *Biophys. J.* **63**, 1320–1327.
- SUZUKI, T., SHIN, B.C., FUJIKURA, K., MATSUZAKI, T., and TAKATA, K. (1998). Direct gene transfer into rat liver cells by *in vivo* electroporation. *FEBS Lett.* **425**, 436–440.
- TITOMIROV, A.V., SUKHAREV, S., and KISTANOVA, E. (1991). *In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim. Biophys. Acta* **1088**, 131–134.
- WELLS, J.M., LI, L.H., SEN, A., JAHREIS, G.P., and HUI, S.W. (2000). Electroporation-enhanced gene delivery in mammary tumors. *Gene Ther.* **7**, 541–547.
- ZAHAROFF, D.A., and YUAN, F. (2004). Effects of pulse strength and pulse duration on *in vitro* DNA electromobility. *Bioelectrochemistry* **62**, 37–45.
- ZAHAROFF, D.A., BARR, R.C., LI, C.Y., and YUAN, F. (2002). Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.* **9**, 1286–1290.
- ZHANG, L., LI, L., HOFFMANN, G.A., and HOFFMAN, R.M. (1996). Depth-targeted efficient gene delivery and expression in the skin by pulsed electric fields: an approach to gene therapy of skin aging and other diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **220**, 633–636.

Address reprint requests to:

Dr. Lluís M. Mir
UMR 8121 CNRS-Institut Gustave Roussy
39 Rue C. Desmoulins
F-94805 Villejuif Cédex, France

E-mail: luismir@igr.fr

Received for publication February 20, 2005; accepted after revision July 28, 2005.

Published online: September 23, 2005.

*Etude de l'impulsion perméabilisante
(HV) dans divers tissus.*

B. Etude de l'impulsion perméabilisante (HV) dans divers tissus

Une fois les deux rôles des impulsions HV et LV bien caractérisés, nous avons étudié plus en profondeur l'impulsion perméabilisante dans divers tissus. Nous avons également, dans une moindre mesure, précisé un peu l'importance de l'impulsion perméabilisante dans certains tissus.

1. Muscle

Le transfert d'ADN dans le muscle squelettique possède de nombreuses applications liées à : son accessibilité, sa facilité de transfection et au fait que le muscle peut être utilisé comme un organe sécréteur pour une expression à long terme (Mir, Bureau *et al.* 1999). Cette capacité à produire et sécréter des protéines biologiquement actives dans la circulation sanguine lui permet d'obtenir des effets sur des cibles lointaines et/ou multiples (Bettan, Emmanuel *et al.* 2000).

Au-delà de la possible correction de maladies musculaires par le transfert direct d'ADN thérapeutique dans le muscle, d'autres désordres métaboliques d'origine génétique pourraient être corrigés après un transfert d'ADN efficace dans le muscle. De plus, le transfert d'ADN dans le muscle a aussi été utilisé à des fins d'immunisation même s'il n'est actuellement pas connu si la présentation de l'antigène est effectuée par les cellules musculaires elles-mêmes ou par les quelques cellules dendritiques présentes dans le muscle. C'est pourquoi, le muscle squelettique, parmi les différents tissus sains, est la cible principale pour l'électrotransfert d'ADN à des fins thérapeutiques.

a) Importance de la température de récupération de l'échantillon

Dans le cadre d'expériences préliminaires nous nous sommes d'abord attachés à déterminer les conditions optimales pour la préparation de l'échantillon et pour la mesure de l'activité de la luciférase. Ainsi il est important de mettre l'échantillon de muscle dans de la glace juste après son prélèvement car la luciférase est très rapidement dégradée une fois le tissu mort (figure 22) ce qui est à la fois une source de perte de signal et de variabilité.

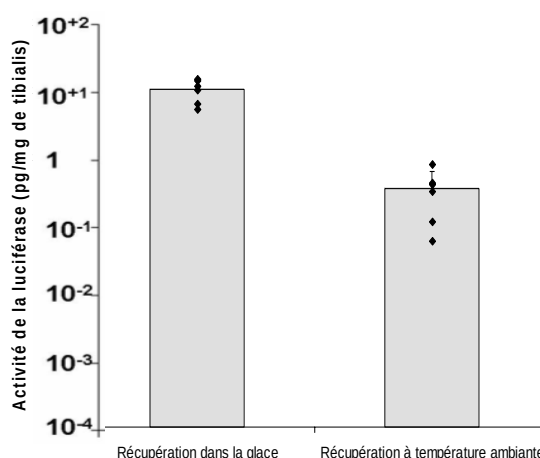


Figure 22 : Activité de la luciférase en fonction du protocole de récupération du muscle. Activité mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles (1HV 800V/cm 100µs, 0s délai, 1LV 400ms 80V/cm ; 20µl de plasmide pCMVLuc 0,5µg/µl dans du PBS).

b) Influence du voltage de l'impulsion perméabilisante

Nous avons ensuite vérifié l'influence du voltage de l'impulsion perméabilisante (HV) de manière quantitative, en utilisant le gène de la luciférase (figure 23).

20µl de plasmide pCMVLuc (0,5µg/µl dans du PBS) ont été injectés lentement dans des muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles, suivi de l'application d'impulsions électriques (1HV 100µs, pas de délai, 1LV 80 V/cm 400ms). L'efficacité de transfection a été évaluée 2 jours après l'électrotransfert par quantification de l'activité de la luciférase contenue dans des extraits des muscles tibialis transfectés.

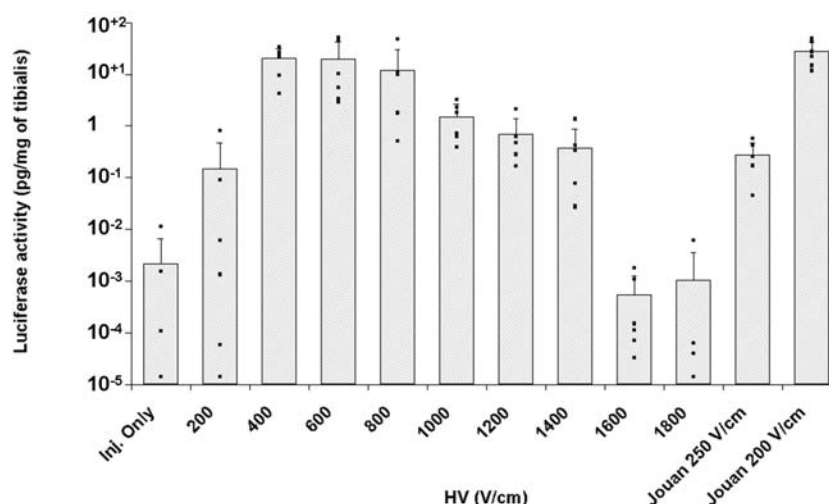


Figure 23 : Influence de la valeur du champ électrique appliqué pour le HV sur l'efficacité du transfert de gènes dans le muscle tibialis cranialis de souris C57Bl/6. Activité de la luciférase mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert (1HV 100µs, 0s délai, 1LV 80 V/cm 400 ms) de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles (n=6).

Le voltage optimal pour l'impulsion perméabilisante semble être compris entre 400 et 600 V/cm, mais le transfert est encore très bon à 800 V/cm. Il y a ensuite une diminution progressive de l'expression du gène entre 1000 et 1400 V/cm, alors que l'expression du gène de la luciférase disparaît à partir de 1600 V/cm, probablement du à l'apparition de lésions permanentes du muscle. Par rapport au niveau d'expression obtenu par l'utilisation de trains d'impulsions carrées identiques (générateurs Jouan), l'efficacité est similaire.

c) Effet d'un délai entre le HV et le LV

Nous avons ensuite évalué l'effet d'un délai entre l'application de l'impulsion HV et l'application de l'impulsion LV, en reproduisant la même expérience mais avec 1s de délai entre le HV et le LV (voir figure 24).

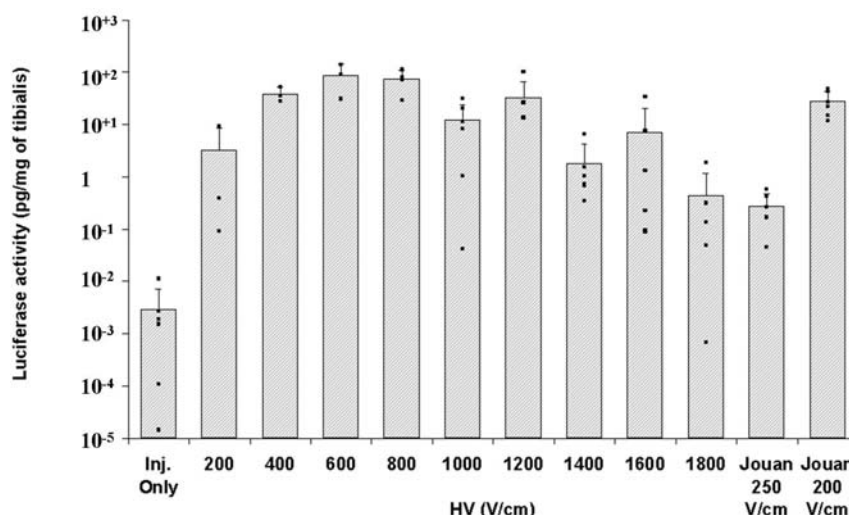


Figure 24 : Influence de la valeur du champ électrique appliqué pour le HV sur l'efficacité du transfert de gènes dans le muscle tibialis cranialis de souris C57Bl/6. Activité de la luciférase mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert (1HV 100 μ s, 1s de délai, 1LV 80 V/cm 400 ms) de muscles tibialis cranialis de souris C57Bl/6 femelles (n=6).

Quel que soit le voltage utilisé l'efficacité de transfert semble légèrement augmentée par rapport à l'électrotransfert sans délai entre le HV et le LV (figure 23). L'optimum est décalé entre 600 et 800 V/cm, mais le niveau d'expression est déjà presque maximal dès 400V/cm. Aux fortes valeurs de champ électrique, il y a toujours une décroissance progressive de l'expression du gène, mais cependant beaucoup plus lente et sans atteindre la suppression complète de l'expression. Cette fois ci, par rapport au niveau d'expression obtenu par l'utilisation de trains d'impulsions carrée identiques (générateurs Jouan), l'efficacité semble légèrement supérieure.

Dans cette expériences on voit qu'avec le générateur Jouan une légère déviation autour de la valeur optimale de champ électrique résulte en une décroissance rapide de l'expression du gène (comparer l'expression à 200 V/cm avec celle à 250 V/cm) alors qu'avec les impulsions HV+LV la gamme de valeurs optimales pour l'impulsion perméabilisante est extrêmement large (plus de 400 V/cm). Et plus précisément, avec le générateur Jouan, une augmentation de 25% du champ électrique appliqué (de 200V/cm à 250V/cm) résulte en une baisse d'efficacité de transfection identique à celle obtenue pour une variation de plus de 50% (de 1200V/cm à 1800V/cm sur la figure 24 et de 800V/cm à 1400V/cm sur la figure 23) du champ électrique appliqué dans le cadre des impulsions HV+LV.

L'effet d'un délai peut être analysé au travers de la connaissance théorique de la perméabilisation d'une membrane dans des cellules exposées à de forts champs électriques externes. Il est largement reconnu 1) que la force du champ électrique externe détermine la surface de la membrane de la cellule qui sera électroperméabilisée (voir chapitre V.C.2. de l'introduction bibliographique), et 2) que durant l'impulsion, un nombre important de défauts (« électropores ») se referment très rapidement après l'application du pulse (avec un temps de refermeture bien inférieur aux 1000ms du délai utilisé ici) (Teissie, Golzio *et al.* 2005). Selon cette théorie, la plupart de ces électropores se referment rapidement après la fin de l'impulsion, à l'exception de certains défauts un peu plus stables (électropores métastables) qui se referment lentement. La demi-vie de ces structures dépend de la température mais peut atteindre des durées de l'ordre de la seconde ou de la minute. Si on prend ceci en considération, lorsqu'il n'y a pas de délai entre les impulsions HV et LV, le fait qu'il n'y ait pas d'interruption du champ électrique pourrait permettre aux électropores à courte durée de vie de se maintenir ouvert plus longtemps et devraient ainsi contribuer à faciliter le transfert de l'ADN. Ainsi, lorsque de forts voltages sont utilisés en l'absence de délais, le nombre d'électropores générés est plus important et leur maintien pendant une durée plus longue entraînerait des lésions cellulaires provoquant une baisse de l'efficacité de transfection

observée. Si un délai d'une seconde est appliqué, les électropores à courte durée de vie se referment et des champs électriques plus intenses sont nécessaires pour obtenir une altération équivalente avec les électropores métastables. Du coup, l'utilisation de champs électriques élevés n'est plus aussi endommageante pour les cellules car la fermeture des électropores pendant le délai augmente la stabilité de la membrane et protège la cellule. On voit que dans le cadre de cette théorie les différences observées à « haut voltage » avec et sans délai s'expliquent convenablement. Par contre les différences observées, avec et sans délai à 200 V/cm nécessitent une autre explication.

2. Tumeur

Le traitement des tumeurs est l'un des objectifs les plus développés des essais cliniques en thérapie génique. Les tumeurs constituent donc un tissu cible très intéressant en termes d'application. De plus, d'un point de vue recherche fondamentale, les tumeurs sont des tissus très différents des fibres musculaires en termes de taille de cellules et de paramètres histologiques, ce qui doit résulter en un comportement différent vis-à-vis de l'électrotransfert.

a) Intérêt du mélanome B16 comme modèle pour l'étude de l'électrotransfert de tumeur

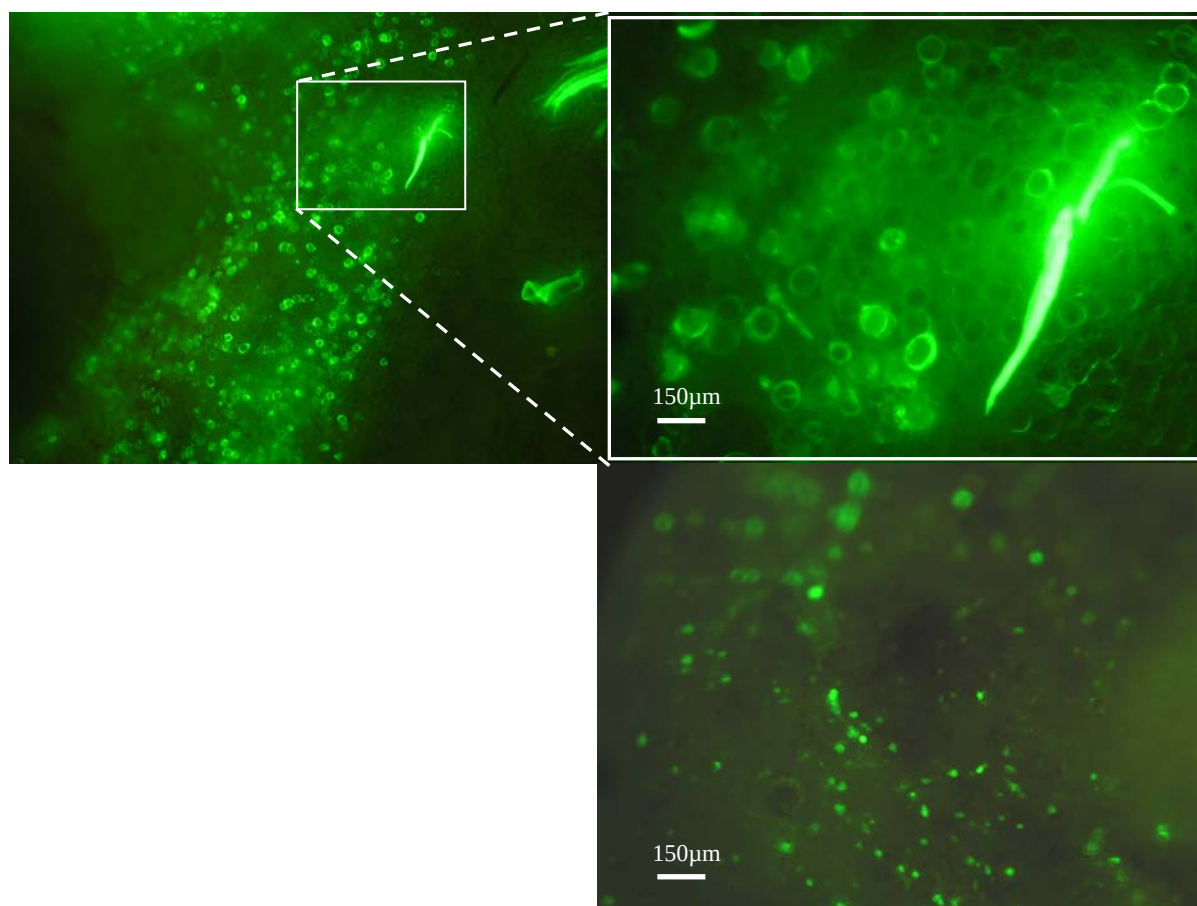


Figure 25 : Observation à la loupe binoculaire à fluorescence de mélanomes humains Na11, 2 jours après électrotransfert avec un plasmide pEGFPN1 (1HV 1000V/cm 100µs, 1s délai, 1LV 400ms 100V/cm ; 50µl de plasmide pEGFPN1 à 1µg/µl dans du PBS). En haut : adipocytes et fibre musculaire, inclus dans la tumeur et exprimant la GFP. En bas : cellules tumorales exprimant la GFP. Les cellules tumorales se distinguent des adipocytes par leur taille plus petite et par le fait que seule la périphérie de l'adipocyte exprime la GFP. En effet l'adipocyte est composé d'une large vacuole de triglycérides entourée d'une fine couche de cytoplasme.

Le choix du mélanome B16F10 est motivé par plusieurs raisons. En premier lieu c'est un modèle classique de tumeur. De plus les études préliminaires d'injectabilité des tumeurs que nous avons réalisées précédemment ont montré que les mélanomes B16F10 étaient parmi les plus faciles à injecter (voir figures 7 et 9). Enfin, les études qualitatives de transfection de différentes tumeurs en utilisant le gène de la GFP ont aussi montré que le mélanome B16F10 était l'une des seules tumeurs à ne pas incorporer d'autres types cellulaires en son sein (fibres musculaires, adipocytes,... voir cas du mélanome humain Na11 en figure 25). Ces cellules ayant un diamètre plus important que les cellules tumorales elles seront transfectées en premier (l'adipocyte a une taille comprise entre 70 et 120µm contre 50µm environ pour les fibres musculaires et aux alentours de 15µm pour une cellule B16). De plus la couleur noire des cellules du mélanome permet, lors de la récupération de l'échantillon, d'être sûr de n'avoir récupéré que la tumeur et pas des tissus environnants (généralement de couleur rosée). Cette certitude de n'avoir dans l'échantillon récupéré que des cellules tumorales est fondamentale dans le cadre d'une étude quantitative utilisant le gène de la luciférase. En effet, après broyage de l'échantillon il est impossible de savoir si l'activité de l'enzyme mesurée au luminomètre provient des cellules tumorales ou d'autres types cellulaires qui étaient inclus dans la tumeur (cellules adipeuses, fragments de muscles envahis par la tumeur,...).

b) Influence du voltage de l'impulsion perméabilisante

Nous avons utilisé la même démarche générale que dans le cas de l'étude du muscle. Une injection de 50µl de plasmide (1µg/µl dans du PBS) a été réalisée dans des mélanomes B16F10 transplantés, en sous cutané dans le flanc, une semaine auparavant, dans des souris C57Bl/6 femelles. Des impulsions électriques ont été délivrées, trente secondes après l'injection intratumorale, au moyen d'électrodes à plaques espacées de 5 mm. Comme pour le muscle nous avons d'abord étudié l'influence du voltage de l'impulsion perméabilisante (HV) sur l'efficacité de transfection (figure 26).

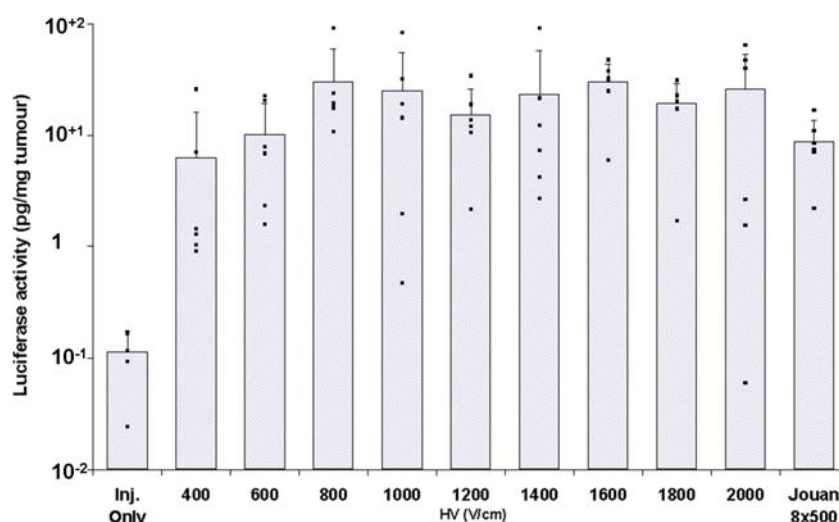


Figure 26 : Influence de la valeur du champ électrique appliqué pour le HV sur l'efficacité du transfert de gènes dans le mélanome B16F10. Activité de la luciférase mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert (1HV 100µs, pas de délai, 1LV 400 ms 140 V/cm) (n=6).

Les résultats ne montrent pas de vrai maximum mais plutôt un plateau qui est atteint à partir de 800V/cm. On n'observe pas non plus de réelle décroissance de l'efficacité de transfection même aux plus hautes valeurs testées (maximum de la machine 2000V/cm). L'utilisation de la combinaison d'impulsions HV+LV permet obtenir une efficacité de transfection dans le

mélanome B16 qui semble être légèrement supérieure à celle obtenue par l'utilisation classique d'un train d'impulsions carrées répétées identiques (générateur Jouan).

De nombreux facteurs peuvent expliquer la largeur du plateau et la plus forte variabilité observée :

- l'hétérogénéité de la taille des cellules tumorales et de leur orientation. En effet la tumeur ne doit pas être considérée comme une population unique mais plutôt comme un ensemble de différentes sous populations, chacune étant plus ou moins facile à perméabiliser, donc à chaque voltage c'est une sous population différente qui est transfectée,
- l'existence au centre de la tumeur d'une zone nécrotique (donc non transfectable) de taille variable selon les tumeurs peut expliquer aussi une partie de la variabilité observée.

Cette expérience *in vivo* est en accord avec le modèle théorique de l'électroperméabilisation selon lequel la valeur seuil d'efficacité de perméabilisation dépend du diamètre de la cellule (voir équation 3 au paragraphe V.B.2.b.(2).(b) de l'introduction bibliographique de cette thèse). En effet, les cellules B16F10 ont un diamètre beaucoup plus petit que celui des fibres musculaires (environ 50µm pour une cellule musculaire contre 15µm pour une cellule B16) ce qui explique pourquoi l'optimum de perméabilisation est atteint pour des valeurs de champ plus élevées (800V/cm) dans le cas du mélanome que dans le cas du muscle (entre 400 et 600V/cm). C'est aussi la raison pour laquelle avec le générateur Jouan (1 train de 8 impulsions de 20ms) l'impulsion optimale est à 500V/cm (Bettan, Ivanov *et al.* 2000) et non plus 200V/cm comme dans le cas du muscle.

c) Effet d'un délai entre le HV et le LV

L'effet d'un délai entre le HV (1HV, 1300V/cm, 100µs) et le LV (1LV, 400ms 140V/cm) a aussi été exploré. Les résultats (voir figure 27) montrent que dans le cas du mélanome B16F10 il n'y a pas d'influence d'un délai d'1s. L'effet du délai étant relativement faible, il peut cependant être masqué par la variabilité et l'hétérogénéité mentionnées précédemment.

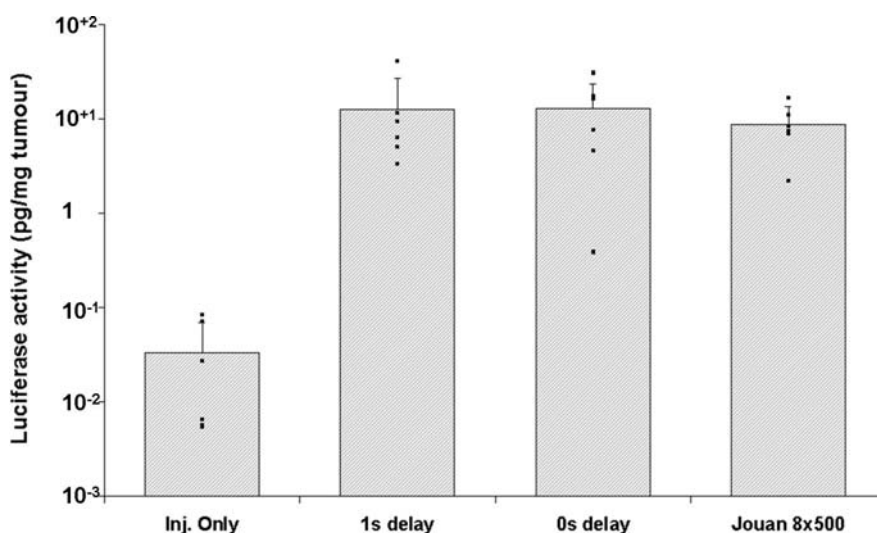


Figure 27 : Influence d'un délai de 1s entre le HV et le LV sur l'efficacité du transfert de gènes dans le mélanome B16F10. Activité de la luciférase mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert (1HV 1300V/cm 100µs, 1LV 400 ms 140 V/cm) (n=6).

d) Influence du voltage de l'impulsion électrophorétique

L'influence de la valeur du champ électrique appliqué pour l'impulsion LV a aussi été étudiée (1HV 100µs 800V/cm, pas de délai, 1LV 400ms) (voir figure 28).

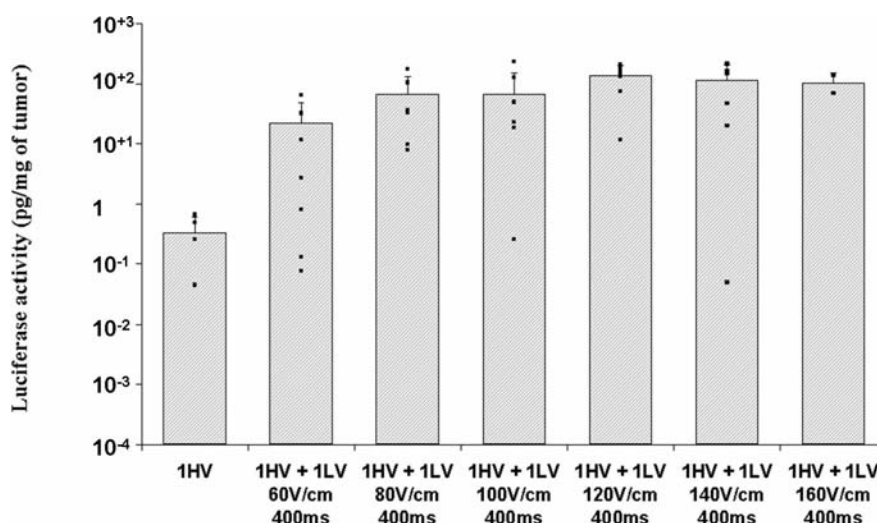


Figure 28 : Influence de la valeur du champ électrique appliqué pour le LV sur l'efficacité du transfert de gènes dans le mélanome B16F10. Activité de la luciférase mesurée au luminomètre deux jours après électrotransfert (1HV 800V/cm 100µs, pas de délai, 1LV 400 ms) (n=6).

Le plateau est atteint à partir de 80V/cm et s'étend au moins jusqu'à 160V/cm. L'utilisation d'un HV seul permet déjà une légère transfection des cellules tumorales (comparer avec le témoin injection seul de la figure 27), mais l'application d'une impulsion électrophorétique après l'impulsion perméabilisante est nécessaire pour obtenir une transfection réellement efficace des cellules tumorales. Cette observation est conforme à la théorie selon laquelle l'impulsion HV ne fait que perméabiliser les cellules et qu'il faut une impulsion LV pour permettre à l'ADN d'atteindre les cellules perméabilisées.

Aucun effet délétère n'est observé même à 160V/cm car le seuil de perméabilisation irréversible de la cellule tumorale se situe bien au-delà et l'impulsion HV choisie n'est pas non plus proche du seuil de perméabilisation irréversible.

Le plateau observé pour l'impulsion électrophorétique n'est cette fois pas dû à l'hétérogénéité de la tumeur en terme de seuil de perméabilisation. En effet les impulsions LVs utilisées ici sont trop faibles pour avoir un effet toxique ou perméabilisant sur les cellules tumorales. De plus il a été montré *ex vivo* et *in vitro* (Zaharoff, Barr *et al.* 2002; Zaharoff et Yuan 2004) que des impulsions de plusieurs dizaines de millisecondes permettent de provoquer un mouvement électrophorétique de l'ADN de quelques micromètres. Cette distance serait sans doute suffisante pour permettre aux molécules d'ADN plasmidique injectées dans la tumeur d'atteindre une cellule voisine. Ainsi lorsque l'on augmente la valeur du LV on augmente la distance parcourue par l'ADN (Zaharoff et Yuan 2004). Jusqu'à 80V/cm la distance parcourue n'est pas suffisante pour que tout l'ADN présent puisse atteindre une cellule, donc l'augmentation du voltage du LV se traduit par un accroissement de l'efficacité de transfection. On peut faire l'hypothèse qu'à partir de 80 V/cm, même les molécules d'ADN les plus éloignées parcourront une distance suffisante par électrophorèse pour atteindre une cellule, et qu'ainsi tout gain en terme de distance parcourue (augmentation du voltage du LV) n'augmentera donc plus l'efficacité de transfection, d'où le plateau observé.

3. Foie

Le foie, de par sa large masse, son accessibilité possible au moyen d'aiguilles transcutanées et ses fonctions métaboliques est aussi un tissu cible potentiel pour l'électrotransfert de gènes. De plus, le traitement de métastases implantées dans le parenchyme du foie devrait aussi être possible en électrotransfert. Enfin le foie possède une organisation cellulaire totalement différente de celle du muscle ou de la tumeur et devrait donc permettre une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'électrotransfert de gènes.

a) Intérêt de l'injection systémique par rapport à l'injection locale dans le cas de l'électrotransfert dans le foie

Dans un premier temps nous avons réalisé les expériences de transfection dans le foie en utilisant, comme pour les autres tissus, des injections locales. 250µl d'ADN (à 0,2µg/µl dans du PBS) étaient injectés localement dans le plus gros lobe gauche du foie de la souris. Pour éviter une fuite quasi immédiate du liquide injecté dans le système sanguin un clamp était posé, pendant toute la durée de l'injection, pour bloquer le flux sanguin sortant du lobe injecté (voir figure 12). Les impulsions électriques étaient ensuite appliquées au moyen d'électrodes à plaque (écartement de 3mm contre 5mm pour le muscle et la tumeur) entourant le lobe injecté. Les premières expériences qualitatives réalisées avec le plasmide pEGFPN1 ont montré que l'injection seule permettait déjà d'obtenir un très bon niveau d'expression, identique en apparence aux résultats obtenus avec l'électrotransfert (même apparence que sur la figure 13). A tel point que même les expériences quantitatives réalisées avec le plasmide pCMVLuc ne permettaient pas de voir une différence significative entre les lobes électrotransférés et les lobes injectés sans électrotransfert (Figure 29).

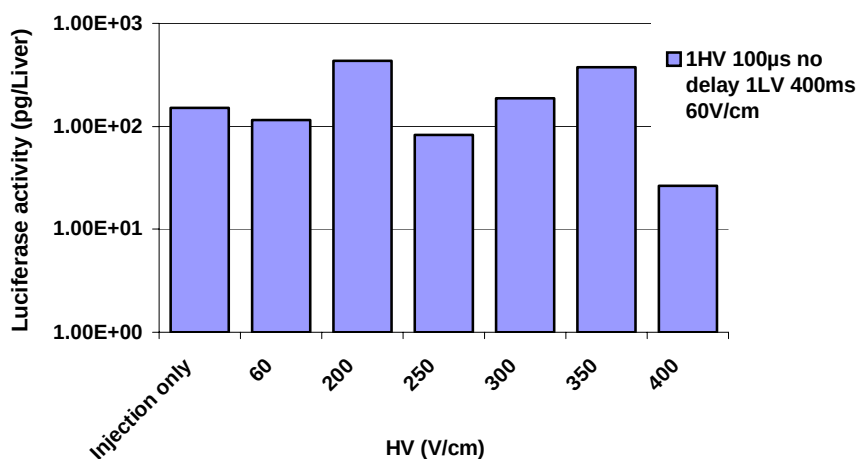


Figure 29 : Expression de la luciférase dans le lobe gauche du foie de souris C57Bl/6 femelles à différent temps après une injection locale du plasmide pCMVLuc (250µl à 0,2µg/µl), suivie ou non d'un électrotransfert (1HV 100µs, 0s délai, 1LV 400ms 60V/cm).

Ce résultat s'explique par le fait que l'injection locale d'un volume aussi grand que 250µl dans un seul lobe du foie de souris provoque un gonflement et un blanchiment du lobe injecté (voir figure 12) identiques à ceux observés lors de l'injection rapide d'un grand volume dans la veine de la queue par la méthode dite "hydrodynamique" (Wolff et Budker 2005)(voir figure 36 de l'introduction bibliographique de cette thèse).

Ainsi la pression résultant d'un tel volume injecté localement permet une altération de la membrane des cellules suffisante pour favoriser le transfert de gènes comme nous l'avons mentionné dans le chapitre I.B des résultats et dans l'article 1 sur l'injection rapide (Andre, Cournil-Henrionnet *et al.* 2006). L'effet de l'électrotransfert étant plus ou moins masqué par le transfert hydrodynamique, nous avons essayé de réduire l'effet de la pression. Dans un premier temps nous avons donc injecté très lentement la solution contenant l'ADN, mais le grand volume injecté entraînait une telle pression dans le lobe du foie qu'un transfert efficace était obtenu même avec une injection lente. L'efficacité de transfection par injection seule était bien réduite mais aucun effet de l'électrotransfert n'était encore visible. Nous avons alors injecté un volume beaucoup plus faible, le même que celui utilisé dans le cas du muscle (20µl à 0,5µg/µl). L'efficacité de transfection par injection seule a encore diminué, mais toujours aucun effet de l'électrotransfert n'était visible. En effet, la réduction du volume injecté a diminué l'efficacité de transfert non pas en réduisant les effets hydrodynamiques locaux mais simplement en réduisant le volume de tissu transfecté.

Finalement pour éviter tout effet hydrodynamique nous avons poursuivi l'expérience en réalisant des injections intraveineuses lentes d'un petit volume de liquide (100µl d'ADN à 0,8µg/µl).

Dans ces conditions, une activité très faible de la luciférase était détectée dès huit heures après injection, même en l'absence d'impulsions électriques. Mais plus aucune expression significative de l'enzyme n'était mesurée à partir de 24 ou 48 heures après injection (voir figure 30) (en effet le bruit de fond d'un lobe non traité se situe environ entre 1 et 2×10^{-3} pg de luciférase/lobe).

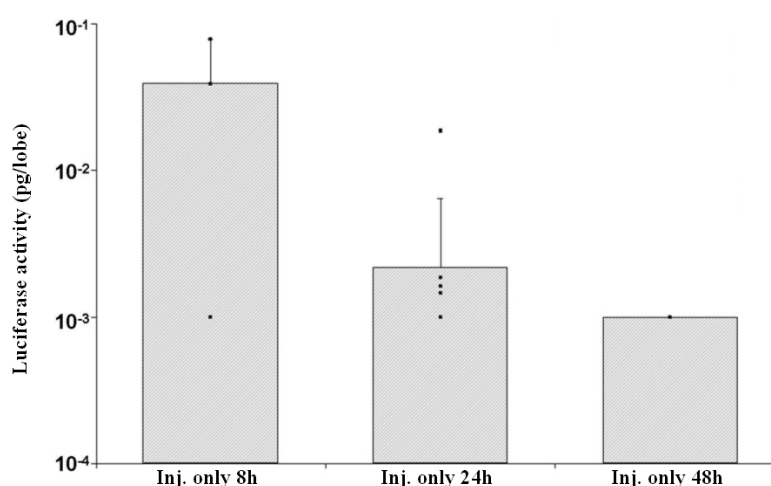


Figure 30 : Expression de la luciférase dans le lobe gauche du foie de souris C57Bl/6 femelles à différent temps après une injection intraveineuse du plasmide pCMVLuc (100µl à 0,8µg/µl).

b) Influence du voltage du HV et du LV appliqués

Nous avons donc évalué l'effet des impulsions électriques HV et LV appliquées sur un lobe de foie de souris après injection intraveineuse du plasmide (100µl de PBS contenant 0,8µg/µl de pCMVLuc). 24 heures après traitement les souris étaient sacrifiées et l'activité enzymatique de la luciférase mesurée, nous permettant cette fois-ci de n'avoir aucune expression basale due à l'injection seule (voir figure 31).

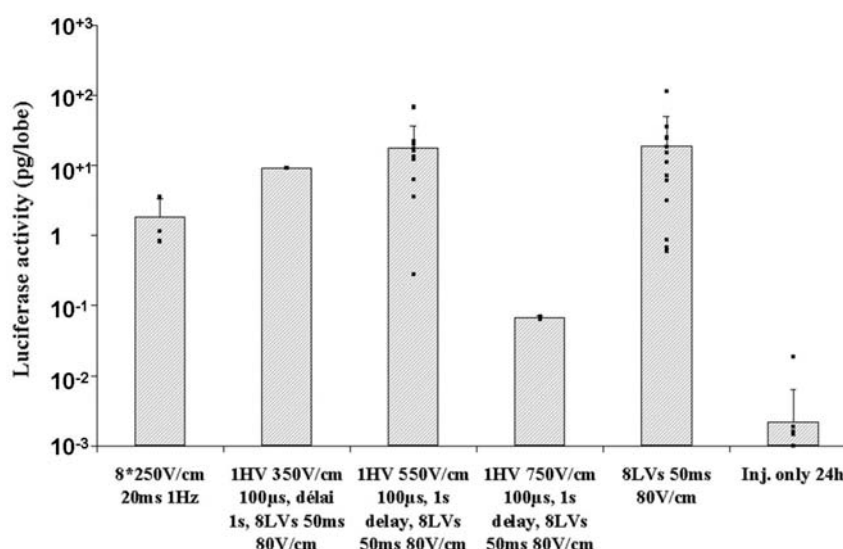


Figure 31 : Expression de la luciférase dans le lobe gauche du foie de souris C57Bl/6 femelles, 24h après injection intraveineuse de plasmide pCMVLuc (100µl à 0,8µg/µl) et électrotransfert avec différents paramètres.

De manière assez inattendue, des niveaux de transfection efficaces mais similaires ont été obtenus quelle que soit la valeur du champ électrique appliqué pour l'impulsion perméabilisante, tant que celle-ci reste en dessous de 750V/cm. Au-delà de cette valeur seuil l'efficacité de transfection diminue car les cellules du foie commencent à être perméabilisées irréversiblement. En effet il a été montré que le seuil de perméabilisation irréversible pour le foie exposé à 8 impulsions de 100 µs se situe à environ 650V/cm (Miklavcic, Semrov *et al.* 2000).

En fait, même en l'absence totale d'impulsion HV le niveau de transfection obtenu est largement supérieur à l'injection seule et il est même similaire à celui obtenu en présence d'une impulsion perméabilisante. Ces résultats sont en accord avec nos observations préliminaires réalisées en utilisant le plasmide codant pour la GFP et avec ceux d'une autre équipe (Jaichandran, Yap *et al.* 2006).

Il semblerait donc que dans nos conditions il n'y ait pas besoin d'utiliser d'impulsion de type HV dans le foie.

Deux hypothèses ont été envisagées pour expliquer ce comportement du foie.

1) Les cellules du foie pourraient être plus susceptibles d'absorber de l'ADN, leur membrane se comportant plus ou moins comme des membranes « perméabilisées » vis à vis de l'ADN, même en l'absence d'impulsion perméabilisante. Un tel comportement pourrait expliquer la très forte efficacité de la méthode hydrodynamique dans le foie.

2) D'un point de vue électrique la peau joue le rôle d'un isolant absorbant environ 30 à 40 volts avant d'être perméabilisée et de laisser passer le courant (Pliquett, Langer *et al.* 1995; Indenbom, Kuzmin *et al.* 1997), ainsi dans le cadre de l'électrotransfert dans le muscle l'impulsion électrophorétique de 80V/cm appliquée se traduit par une impulsion au niveau des fibres musculaires de seulement 40 à 50V/cm. Dans le cadre du transfert dans le foie (donc en l'absence de peau), une impulsion de 80V/cm pour le LV pourrait être trop forte et il se pourrait que le LV soit à la fois perméabilisant et électrophorétique.

Nous avons donc renouvelé l'expérience précédente en diminuant la force du champ électrique utilisé pour l'impulsion LV à 20V/cm (champ électrique minimum du Cliniporator pour des électrodes de 3mm) (figure 32).

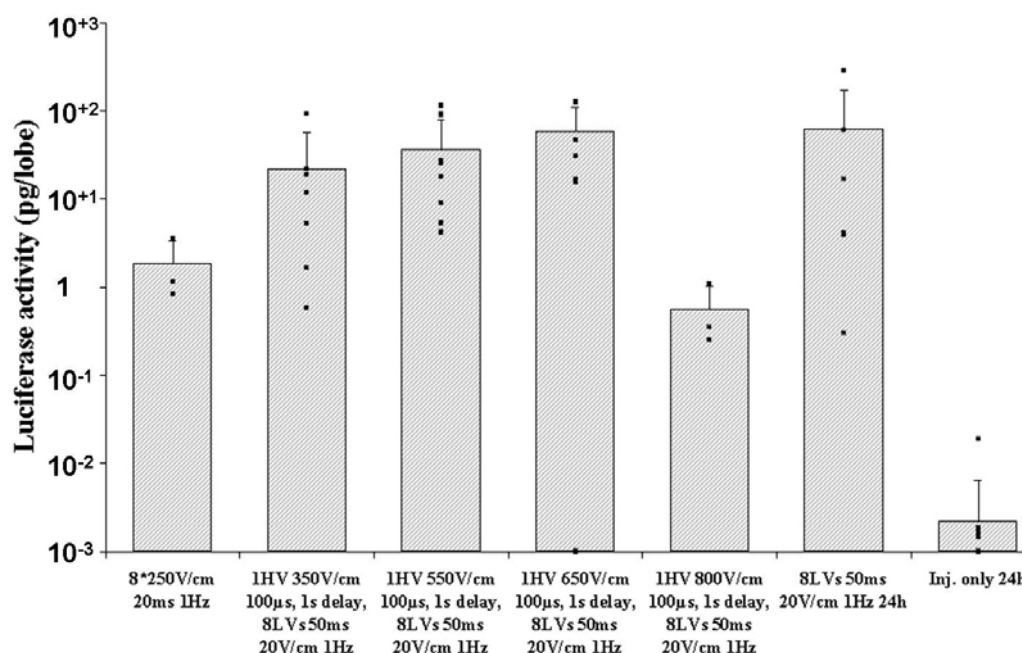


Figure 32 : Expression de la luciférase dans le lobe gauche du foie de souris C57Bl/6 femelles, 24h après injection intraveineuse de plasmide pCMVLuc (100µl à 0,8µg/µl) et électrotransfert avec différents paramètres.

De nouveau aucun effet de l'impulsion HV n'a été observé en dessous de la valeur de perméabilisation irréversible. Bien que le voltage du LV soit très faible, il n'est pas totalement possible d'exclure la possibilité que le LV puisse malgré tout avoir un effet perméabilisant.

On n'observe aucune différence significative entre un LV de 80V/cm et un LV de 20V/cm. De 20V/cm à 80V/cm il n'y a donc aucun changement ni du niveau de perméabilisation ni de l'électrophorèse obtenus. La perméabilisation des hépatocytes et l'électrophorèse de l'ADN obtenues à 20V/cm seraient donc déjà suffisantes et optimales. Les gains obtenus par l'augmentation du voltage du LV en terme de perméabilisation et de distance de migration seraient inutiles, comme précédemment dans le cas de la tumeur (figure 26 et 28).

Comme on le voit sur les figures 31 et 32 l'efficacité de transfert obtenu avec les impulsions de type HV+LV est environ dix fois supérieure à celle obtenue en utilisant 8 trains d'impulsions identiques de 20ms et 250V/cm (optimisation pour le foie, faite par (Liu et Huang 2002), des trains d'impulsions décrits dans le muscle par (Mir, Bureau *et al.* 1999)). Cependant, le fait que l'impulsion HV se soit révélée inutile dans le cadre du transfert dans le foie rapproche nos conditions testées de celles proposées par (Suzuki, Shin *et al.* 1998).

Une fois le fonctionnement des deux impulsions électriques étudié, nous nous sommes attachés à l'applicabilité de ces impulsions pour l'électrotransfert à l'échelle clinique.

Manuscrit 1 :
Contrôle et ajustement en temps réel des
paramètres électriques.

C. Nécessité d'un contrôle et d'un ajustement en temps réel des paramètres électriques, dans le cadre de futures applications cliniques. (Manuscrit 1)

Les débouchés biotechnologiques et biomédicales de l'électroporation se développent rapidement ; pour une application à l'homme, un des premiers éléments essentiels à vérifier est l'innocuité de la méthode pour le patient. Nous avons déjà vu précédemment que les paramètres optimaux pour la séquence HV+LV n'induisaient pas ou peu de stress et de dégâts histologiques. Il faut cependant être sûr de délivrer les paramètres optimaux.

Dans ce cadre, le contrôle en temps réel de la perméabilisation obtenue est un élément important. En effet, dans le cadre d'un électrotransfert de gènes *in vivo* il existe deux types d'événements indésirables concernant l'impulsion perméabilisante. Si le champ électrique appliqué est trop faible la perméabilisation n'est pas suffisante pour permettre l'entrée de l'ADN dans les cellules et si le champ électrique appliqué est trop élevé la perméabilisation des cellules est irréversible aboutissant également à un mauvais transfert. Dans le manuscrit 1 suivant, il est démontré qu'un algorithme peut, dans un premier temps permettre d'assurer le suivi en temps réel de la conductivité du tissu (rapport de l'intensité "I" sur la tension "U") et permettre ainsi d'anticiper le niveau de perméabilisation de la zone traitée. Dans un deuxième temps il est montré que cette information peut être utilisée par l'algorithme pour corriger en temps réel la valeur du champ électrique appliqué pour l'impulsion perméabilisante. Ainsi cet algorithme permet de corriger en temps réel l'impulsion HV à fin d'obtenir une perméabilisation du tissu traité suffisante sans atteindre le seuil d'irréversibilité. Dans le cadre de cette thèse nous avons d'abord vérifié *in vivo*, sur des muscles de souris, que l'algorithme était bien capable de détecter en temps réel une impulsion provoquant une perméabilisation irréversible et de la corriger. Nous avons ensuite vérifié que cette correction en temps réel permettait une efficacité de transfert similaire aux conditions optimales normalement utilisées dans le muscle, tout en évitant les lésions tissulaires dues à une perméabilisation irréversible.

Real time electroporation control for accurate and safe *in vivo* non-viral gene therapy

David Cukjati^{1,2}, Danute Batiuskaite^{1,3}, Franck André¹, Damijan Miklavčič², Lluis M. Mir¹

¹*UMR 8121 CNRS, Institute Gustave-Roussy, 39 Rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif Cédex, France*

²*University of Ljubljana, Faculty of Electrical Engineering, Laboratory of Biocybernetics, Tržaška 25, SI-1000 Ljubljana, Slovenia*

³*Vytautas Magnus University, Faculty of Natural Sciences, Department of Biology, Vileikos 8, LT-44404 Kaunas, Lithuania*

Corresponding author

Lluis M. Mir

UMR 8121 CNRS, Institute Gustave-Roussy, 39 Rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif Cédex, France

Tel.: +33 (01) 42114792

Fax: +33 (01) 42115276

e-mail: luismir@igr.fr

Keywords: DNA electrotransfer, gene therapy, electropermeabilization, electroporation, electrochemotherapy, finite element modeling

ABSTRACT

In vivo cell electroporation is the basis of DNA electrotransfer, an efficient method for non-viral gene therapy using naked DNA. The electric pulses have two roles, to permeabilize the target cell plasma membrane and to transport the DNA towards or across the permeabilized membrane by electrophoresis. For efficient electrotransfer, reversible undamaging target cell permeabilization is mandatory. We report the possibility to monitor *in vivo* cell electroporation during pulse delivery, and to adjust the electric field strength on real time, within a few microseconds after the beginning of the pulse, to ensure efficacy and safety of the procedure. A control algorithm was elaborated, implemented in a prototype device and tested in luciferase gene electrotransfer to mice muscles. Controlled pulses resulted in protection of the tissue and high levels of luciferase in gene transfer experiments where uncorrected excessive applied voltages lead to intense muscle damage and consecutive loss of luciferase gene expression.

INTRODUCTION

Biotechnological and biomedical applications of *in vivo* delivery of short high voltage pulses, like *in vivo* DNA electrotransfer, also termed electrogenetherapy, are rapidly developing [1-5]. For efficient *in vivo* gene transfer, it is necessary to inject DNA into the tissue and to achieve cell plasma membrane permeabilization [6]. Increased membrane permeability results from supraphysiological transmembrane voltages induced by external electric pulses [7-9]. Mechanisms of DNA electrotransfer *in vivo* have recently been described [6; 10]. The two key steps are the permeabilization of the target cells plasma membrane by electroporation and the electrophoresis of the DNA within the tissue. These two effects can be obtained separately using the appropriate sequence of electric pulses: short (100 μ s) square-wave high voltage pulses (HV) that permeabilize the cells without substantial DNA transport to the cells and long (100 ms) low voltage pulses (LV), that are instrumental in facilitating the DNA transfer into the cells [6]. Even though gene transfer efficacy, measured by gene expression level, depends on the characteristics of the electrophoretic long low voltage pulse, target cell permeabilization is mandatory for efficient gene transfer. Moreover, for a safe gene transfer, electroporation, also termed electroporation, must be reversible, that is not excessive, in order to avoid permanent cell damage. Optimal parameters for *in vivo* electroporation can be determined using *in vivo* tests for cell permeabilization [11] after the pulse, like the one based on ^{51}Cr -EDTA uptake [12], and by using mathematical modeling to determine electric field distribution [13; 14]. However, it would be much better to control cell permeabilization during the pulse delivery in order to ascertain that (reversible) cell permeabilization will be actually achieved at the end of the pulse, as well as to prevent excessive (irreversible) permeabilization [11; 13; 15]. Real time control of electroporation appears thus critical for this non viral gene transfection method that has many advantages with respect to viral methods.

Here, we report that *in vivo* electroporation can be precisely computer-controlled to ascertain that permeabilization will be achieved at the end of the pulse, while at the same time permanent cell damage is prevented. We demonstrate that the temporal progression of tissue electroporation can be detected in real time at the beginning of the pulse on the basis of current and voltage measurements made during pulse delivery to tissues. Then, adjustment of the pulse voltage in real time ensures cell membrane *reversible* permeabilization, which is necessary for efficient *in vivo* DNA electrotransfer. Using optimized LV parameters, real-time control of HV, as reported here, results then in safe and efficient gene transfer.

MATERIALS AND METHODS

Female Wistar rats (Janvier) were handled according to recommended good practices [16] and institutional ethics rules for animal experimentation. They were anesthetized by means of the intraperitoneal administration of Ketamine (100 mg/kg; Panpharma) and Xylazine (10 mg/kg; Bayer). Pulses were directly delivered to rat skeletal muscle and liver through two plate electrodes placed as shown in Fig. 1a. Plate electrodes consisted of two parallel metal plates, separated by 5.7 mm for skeletal muscles and by 4.4 mm for liver. One experiment per rat extremity (*triceps brachii* muscle of the hind limb and *gastrocnemius medialis* muscle of the forelimb) was performed. Liver tissue was accessed by midventral incision in the abdominal wall which was sewed up after pulses application. To parallel the liver treatment, electrodes were applied directly on the skeletal muscles after incision of the skin in the back part of the limb. Four separate sites were exposed to the electric pulses in each rat liver. Good contact between the electrodes and tissue was assured by a conductive gel (EKO-GEL, Egna).

In experiments reported in Fig. 2 and Fig. 3, 8 square-wave pulses of 100 μ s duration were delivered at a repetition frequency of 1 Hz by a PS 15 electropulsator (Jouan). Rise time of the pulses was 0.6 to 2.1 μ s while fall time was 2 μ s. High voltage probe PK 2kV (LeCroy), coil wide band current transformer model 5124 (Pearson Electronics) and digital oscilloscope (Waverunner, LeCroy) were used to measure store voltage and current for 200 μ s after the beginning of each of the eight pulses with sampling rate between 25 and 100 MSamples/s (Fig. 2a). Each current sample was divided by the corresponding voltage sample to yield conductance (g). Conductance was defined only when voltage was nonzero (Fig. 2b). For muscle, amplitude of the voltage pulses was varied from 50 to 320 V and for liver from 50 to 550 V.

The electric field in the tissue was estimated using a finite element numerical model of the electric field distribution in muscle and liver (Fig. 1b) that we have previously validated in experiments in rabbit liver [13]. Electric field calculations were made with a commercial program (EMAS, Ansoft, USA) [17].

200 μ l of ^{51}Cr -EDTA (Amersham) with a specific activity of 3.7 MBq/ml were injected intravenously, 5 or 4 minutes before the electric pulses delivery to muscle or liver respectively. The injected ^{51}Cr -EDTA distributes freely in the vascular and extracellular compartments, but does not enter the intracellular compartments unless access is provided, e.g. by electroporation. Animals were sacrificed 24 hours after ^{51}Cr -EDTA injection. Tissues exposed to electric pulses were taken out, weighed and counted in a Cobra 5002 gammacounter (Packard Instruments). The net ^{51}Cr -EDTA uptake as a result of electropermeabilization was calculated as the measured activity (converted to nanomoles of ^{51}Cr -EDTA) per gram of the tissue exposed to the electric pulses. ^{51}Cr -EDTA uptakes were used to calculate mean values of uptake ($\pm$ SEM) as a function of the ratio of the applied voltage to electrodes distance, in the rat skeletal muscle and in liver. Solid (muscle), dashed (liver) and dotted (muscle, transcutaneous pulses) lines in Fig. 3a present linear regressions to field intensities corresponding to low uptake values, increasing uptake values, and decreasing uptake values. Electric field threshold values of reversible and irreversible electroporation were determined as the field intensities corresponding to intersections of consecutive linear regressions.

For the demonstration of the efficacy of the proposed algorithm for real time electroporation control (Fig. 4) appropriate software was developed and installed in a

CliniporatorTM (IGEIA) instrument that was then used to deliver voltage pulses (amplitude 600 V and duration 100 μ s) to rabbit skeletal muscle *ex-vivo* through two plate electrodes. The CliniporatorTM not only delivers pulses but it also measures current and voltage during the pulse with sampling rate 10 MSamples/s as well as it processes measured data in real time. The same instrument was then used in DNA electrotransfer demonstration.

pCMV-Luc⁺ plasmid containing the cytomegalovirus (CMV) promoter of pcDNA3 (nucleotides 229-890, Invitrogen) inserted upstream of the coding sequence of the firefly luciferase (*photinus pyralis*) of the pGL2-Basic Vector plasmid (pGL2-Basic Vector, Cat. E1641, Promega) was prepared using the EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN). 10 μ g of plasmid in 20 μ l of PBS were locally injected in the tibial cranial muscle of anesthetized Swiss male mice 10 to 11 weeks old. Using plate electrodes of 5 mm distance, the following transcutaneous electric pulses were delivered using the CliniporatorTM: one pulse of 100 μ s duration and amplitude 900 V (reduced by algorithm to 460 V) followed by one pulse of 400 ms and 40 V (80 V/cm) [6]. Mice were sacrificed 7 days after DNA injection. Muscles were removed, weighted, and put in one tube of lysing matrix (Bio 101 Systems Lysing Matrix A tube, Qbiogene) containing 1 ml of chilled cell culture lysis reagent solution. This solution was prepared by mixing 10 ml of 5X cell culture lysis reagent (Promega) with 40 ml distilled water supplemented with one tablet of protease inhibitor cocktail (Boehringer Mannheim). Muscles were then disrupted using a high-speed benchtop homogenizer (FastPrep[®] Instrument, Qbiogene). After the lysis the tubes were centrifugated at 12000 rpm for 10 minutes. We measured the luciferase activity on 20 μ l of the supernatant, using a Lumat LB 9507 luminometer (Berthold France S.A.), by integration of the light produced during 10 s, starting after the addition of 100 μ l of Luciferase Assay Substrate (Promega) to the sample lysate. We collected the results from the luminometer in relative light units (RLU). Calibration with purified firefly luciferase protein was used to express the final results as picograms of luciferase per muscle. Serum levels of creatinin kinase (CK), a marker of muscle injury, were measured in 100 μ l of blood plasma using a Synchron LX[®]i 725 Clinical System (Beckman Coulter).

RESULTS

Electrical properties of biological tissues are complex and can be modeled by various equivalent electrical circuits composed of capacitors and resistors or by finite elements method to estimate electric field distribution in tissue. Fig 1 displays the experimental settings used on muscle and on liver and the corresponding numerical models. Data shows that in the tissue encompassed by the electrodes, more than 68 % of the muscle and more than 81% of the liver was exposed to an electric field (± 10 %) equivalent to the ratio of the applied voltage to the electrodes distance. It is thus acceptable to consider that electric field distribution is sufficiently homogeneous to refer to the electric field in the tissue by the value of the ratio of the applied voltage to the electrodes distance.

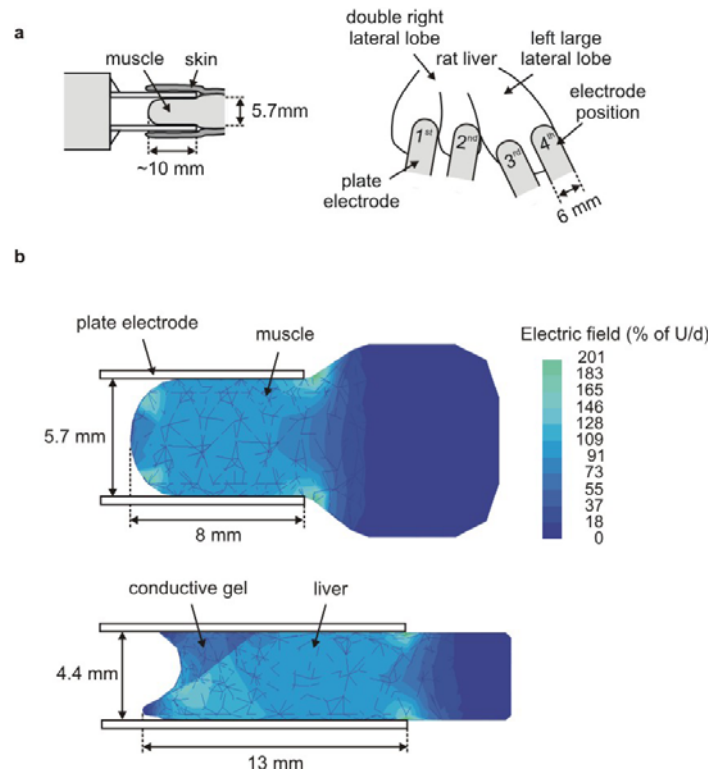


Fig. 1. Electrode positioning and electric field distribution.

(a) Electrode positioning in rat skeletal muscle and liver (left lobe appears on the right side as animals are lying on the back for the surgical access to the liver). (b) Estimated electric field distributions calculated by the finite elements method are presented in cross sections of muscle and liver tissues between the two plate electrodes. Electric field is reported as percent of the applied voltage (U) to electrode distance (d) ratio.

The electrical current response to a low voltage pulse (no electroporation) applied to the tissue consists of a rapid initial current increase followed by an exponential decrease, as “capacitors” are charging, and a constant level of current after “capacitors” are fully charged, suggesting that the “capacitors” were charged in a few microseconds (Fig. 2a). When the pulse voltage was high enough to permeabilize the tissue, the current was found to further increase during the pulse, as the conductivity of permeabilized tissue increased [18-20] (Fig 2a). Indeed, unless cells are permeabilized all current passes around the cells, while permeabilization provides additional current paths so the total current increases. Time dynamics of the current increase during the pulse depends on the pulse voltage; however, at our pulse length current always reaches constant level before the pulse ends. In order to analyze these changes independently of pulse voltage, conductance (g), which is the ratio current/voltage, was calculated (Fig 2b).

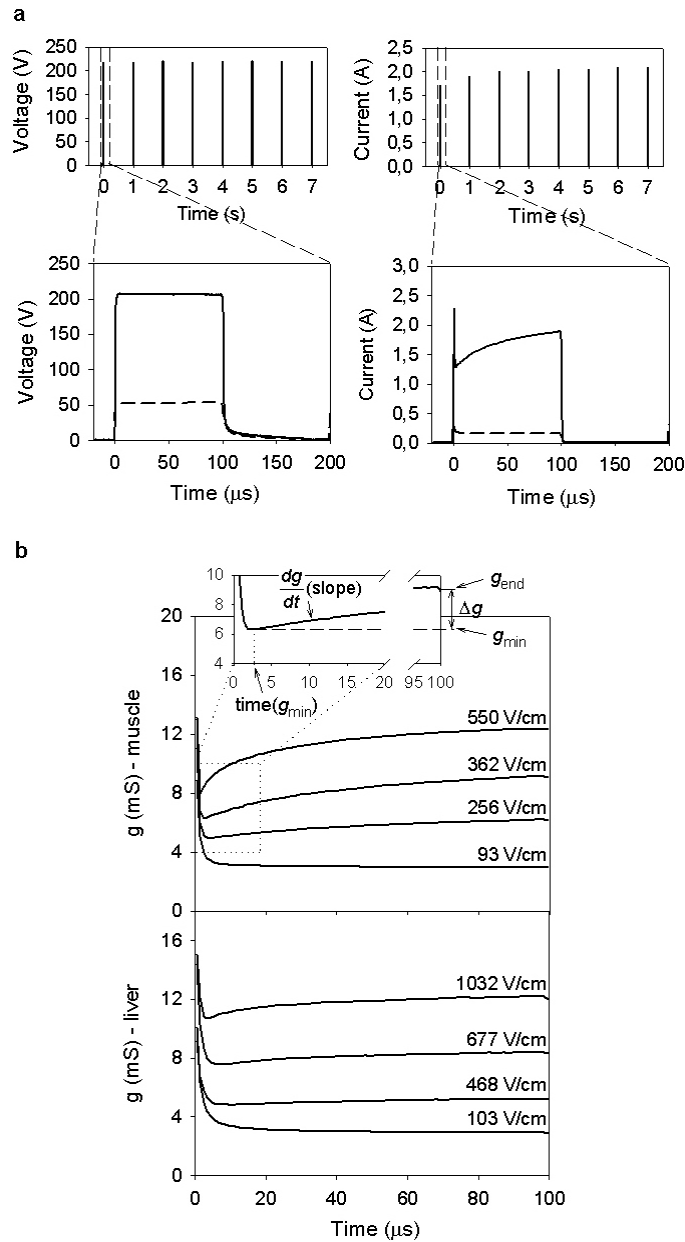


Fig. 2. Electrical properties of tissues during the pulse.

(a) Voltage and current traces for below reversible (dashed line) and reversible electroporation settings (solid line). **(b)** Conductance (g) of muscle and liver tissue during the pulse. The electric fields reported in the abscissa are the ratio of the applied voltage to electrodes distance.

Tissue permeabilization was quantified using the 51Cr–EDTA uptake method [12] on the same samples in which current and voltage were recorded, after we demonstrated that 51Cr–EDTA injection did not modify the time course of g (data not shown). Under control conditions (no electric field applied) the average uptake in the liver was 0.073 ± 0.010 nmol/g (mean $\pm$ std.dev.), while in muscle it was 0.003 ± 0.002 nmol/g, indicating that almost all molecules were washed out from the skeletal muscle in 24h, while liver tissue was still retaining some 51Cr–EDTA. The 51Cr–EDTA enters the cells and remains entrapped inside the cells only if cells are reversibly permeabilized (if cells are irreversibly permeabilized, the 51Cr–EDTA leaks out of the cells). In rat skeletal muscle directly exposed to the electric pulses, 51Cr–EDTA retention 24 h after the injection significantly increased at field intensities above 220 V/cm (Fig. 3a). Uptake increased with increasing electric field intensity until 430 V/cm. When the field intensity was further increased, uptake was significantly reduced, which reflects the onset of irreversible permeabilization. For transcutaneous pulses,

uptake in the skeletal muscle showed the same pattern but at higher field strengths (Fig. 3a). Uptake results in rat liver were much more scattered than in skeletal muscle and statistical analysis in liver did not reveal significant uptake changes. Nevertheless, a clear increase of uptake in liver was found at field intensities above 350 V/cm, with maximum uptake at 600 V/cm and decreasing uptake at higher field intensities.

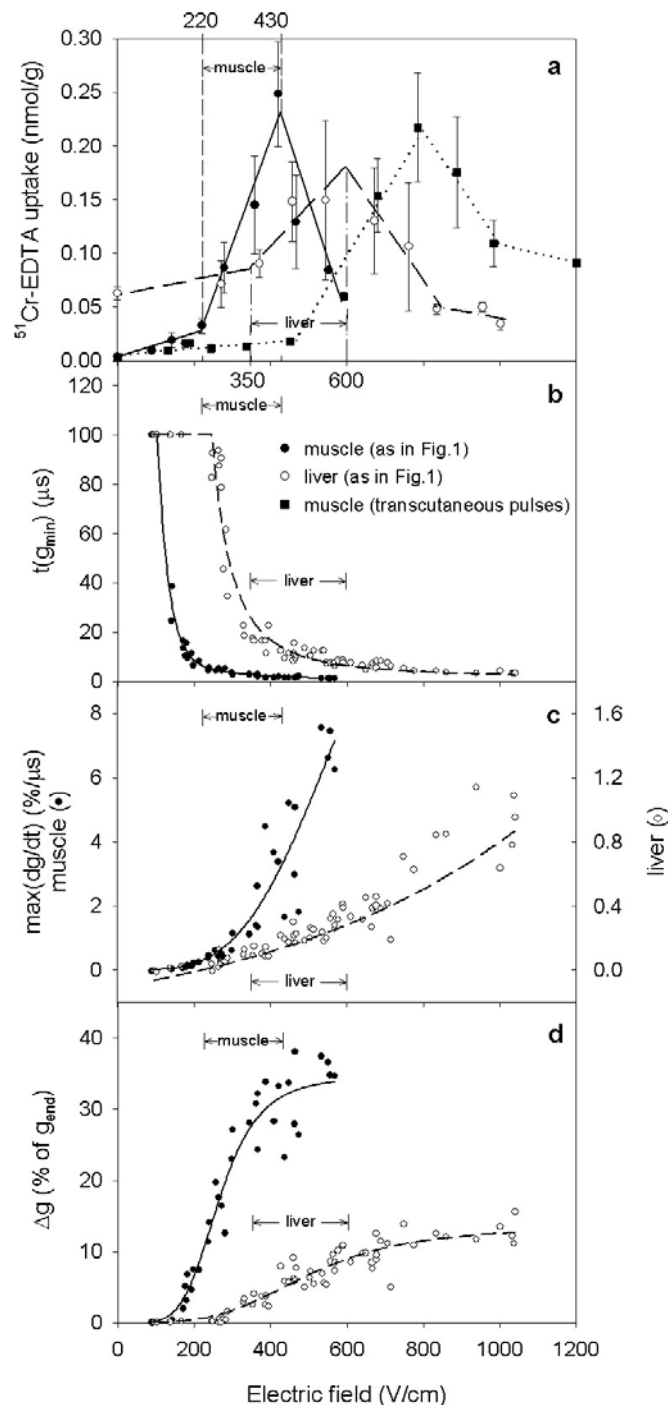


Fig. 3. Reversible and irreversible electric field threshold values and parameters for detection of tissue permeabilisation.

(a) Mean values of $^{51}\text{Cr-EDTA}$ uptake ($\pm\text{SEM}$) as a function of the ratio of the applied voltage to electrodes distance, in the rat skeletal muscle without the skin (closed circles) and liver (open circles). The $^{51}\text{Cr-EDTA}$ uptake results for the rat skeletal muscle with the skin are presented with closed squares. The reversible electroporation range is graphically displayed in each of the panels, respectively, for the liver and the rat muscle without the skin. Parameters for detection of tissue permeabilization are: **(b)** Time elapsed from pulse beginning to minimal conductance as a function of electric field, for rat muscle and liver. **(c)** Conductance maximal slope versus time. **(d)** Conductance change during the pulse (same symbols).

Time courses of g for rat muscle and liver at various electric field intensities are presented in Fig. 2b. At permeabilizing electric field intensities, it can be seen that, after a very fast rise and a fast decrease (transient which is result of charging of the tissue “capacitors”), g is then increasing during the rest of the pulse delivery, and furthermore increases faster and reaches higher levels at higher electric field intensities. We decided to relate dynamics of g during the pulse to the level of tissue electroporation and to seek for reliable parameters linking dynamics of g to the tissue electroporation level. Detailed mathematical analysis of g time courses was performed and many parameters of this curves plotted as a function of the applied field. The following parameters (Fig 3b, c and d) showed clear relationship with permeabilization levels and could be used for real-time pulse control: (1) the time elapsed from the pulse beginning to the minimal value of g ($t(g_{\min})$ in μs) (Fig 3b), (2) the slope of g versus time normalized to the g value at the time of calculation at $t > t(g_{\min})$ (dg/dt in $\%/ \mu\text{s}$) (Fig 3c), (3) the total change in g values, describing the percent difference between g at the end of pulse and the minimal g (Δg in % of g at the end of pulse) (Fig. 3d).

As for the minimum, the following control algorithm can be proposed: (1) if the minimum is detected at time periods shorter than $1.8 \mu\text{s}$ and $6.2 \mu\text{s}$ after pulse application to rat skeletal muscle and liver, respectively (Fig. 3b), the electric field intensity is too high and should be lowered in order to assure no irreversible tissue damages related to irreversible membrane permeabilization; (2) if the minimum is detected at time periods longer than $6.2 \mu\text{s}$ in muscle and $25 \mu\text{s}$ in liver after the pulse beginning, electric field intensity has to be increased to obtain tissue permeabilization.

If the minimum is found within the expected time interval, the electroporation process can also be monitored later. Indeed, the slope of g versus time calculated in real time after the minimum can be used to verify the tissue electroporation and that the process is reversible. The algorithm should then consider that a slope for rat skeletal muscle between 0.30 and $3.30 \%/ \mu\text{s}$ assures that tissue will be reversibly permeabilized with eight $100 \mu\text{s}$ long pulses (fig. 3c). The slope should fall within a range of 0.08 and $0.28 \%/ \mu\text{s}$ for liver. If the slope is not in the expected range, pulse delivery should be readjusted. Thus, combinations of controls based on the time of the minimum and on slope measurement can be used for real-time pulse adjustment.

Of course, after the first pulse is completely delivered, an *a posteriori* validation could be performed as suggested by Davalos et al. [21]. A g change during the pulse in the range between 9.6% and 31.8% for muscle and in the range between 2.9% and 9.0% for liver assures that tissue was reversibly electroporated (Fig. 3c). Lower values indicate insufficient permeabilization whereas higher values indicate irreversible damages.

Appropriate software can determine and process $t(g_{\min})$ and/or dg/dt in μs time range. Moreover, the high voltage generator needs just few μs to readjust the voltage. Thus no technical barrier exists to implement this method for real-time detection and control of *in vivo* electroporation. Our findings were already implemented in a prototype device and demonstrated ex-vivo on muscle tissue (Fig. 4). Using plate electrodes with 0.6 cm distance, pulses of 600 V were delivered. The prototype device was programmed to find minimal conductance, and when found, to calculate the conductance slope. The algorithm was set to decrease the output voltage to a half immediately after conductance slope exceeds $3.3 \%/ \mu\text{s}$. In the *ex vivo* experiment the prototype found minimal conductance at $2.4 \mu\text{s}$ after pulse beginning. With deactivated algorithm the maximal conductance slope was $6.2 \%/ \mu\text{s}$. In the experiment presented in Fig 4, where electrodes were in direct contact with the muscle, the

slope exceeded threshold value $3.3 \text{ } \mu\text{S}/\mu\text{s}$ at $t_1 = 3.95 \text{ } \mu\text{s}$ after pulse beginning. After only $0.7 \text{ } \mu\text{s}$ the microprocessor corrected the output voltage setting it to 300 V .

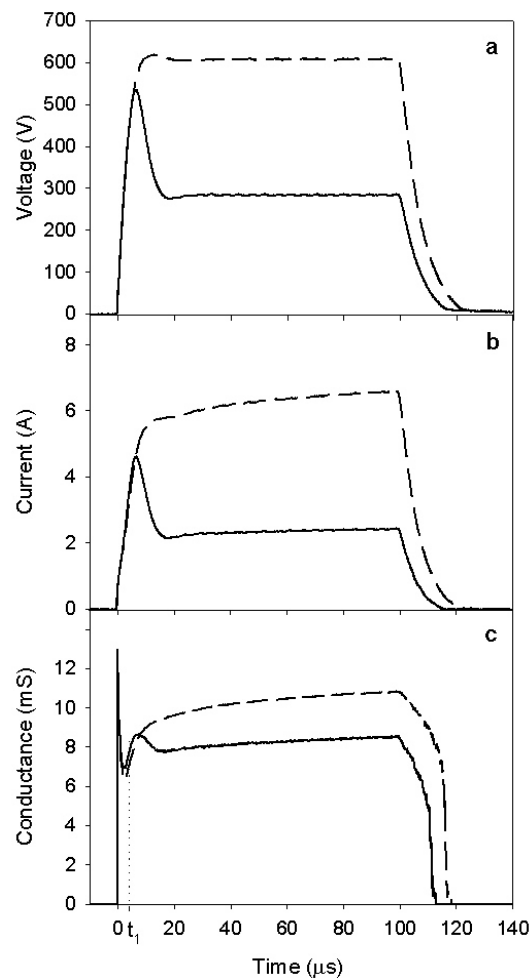


Fig. 4. Demonstration of the algorithm for safe electroporation.

Voltage (a), current (b) and conductance (c) traces are presented with solid lines when the algorithm for irreversible electroporation detection was activated and with dashed lines when the algorithm was not active.

Even though the algorithm was determined and tested *ex vivo* in the simplest experimental design (electrodes in direct contact with the tissue, Fig. 1), we further demonstrated its use *in vivo* in gene transfer experiments, where pulses are usually delivered transcutaneously. The presence of the skin not only introduces more complexity in the theoretical and numerical analysis, but it also requires higher pulse amplitudes to achieve permeabilization levels comparable to those achieved with electrodes in direct contact with the muscle (the reversible permeabilization threshold for rat muscle with the skin was 460 V/cm and the irreversible permeabilization threshold was 790 V/cm at 8 times $100 \text{ } \mu\text{s}$ pulse parameters, Fig. 3a). DNA coding for the firefly luciferase was injected in the *tibialis cranialis* muscle in mice and, to permeabilize the muscle, one 900 V transcutaneous pulse was applied to the mice leg using external electrodes 5 mm apart. This field strength was applied as being excessive while the reduction in 50% imposed by the algorithm is close to the optimal predicted values according to Fig. 3a. This permeabilizing pulse was followed by one electrophoretic pulse of 400 ms to allow DNA uptake by the electroporated muscle fibres [6]. In a preliminary experiment, the muscles exposed to 900 V pulses without activation of the algorithm ($900/900$ muscles, $n=2$) gave a luciferase expression level ($1.02 \pm 1.44 \text{ pg of luciferase/muscle}$) 200 times lower than the muscles exposed to 900 V pulses with the activated algorithm ($900/460$ muscles, $n=3$; $202 \pm 134 \text{ pg of luciferase/muscle}$). Data is expressed in pg of

luciferase/muscle because the muscles exposed to uncorrected 900 V pulses were damaged and their weight significantly ($p<0.05$) reduced by 46% (at an average of 64 ± 23 mg per muscle) with respect to the 900/460 muscles (119 ± 17 mg per muscle). In the second experiment ($n=4$ in both groups) the luciferase expression level in the 900/900 muscles (34 ± 21 pg of luciferase/muscle) was significantly lower (60 times; $p<0.05$) than in the 900/460 muscles (2064 ± 1181 pg of luciferase/muscle). The reduction of the weight of the 900/900 muscles was less severe than in the preliminary experiment (of 12% only, at 103 ± 11 mg versus 117 ± 14 mg in the 900/460 muscles). In this second experiment, we also measured the serum levels of creatinin kinase (CK, a marker of muscle injury) three days after the electric treatment: the CK levels in the 900/900 mice (183 ± 23 IU/l) were significantly ($p<0.01$) higher than those of the 900/460 mice (107 ± 30 IU/l). Both the CK levels and muscle weight loss show that the algorithm activation largely protected the muscles from the damages of muscle exposure to excessive field strength. This protection also allows maintaining high levels of expression of the electrotransferred gene.

DISCUSSION

In our study we describe and demonstrated a real-time detection method of tissue permeabilization. Current and voltage recording during the pulse is easy and can be analyzed in real time. To our knowledge, no other available approach can be used to adjust the pulse voltage in real time in order to ascertain the achievement of reversible tissue permeabilization. Electrical impedance tomography [21] using a single frequency record requires calculations that can only be completed after the end of the pulse. Tissue impedance changes at various frequencies or even at single frequency in the range up to 100 kHz cannot be acquired in less than 100 μ s. Thus they are only interesting for postpulse versus prepulse comparisons, provided of course that no position changes of the electrodes occur during the pulse. At least for muscle electroporation, it is very difficult to avoid such changes due to muscle contraction during pulse delivery.

Analysis of electrical parameters was performed on the first pulse only, while electroporation level was determined based on a train of eight pulses. In fact, current/voltage changes were recorded for the eight pulses using the segmentation function of the oscilloscope and similar variations were observed in the eight pulses of a given train of pulses (data not shown). Thus, to achieve the expected electroporation level it is sufficient to measure the parameters of the first pulse, to adjust them in real time as proposed above and then to administer seven additional pulses. Alternatively the high voltage pulse can be followed by low voltage electrophoretic pulses for DNA transfection [6]. One of the advantages of being able to check electroporeabilization level after one pulse instead of after a full sequence is that it could minimize discomfort to a patient.

The electric field threshold values for reversible and irreversible permeabilization are in agreement with previously reported knowledge. In a previous study [13], we used needle electrodes in rabbit liver and calculated the electric field distribution in the tissue by numerical modeling. Based on biological observations of drug delivery in *in-vivo* experiments we determined the reversible (362 ± 21 V/cm) and irreversible (637 ± 43 V/cm) electric field threshold values for rabbit liver. These values are almost identical to our present measurements in rat liver. Threshold values are considerably lower in rat muscle than in rat liver (Fig. 3a). This can be explained by the fact that the liver cells, smaller, must be exposed to a higher electric field intensity than the skeletal muscle cells, larger, to induce the same transmembrane voltage in agreement with Schwan's equation [22] as well as with more recent determinations of the transmembrane potential changes on spheroidal cells [23; 24]. Previous threshold determinations in skeletal muscle were performed in mice, using transcutaneous pulses [11; 12]. In fact our parallel determinations in rats using transcutaneous pulses (data not shown) demonstrate that thresholds in skeletal muscle with skin are almost identical in rats (550 V/cm) and in mice (530 V/cm). We can conclude that differences between tissues are much larger than differences between species, at least among the common laboratory animals. Thus it can be speculated that the algorithm, with minor adaptations, could also operate in larger animals and even in humans.

In summary, as we demonstrated, it is possible to achieve electric pulses safe delivery by real-time voltage control. Safer (controlled) electroporeabilizing pulses actually resulted in the protection of the tissue in gene transfer experiments where excessive applied voltages lead to intense muscle damage and loss of the efficacy of the gene transfer. Thus safe gene electrotransfer can be achieved without the need of previous precise tuning of the experimental conditions, a situation that can be very useful in the clinical settings.

Electrogenetherapy is one of the most efficient non-viral approaches for gene therapy [3-5]. It was already considered a safe method because naked DNA is not immunogenic (unlike adenoviruses in particular) and plasmid DNA does not need to contain insertion promoting sequences (like the retroviral and lentiviral vectors) which can result in deleterious insertional mutagenesis [25]. Moreover, DNA electrotransfer can be accomplished using devices that are already used on human cancer patients to deliver cytotoxic molecules like bleomycin and cisplatin to solid tumors by electrochemotherapy [26-29]. Thus all elements are available for safe and widespread use of this efficient technology and for implementing the use of genes for biomedical purposes in the post human genomic era [30].

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the CNRS, the Institut Gustave-Roussy and the Cliniporator project (FP5, Contract No. QLK3-1999-00484) of the European Community. We also acknowledge the staff of the Service Commun d'Expérimentation Animale (M. P. Ardouin) of the Institut Gustave-Roussy for animal maintenance, and France Télécom (Dr. J. Wiart) for the generous loan of the oscilloscope and the recording material (probes, portable computer and software). The authors are in depth to Selma Čorović (Faculty of Electrical Engineering, University of Ljubljana, Slovenia) for her finite element modeling of electric field distribution in tissues and to Claudio Bertacchini (IGEA s.r.l., Carpi, Italy) for testing the algorithm *ex-vivo* on tissue.

REFERENCES

- [1] L.M. Mir, Therapeutic perspectives of in vivo cell electroporation, *Bioelectrochemistry* 53, (2001) 1-10.
- [2] M.P. Rols, C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros, J. Teissie, In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma, *Nat. Biotechnol.* 16, (1998) 168-171.
- [3] L.M. Mir, M.F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J.M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz, D. Scherman, High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 96, (1999) 4262-4267.
- [4] C. Bloquel, E. Fabre, M.F. Bureau, D. Scherman, Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications, *J Gene Med* 6, (2004) S11-S23.
- [5] F. André, L.M. Mir, DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications, *Gene Ther.* 11, (2004) S33-S42.
- [6] S. Satkauskas, M.F. Bureau, M. Puc, A. Mahfoudi, D. Scherman, D. Miklavčič, L.M. Mir, Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: Respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis, *Mol. Ther.* 5, (2002) 133-140.
- [7] J. Teissie, T.Y. Tsong, Electric-field induced transient pores in phospholipid-bilayer vesicles, *Biochemistry* 20, (1981) 1548-1554.
- [8] S. Orlowski, L.M. Mir, Cell electroporation - a new tool for biochemical and pharmacological studies, *Biochim. Biophys. Acta* 1154, (1993) 51-63.
- [9] E. Neumann, S. Kakorin, K. Toensing, Membrane electroporation and electromechanical deformation of vesicles and cells, *Faraday Discuss.* 111, (1998) 111-125.
- [10] S. Somiari, J. Glasspool-Malone, J.J. Drabick, R.A. Gilbert, R. Heller, M.J. Jaroszeski, R.W. Malone, Theory and in vivo application of electroporative gene delivery, *Mol. Ther.* 2, (2000) 178-187.
- [11] J. Gehl, L.M. Mir, Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, (1999) 377-380.
- [12] J. Gehl, T.H. Sorensen, K. Nielsen, P. Raskmark, S.L. Nielsen, T. Skovsgaard, L.M. Mir, In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution, *Biochim. Biophys. Acta* 1428, (1999) 233-240.
- [13] D. Miklavčič, D. Šemrov, H. Mekid, L.M. Mir, A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy, *Biochim. Biophys. Acta* 1523, (2000) 73-83.
- [14] D. Šel, D. Cukjati, D. Batiuskaite, T. Slivnik, L.M. Mir, D. Miklavčič, Sequential Finite Element Model of Tissue Electroporation, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 52, (2004) 816-827.
- [15] E. Neumann, S. Kakorin, K. Toensing, Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes, *Bioelectrochem. Bioenerg.* 48, (1999) 3-16.
- [16] P. Workman, P. Twyman, F. Balkwill, A. Balmain, D. Chaplin, J. Double, J. Embleton, D. Newell, R. Raymond, J. Stables, T. Stephens, J. Wallace, United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition) *Br. J. Cancer* 77, (1998) 1-10.
- [17] B. Irons, S. Ahmad, *Techniques of finite elements*, John Wiley & Sons, New York, 1986.
- [18] M. Hibino, M. Shigemori, H. Itoh, K. Nagayama, K. Kinoshita, Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential, *Biophys. J.* 59, (1991) 209-220.
- [19] I.G. Abidor, A.I. Barbul, D.V. Zhelev, P. Doinov, I.N. Bandrina, E.M. Osipova, S.I. Sukharev, Electrical-properties of cell pellets and cell electrofusion in a centrifuge, *Biochim. Biophys. Acta* 1152, (1993) 207-218.
- [20] M. Pavlin, D. Miklavčič, Effective conductivity of a suspension of permeabilized cells: A theoretical analysis, *Biophys. J.* 85, (2003) 719-729.
- [21] R.V. Davalos, B. Rubinsky, D.M. Otten, A feasibility study for electrical impedance tomography as a means to monitor tissue electroporation for molecular medicine, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 49, (2002) 400-403.
- [22] H. Pauly, H.P. Schwan, Über die Impedanz einer Suspension von kugelförmigen Teilchen mit einer Schale, *Z. Naturforsch* 14B, (1959) 125-131.
- [23] B. Valič, M. Golzio, M. Pavlin, A. Schatz, C. Faurie, B. Gabriel, J. Teissie, M.P. Rols, D. Miklavčič, Effect of electric field induced transmembrane potential on spheroidal cells: theory and experiment, *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 32, (2003) 519-528.
- [24] T. Kotnik, D. Miklavčič, Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells, *Biophys. J.* 79, (2000) 670-679.
- [25] Z.X. Li, J. Dullmann, B. Schiedlmeier, M. Schmidt, C. von Kalle, J. Meyer, M. Forster, C. Stocking, A. Wahlers, O. Frank, W. Ostertag, K. Kuhlcke, H.G. Eckert, B. Fehse, C. Baum, Murine leukemia induced by retroviral gene marking, *Science* 296, (2002) 497.

- [26] M. Belehradek, C. Domenge, B. Luboinski, S. Orlowski, J. Belehradek, L.M. Mir, Electrochemotherapy, a new antitumor treatment - 1st clinical phase-I-II trial, *Cancer* 72, (1993) 3694-3700.
- [27] L.M. Mir, L.F. Glass, G. Serša, J. Teissie, C. Domenge, D. Miklavčič, M.J. Jaroszeski, S. Orlowski, D.S. Reintgen, Z. Rudolf, M. Belehradek, R. Gilbert, M.P. Rols, J. Belehradek, J.M. Bachaud, R. DeConti, B. Stabuc, M. Čemažar, P. Coninx, R. Heller, Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy, *Br. J. Cancer* 77, (1998) 2336-2342.
- [28] A. Gothelf, L.M. Mir, J. Gehl, Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation, *Cancer Treat. Rev.* 29, (2003) 371-387.
- [29] G. Serša, M. Čemažar, Z. Rudolf, Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients, *Cancer Therapy* 1, (2003) 133-142.
- [30] D. Ferber, Gene Therapy: Safer and Virus-Free?, *Science* 294, (2001) 1638-1642.

Discussion

-

Conclusions

Discussion/Conclusions

Les différents travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'avoir :

- 1) Une idée de l'importance de la vitesse d'injection et de la distribution du liquide sur le transfert de gènes.
- 2) Une estimation du niveau de dégâts histologiques et de stress cellulaire lié à l'utilisation d'une combinaison d'impulsion HV+LV par rapport aux impulsions classiquement utilisées.
- 3) Une contribution substantielle à l'étude de la séparation des effets perméabilisants et électrophorétiques en deux impulsions distinctes : HV et LV
- 4) Une confirmation de la faisabilité du contrôle en temps réel de l'impulsion perméabilisante par un algorithme, dans le cadre de futures applications cliniques

I. Nécessité de contrôler la vitesse et la distribution de l'injection

A. Importance de la distribution du liquide injecté

Les diverses expériences réalisées nous ont permis de voir que dans la tumeur et le muscle l'injection locale ne permettait pas une distribution du liquide injecté suffisamment homogène pour atteindre toutes les cellules. A l'inverse dans le foie, aussi bien l'injection locale que l'injection intraveineuse permettaient une bonne distribution du liquide injecté.

Pour les tumeurs, le problème de l'injection peut même s'avérer crucial puisque certaines tumeurs se sont révélées difficilement traitables par électrotransfert du fait de l'impossibilité de les injecter localement.

Une amélioration de l'efficacité de l'électrotransfert peut donc être envisagée dans le cadre du muscle et de la tumeur par amélioration du protocole d'injection, soit par l'utilisation de préinjections de substances telles que la hyaluronidase (McMahon, Signori *et al.* 2001; Mennuni, Calvaruso *et al.* 2002; Molnar, Gilbert *et al.* 2004) ou le saccharose (Davis, Whalen *et al.* 1993) ou par l'utilisation d'une injection intraveineuse de membre isolé, telle que celle pratiquée dans le cadre de la méthode hydrodynamique (Zhang, Budker *et al.* 2001).

B. Importance de la vitesse d'injection

Les travaux que nous avons réalisés sur l'influence de la vitesse/pression d'injection locale sur le transfert de gènes, nous ont permis de voir que la méthode hydrodynamique, habituellement utilisée en injection intraveineuse pouvait aussi être utilisée en injection locale dans divers tissus. La très forte inhibition du transfert observée après addition d'héparine montre que la majeure partie de l'ADN semble être internalisée par un mécanisme d'endocytose médiée par récepteur. Cependant, aux plus fortes vitesses/pressions, la présence d'un faible transfert par perméabilisation réversible de la membrane sous l'effet de la pression semble aussi exister.

Il est à noter que bien qu'efficace, les niveaux de transfection obtenus par cette méthode hydrodynamique locale restent inférieurs à ceux obtenus par électrotransfert et surtout

beaucoup plus variables. Des techniques de contrôle plus précis et homogène de la vitesse et de la pression lors de l'injection pourraient éventuellement permettre de diminuer cette variabilité. Cependant il est également à noter que la combinaison de l'utilisation d'une injection rapide suivie d'un électrotransfert permet d'améliorer sensiblement l'efficacité du transfert obtenu lors de l'utilisation d'impulsions trop faibles ou trop fortes (voir figure 14 des résultats) mais ce n'est plus le cas pour les valeurs obtenues pour l'utilisation de paramètres électriques optimaux. Il semblerait donc soit :

- qu'un optimum ait été atteint en terme de quantité de plasmide entrant dans les cellules
- ou que le gain apporté par l'injection rapide, bien que toujours aussi important et constant en valeur absolue, soit négligeable par rapport à l'efficacité obtenue par l'électrotransfert dans les conditions optimales.

Absence de lésions tissulaires et de stress cellulaire dans le cas d'un électrotransfert avec une combinaison HV+LV optimale

L'étude des dégâts histologiques et du stress cellulaire nous a permis de montrer que l'utilisation de la combinaison de HVs et de LVs permet d'obtenir une efficacité de transfert équivalente aux impulsions longues, carrées, répétées classiques, mais sans générer ni les lésions histologiques, ni le stress cellulaire couramment observés avec ces trains d'impulsions (McMahon, Signori *et al.* 2001; Durieux, Bonnefoy *et al.* 2004). La séparation et l'optimisation indépendante des effets perméabilisants et électrophorétiques a sans doute permis de maximiser l'efficacité de transfert sans pour autant en augmenter les effets toxiques.

Dans les conditions optimales d'électrotransfert avec une combinaison d'impulsions HV+LV, il n'y a pas d'augmentation significative de l'expression de la protéine de stress Hsp70. Cependant nous avons aussi montré que, si les paramètres électriques appliqués sont suffisamment forts, l'utilisation d'impulsions électriques pouvait induire l'expression de Hsp70. Ceci explique sans doute pourquoi certains groupes mentionnaient une augmentation de Hsp70 induite par les impulsions électriques et d'autres non (Pazmany, Murphy *et al.* 1995; Andrews, Newbound *et al.* 1997).

L'expression de Hsp70 étant typiquement associée aux stress thermiques, la chaleur générée par les impulsions électriques pourrait expliquer, au moins en partie, l'induction d'Hsp observée.

II. Divers effets des impulsions électriques

L'optimisation des paramètres électriques réalisée dans le cadre de la validation pré clinique du Cliniporator nous a permis de faire plusieurs observations.

A. Confirmation in vivo des rôles perméabilisants et électrophorétiques des impulsions

Les expériences que nous avons réalisées dans le muscle nous ont permis de confirmer *in vivo* que l'impulsion HV a un rôle perméabilisant et est responsable du nombre de fibres perméabilisées alors que l'impulsion LV a un rôle électrophorétique et est responsable du niveau de transfection des fibres.

B. Effet d'une augmentation du voltage de l'impulsion HV

Dans le muscle l'augmentation du voltage de l'impulsion HV permet une augmentation de la perméabilisation du tissu et donc de l'efficacité de transfection jusqu'à atteindre un plateau. Lorsque le HV appliqué devient trop fort la perméabilisation des fibres musculaires devient irréversible entraînant des lésions tissulaires et une baisse de l'efficacité de transfection.

Le même comportement est observé dans le mélanome B16, cependant le générateur ne pouvant délivrer, dans nos conditions expérimentales, plus de 2000V/cm la perméabilisation irréversible de la tumeur n'a pu être observée. La tumeur étant un tissu beaucoup moins homogène que le muscle, entre autres en termes de taille, de forme et d'orientation des cellules, une plus grande variabilité dans les résultats a également été observée.

Dans le foie, les LVs utilisés aillant sans doute déjà un effet perméabilisant ou les hépatocytes n'ayant pas besoin d'être perméabilisés, seul l'effet toxique du HV, au-delà de 700V/cm, a pu être observé.

C. Effet de la taille des cellules

Les cellules B16 étant plus petites que les fibres musculaires, les seuils de perméabilisation réversible et irréversible sont atteints pour des valeurs de HV appliquées plus élevées. La taille plus petite des cellules tumorales est également responsable de la plus grande largeur du plateau de valeurs optimales. Ces observations confirment *in vivo* les observations déjà faites *in vitro* sur l'influence de la taille des cellules et sont en accord avec la formule théorique $\Delta V = f.r.E.\cos\theta$ (voir équation 3 dans le paragraphe V.B.2.b.(2).(b) de l'introduction de cette thèse).

Dans le foie le champ électrique à appliquer pour électrotransférer les cellules semble beaucoup plus faible que dans le cas du muscle. Cette observation est en accord avec des travaux précédents, réalisés au laboratoire, montrant que le seuil de perméabilisation réversible du foie pour des petites molécules se situe à 350V/cm (pour un train de 8 impulsions de 100 μ s à une fréquence de 1Hz) alors que pour le muscle la valeur est de 500V/cm (pour le même train de 8 impulsions de 100 μ s à une fréquence de 1Hz) (Gehl et Mir 1999; Miklavcic, Semrov *et al.* 2000). Etant donné que la taille des cellules hépatiques (20 à 25 μ m) est inférieure à celle des cellules musculaires (50 μ m), la formule $\Delta V = f.r.E.\cos\theta$ ne semble donc plus fonctionner. L'explication provient sans doute du fait que les cellules hépatiques sont connectées entre elles par des gap-junctions qui laissent librement passer les petites molécules et les ions (Spray, Ginzberg *et al.* 1986) et se comportent alors comme une plus grosse cellule vis à vis du champ électrique.

D. Effet d'une augmentation du voltage de l'impulsion LV

Les expériences sur l'effet du voltage appliqué pour le LV sur le transfert dans le mélanome nous ont permis d'observer une augmentation de l'efficacité de transfection avec le voltage appliqué jusqu'à atteindre un plateau, ce qui est en accord avec le rôle électrophorétique du LV. Jusqu'à 80 ou 100V/cm l'augmentation du voltage du LV se traduit par une augmentation de la distance parcourue par le plasmide dans le tissu par électrophorèse. Au-delà de 100V/cm le gain obtenu en distance parcourue n'augmente plus l'efficacité de transfert car la distance séparant les molécules d'ADN les plus éloignées des cellules tumorales a sans doute déjà été parcourue.

E. Effet d'un délai d'une seconde entre le HV et le LV

L'existence d'un délai d'une seconde entre le HV et le LV semble permettre aux cellules d'être moins affectées par le HV.

III. Contrôle en temps réel du voltage de l'impulsion perméabilisante pour de futures applications cliniques

Dans le cadre de futures applications cliniques nous avons montré *in vivo* la faisabilité d'un contrôle en temps réel du voltage de l'impulsion perméabilisante, permettant à la fois d'éviter la perméabilisation irréversible et l'apparition de lésion des fibres, tout en maintenant un niveau de transfection optimal. L'intérêt essentiel de cet algorithme réside dans le gain en terme de sécurité vis à vis des patients.

IV. Perspectives

Les expériences réalisées dans le cadre de cette thèse ont permis d'apporter des éléments de réponse concernant les effets des champs électriques (arguments allant dans le sens de la confirmation des effets électrophorétiques et perméabilisants et de l'influence de la taille cellulaire par exemple). Cependant de nombreuses questions restent posées.

Ainsi l'effet du délai entre le HV et le LV nécessite une explication pour l'effet observé à bas voltage. De même, l'implication des jonctions cellulaires dans la facilité d'électroperméabilisation des cellules hépatiques que nous avons observée, mériterait d'être confirmée. Il serait aussi intéressant de continuer d'étudier les paramètres HV et LV optimaux dans d'autres tissus afin de pouvoir continuer à relier les différences observées aux spécificités du tissu traité et d'éclaircir ainsi encore un peu plus les mécanismes impliqués.

Enfin, maintenant que nous avons étudié les effets d'une impulsion HV, il serait intéressant d'étudier les effets de trains d'impulsions HVs. En effet, ce sont des trains de 8 HVs qui sont utilisés pour l'électrochimiothérapie par exemple. Une hypothèse qu'il serait intéressant d'étudier serait le fait que la perméabilisation cellulaire obtenue par la première impulsion faciliterait la perméabilisation obtenue par la seconde et de même pour les suivantes. En effet, une fois certaines cellules perméabilisées, les cellules voisines ne perçoivent plus le même champ électrique, elles ne sont plus « protégées » par les cellules qui viennent d'être perméabilisées. Cette question pourrait être étudiée dans le foie qui est un tissu encore plus homogène que le muscle.

D'un point de vue appliqué la transfection pourrait être améliorée par la combinaison avec une injection hydrodynamique locale ou intraveineuse permettant ainsi une meilleure distribution des cellules transfectées et aussi un gain en efficacité d'entrée de l'ADN dans chacune des cellules. L'électrotransfert peut aussi être amélioré en utilisant deux impulsions électrophorétiques inversées pour faire interagir l'ADN des deux côtés des cellules (Golzio, Teissie *et al.* 2002; Faurie, Golzio *et al.* 2003). La migration de l'ADN dans la cellule et son entrée dans le noyau, ainsi que son expression à long terme pourraient également être améliorées en utilisant des plasmides minicercles et des signaux de localisation nucléaires. De même l'utilisation de très forts champs électriques d'une durée de l'ordre de quelques nanosecondes pourrait favoriser l'entrée dans le noyau en le perméabilisant.

Depuis la découverte de l'électrotransfert un certain nombre de travaux ont été réalisés sur les mécanismes de l'électrotransfert permettant par exemple d'affirmer que l'ADN entre en

interaction avec la membrane plasmique sous l'effet d'un champ électrophorétique. Cependant le type d'interaction avec la membrane, le mécanisme exact d'entrée dans la cellule, de migration vers le noyau et d'entrée dans le noyau, restent flous ou controversés. Bien que les mécanismes de l'électrotransfert ne soient toujours pas complètement élucidés et que l'efficacité de transfert ne soient pas encore aussi élevée qu'avec les méthodes virales, les gains importants en terme de sécurité, de simplicité et de coûts, apportés par cette méthode font que quelques essais cliniques ont déjà commencé à voir le jour récemment (voir sur le site <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/PROTOCOL.pdf>). De nombreux essais de thérapie cellulaire impliquant l'électrotransfert *ex vivo* sont en cours mais on trouve aussi deux essais cliniques de phase I impliquant l'électrotransfert intratumorale (mélanome malin) d'un plasmide codant pour l'interleukine-12 ou pour l'interleukine 2 (démarrés respectivement en 2003 et 2005).

Matériel et Méthodes

Matériels et Méthodes.

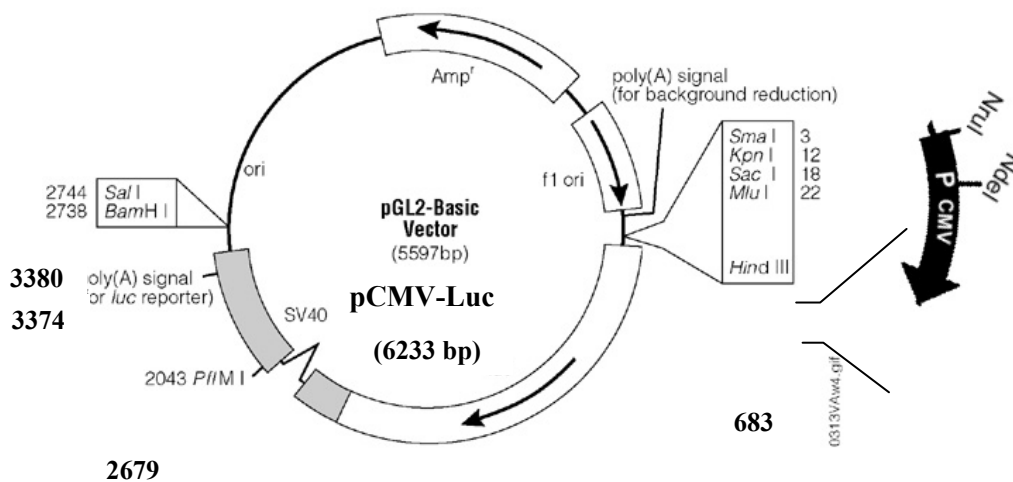
I. PRODUCTION DES VECTEURS PLASMIDIQUES.....	193
A. VECTEURS PLASMIDIQUES.....	193
B. TRANSFORMATION DES BACTERIES.....	194
1. <i>Génotype et caractéristiques des souches d'E. coli.....</i>	<i>194</i>
2. <i>Milieux de culture.....</i>	<i>194</i>
3. <i>Préparation de bactéries électrocompétentes.....</i>	<i>194</i>
4. <i>Transformation de bactéries électrocompétentes par électroporation.....</i>	<i>195</i>
5. <i>Vérification du plasmide transfecté dans les bactéries.....</i>	<i>196</i>
6. <i>Préparation de stocks de bactéries transformées.....</i>	<i>197</i>
C. PRODUCTION DU PLASMIDE : GIGAPREP ENDOTOXIN FREE.....	197
1. <i>Quantification de l'ARN et de l'ADN.....</i>	<i>197</i>
II. EXPERIMENTATION ANIMALE.....	197
A. ANIMAUX.....	197
B. ANESTHESIE.....	197
C. TRANSFERT DE GENES IN VIVO DANS LE MUSCLE SQUELETTIQUE DE SOURIS.....	198
1. <i>Rasage :.....</i>	<i>198</i>
2. <i>Injection de plasmides :.....</i>	<i>198</i>
3. <i>Coinjection avec de la hyaluronidase ou de l'héparine :.....</i>	<i>198</i>
4. <i>Electrotransfert :.....</i>	<i>198</i>
D. TRANSFERT DE GENE IN VIVO DANS UNE TUMEUR SOUS CUTANEE DANS LA SOURIS. ...	198
1. <i>Culture cellulaire :.....</i>	<i>198</i>
2. <i>Inoculation des tumeurs sous cutanées :.....</i>	<i>198</i>
3. <i>Rasage :.....</i>	<i>199</i>
4. <i>Injection de plasmides :.....</i>	<i>199</i>
5. <i>Electrotransfert :.....</i>	<i>199</i>
E. TRANSFERT DE GENE IN VIVO DANS LE FOIE DE LA SOURIS.....	199
1. <i>Laparotomie.....</i>	<i>199</i>
2. <i>Injection de plasmides :.....</i>	<i>199</i>
3. <i>Electrotransfert :.....</i>	<i>199</i>
F. OBSERVATIONS A LA LOUPE BINOCULAIRE AVEC OU SANS FLUORESCENCE.....	200
1. <i>Préparation de l'animal.....</i>	<i>200</i>
2. <i>Optique.....</i>	<i>200</i>
G. PRELEVEMENTS.....	200
1. <i>Prélèvements des tissus chez la souris.....</i>	<i>200</i>
2. <i>Prélèvements de sang.....</i>	<i>200</i>
H. HISTOLOGIE.....	200
I. DOSAGE DE L'ACTIVITE LUCIFERASE.....	201
J. PROTOCOLE DE QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION DE Hsp70.....	201
1. <i>Extraction d'ARN.....</i>	<i>201</i>
2. <i>Transcription inverse (RT).....</i>	<i>202</i>
3. <i>Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....</i>	<i>202</i>
K. STATISTIQUES.....	203

I. Production des vecteurs plasmidiques.

A. Vecteurs plasmidiques.

Le plasmide **pCMVLuc** a été construit en appliquant les techniques de clonage classiques : digestion par enzyme de restrictions, électrophorèse sur gel d'agarose, purification des fragments et ligation.

Ce plasmide a été préparé en utilisant le promoteur du cytomégalo virus du plasmide pcDNA3 (nucleotides 229-890, Invitrogen) inséré en amont de la séquence codante de la luciférase de luciole du plasmide pGL2-Basic Vector (Promega, pGL2-Basic Vector, Cat. E1641). Plus précisément, le promoteur CMV a été inséré dans les sites Mlu I - Hind III du plasmide pGL2 (nucleotides 22-47).



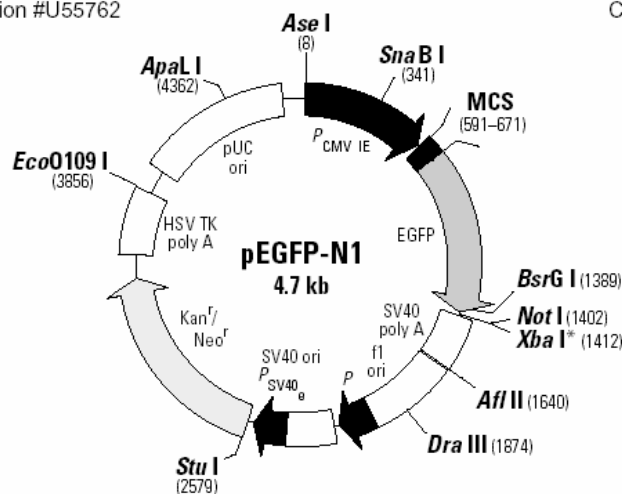
Le plasmide **pEGFPN1** est un vecteur commercial (Clontech) contenant le gène d'un variant de la GFP (Green Fluorescent Protein décalée vers le rouge : pic d'excitation = 488 nm ; pic d'émission = 507 nm) sous contrôle du promoteur CMV.

pEGFP-N1 Vector Information

GenBank Accession #U55762

PT3027-5

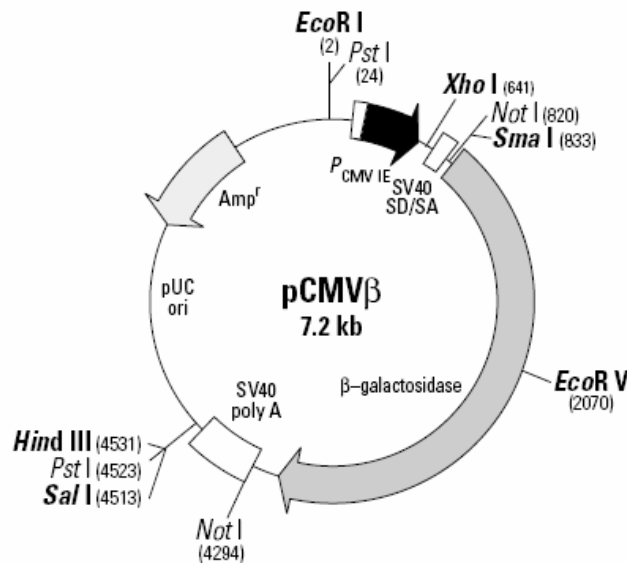
Catalog #6085-1



Le plasmide **pCMV β** est un vecteur commercial (Clontech) contenant le gène de la bêta-galactosidase sous contrôle du promoteur CMV.

pCMV β Vector Information

GenBank Accession #: U02451



Restriction Map of pCMV β . Unique restriction sites are in bold.

B. Transformation des bactéries.

1. Génotype et caractéristiques des souches d'*E. coli*.

La souche d'*E. coli* XL1-Blue, de génotype : *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^{ZAM15} Tn10 (Tet^r)]*, a été utilisée dans les étapes de clonage des plasmides pEGFPN1 et pCMVLuc.

Les cellules XL1-Blue sont déficientes en endonucléases (*endA*), ce qui améliore la qualité des préparations miniprep d'ADN. La mutation *hsdR* empêche la dégradation de l'ADN cloné par le système endonucléase *EcoK*. Enfin, la mutation sur le gène *recA* la rendant déficiente pour la recombinaison homologue évite ainsi les risques de mutations du plasmide au cours de sa préparation.

2. Milieux de culture.

Le milieu complet LB (milieu Luria Bertani : bacto-tryptone 1%, extrait de levure 0,5 %, NaCl 1 %) a été utilisé. Les milieux gélosés (sur les boîtes de Pétri) ont été obtenus par addition de 15 g d'agar par litre de milieu. De plus, ces milieux ont été supplémentés ou non en antibiotiques comme l'ampicilline à 100mg/l ou la kanamycine à 50mg/l.

3. Préparation de bactéries électrocompétentes.

La compétence d'une bactérie est un état temporaire qui lui permet d'absorber des molécules d'ADN exogènes.

- Inoculer une boîte de Pétri, contenant du milieu de culture LB sans antibiotique, avec la souche d'E. coli XL1-Blue. Laisser pousser la boîte en position inversée toute la nuit à 37 °C.
- Sélectionner une colonie de la boîte de culture et inoculer 10 ml de LB dans un erlenmeyer 25 ml. Laisser pousser sous agitation durant toute la nuit à 37 °C.
- Dans un erlenmeyer de 2 l, verser les 10 ml de la culture dans 1 l de LB. Laisser pousser dans l'incubateur à 37 °C sous agitation en surveillant l'évolution de la densité optique (DO) à 600 nm. Lorsque la DO atteint 0,5 à 0,8, les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. Cette étape prend 4 à 8 heures.
- Pour récupérer les bactéries, refroidir l'erlenmeyer dans la glace pendant 15 à 30 minutes et centrifuger à 4000 g pendant 15 minutes à 4 °C.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 1 l d'eau distillée glacée, sans lyser les cellules. Puis centrifuger à 4000 g pendant 15 minutes à 4 °C.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 0,5 l d'eau distillée glacée, sans lyser les cellules. Puis centrifuger à 4000 g pendant 15 minutes à 4 °C.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 20 ml d'une solution glacée de glycérol 10%. Puis centrifuger à 4000 g pendant 15 minutes à 4 °C.
- Éliminer le surnageant et reprendre le culot dans 2 ml d'une solution glacée de glycérol 10%. La concentration cellulaire devrait être proche de $1 \text{ à } 3 \times 10^{10}$ cellules/ml.
- Aliquoter cette suspension dans des eppendorfs 1,5 ml stériles. Congeler immédiatement dans de l'azote liquide puis conserver au congélateur à -80 °C. Les cellules sont conservables pendant au moins 6 mois dans ces conditions.

Remarque : toujours garder les cellules aussi proches de 0 °C que possible durant tout le protocole de préparation.

4. Transformation de bactéries électrocompétentes par électroporation.

Des bactéries *Escherichia coli* XL1-Blue électrocompétentes sont transformées avec le plasmide recombinant qui ne s'intègre pas au génome et se réplique simultanément à la bactérie de façon autonome. La transformation permet une amplification exponentielle rapide et sans modification de la séquence du plasmide. Le plasmide est porteur d'un gène de résistance à un antibiotique permettant la sélection des bactéries transformées. En effet, les bactéries positivement transformées deviennent résistantes à l'antibiotique alors que toutes les autres meurent.

Afin d'obtenir une bonne efficacité de transformation, on utilise la technique d'électroporation. Cette technique consiste à utiliser de hauts voltages pour créer des pores transitoires dans la membrane cellulaire. L'électroporation permet de transformer des bactéries *E. coli* avec une efficacité plus importante que n'importe quelle méthode chimique. Par électroporation, on obtient généralement 10^9 à 10^{10} bactéries transformées par μg d'ADN plasmidique.

- Décongeler les cellules électrocompétentes à température ambiante et les placer ensuite dans la glace.
- Dans un tube de 1,5 ml mélanger 50 μL de bactéries électrocompétentes avec 5 μL d'ADN plasmidique (le plasmide doit être dans un tampon de faible force ionique). Bien homogénéiser puis laisser reposer dans la glace 1 minute.
- Régler l'électroporateur (Gene Pulser, BioRad) sur 25 μF , 200 Ω , 2500 volts. Transférer le mélange cellules/ADN dans une cuve à électroporation (2mm de largeur). On applique ensuite un choc électrique de 5 ms à 2500 volts.

- Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans 1 ml de milieu LB pendant une heure à 37 °C avant d'être étalées sur boîte de Pétri et mises en incubation 12 heures à 37 °C.

5. Vérification du plasmide transfecté dans les bactéries.

a) Miniprep d'ADN (Qiagen).

Ce kit permet de purifier à partir d'une petite quantité de bactéries, 20 à 30 µg de plasmide ADN recombinant. Après lyse de la paroi bactérienne, digestion enzymatique des ARNs, précipitation puis séparation de l'ADN génomique, le plasmide ADN est fixé sur une colonne de chromatographie échangeuse d'anions. Une série de lavages permet d'éliminer une grande partie des protéines. L'ADN est ensuite élué de la colonne par ajout d'une solution de plus grande force ionique, puis précipité en présence d'isopropanol pour être récupéré ensuite par centrifugation.

La Miniprep est réalisée sur des bactéries issues de transformation afin de vérifier que l'ADN exogène intégré par les bactéries compétentes est bien le plasmide recombinant d'intérêt.

Jour un :

- Inoculer 5 ml de LB contenant l'antibiotique approprié avec une colonie précédemment isolée.
- Incuber toute la nuit à 37 °C sous agitation.

Jour deux :

- Prélever 100 µl de culture bactérienne et centrifuger le reste à 6000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Les 100 µl de culture sont remis à pousser dans 20 ml de LB contenant l'antibiotique approprié et serviront éventuellement à réaliser des aliquotes pour la conservation.

Procéder ensuite selon les instructions du manuel du kit.

b) Coupure par des enzymes de restriction.

Compte tenu de la carte de restriction des plasmides recombinants utilisés, des sites de restrictions spécifiques ont été déterminés afin de vérifier la nature des plasmides utilisés. Le nombre et la taille des fragments d'ADN issus de la digestion enzymatique sont vérifiés par migration électrophorétique du plasmide recombinant sur gel d'Agarose 1 %.

c) Electrophorèse d'ADN.

Les fragments d'ADN sont analysés selon leur poids moléculaire par migration sur gel d'agarose 1% dans du tampon de migration TBE 1X (Tris-borate EDTA ; Tris-HCl 90 mM ; acide borique 90 mM ; EDTA 2,5 mM ; pH 8). Des marqueurs de poids moléculaire permettent de déterminer la taille approximative des fragments analysés. À pH=8 (pH de la solution tampon), l'ADN est chargé négativement et migre vers l'anode. La vitesse de migration est inversement proportionnelle au logarithme de sa longueur. Après migration, les acides nucléiques sont colorés au bromure d'éthidium (BET), un réactif intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice ce qui rend l'ADN fluorescent lors de la visualisation sous éclairage UV.

6. Préparation de stocks de bactéries transformées.

Des aliquotes (400 µL de culture bactérienne + 1 ml de glycérol 80 % stérile) sont réalisés à partir de la même colonie bactérienne que celle qui a servi à la Miniprep, si la vérification de la nature du plasmide est bonne. Ces aliquotes peuvent ensuite être conservés plusieurs mois à -80 °C.

C. Production du plasmide : Gigaprep endotoxin free.

Les purifications de plasmide à grande échelle pour les administrations *in vivo* ont été effectuées à l'aide de kits Qiagen : EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, ref 12391) pour des quantités allant jusqu'à 10 mg environ. Ces kits Endofree garantissent une quantité d'endotoxine inférieure ou égale à 0,1U/µg d'ADN pour éviter une réaction immunitaire des animaux.

Une fois produits et purifiés, ces plasmides ont aussi été contrôlés par digestion enzymatique et électrophorèse sur gel d'agarose. Par ailleurs pour avoir un meilleur niveau d'expression, il est important de vérifier sur le gel que la solution d'ADN injectée contient majoritairement de l'ADN plasmidique sous forme superenroulée.

1. Quantification de l'ARN et de l'ADN.

La concentration d'une solution d'ARN ou d'ADN est déterminée par mesure de l'absorbance à 260nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman, DU 530). Une densité optique de 1 correspond à une concentration de 40µg/ml d'ARN simple brin, 50µg/ml d'ADN double brin ou 37µg/ml d'ADN simple brin. Le degré de pureté de l'échantillon est défini par le rapport des densités optiques 260nm/280nm qui doit être le plus proche possible de 2.

La concentration en ARN est donc donnée par la formule suivante :

$[ARN] = A_{260} \times D \times 40 \text{ µg/ml}$, où D est le facteur de dilution de l'échantillon.

II. Expérimentation animale.

A. Animaux

Toutes les expériences sur animaux ont été réalisées d'après les recommandations pour l'expérimentation animale du NIH et du comité national d'éthique.

Les souris utilisées sont des souris femelles C57Bl/6 (Charles River ou Janvier) et aussi quelques souris Swiss mâles (Charles River).

B. Anesthésie

Les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale de 10µl/g d'un mélange anesthésiant de kétamine (Ketalar, 100 mg/kg; Panpharma, Fougères, France) et de xylazine (Rompun, 40 mg/kg; Bayer, Puteaux, France) en solution dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%).

C. Transfert de gènes *in vivo* dans le muscle squelettique de souris

1. Rasage :

Après l'anesthésie, les pattes postérieures des souris sont rasées à l'aide d'une tondeuse (Cordless rechargeable animal trimmer, Wahl USA).

2. Injection de plasmides :

Une solution d'ADN (0,5 µg/µl dans un volume final de 20µl par patte dans du PBS ou du sérum physiologique, NaCl 0,9%) est injectée dans le muscle tibial cranial à l'aide d'une seringue Hamilton RN équipée d'une aiguille de type 4, de calibre 26 G et de longueur 16 mm.

3. Coinjection avec de la hyaluronidase ou de l'héparine :

Lorsque nécessaire, nous avons ajouté à la solution à injecter dans le muscle tibial cranial de la souris anesthésiée, de la hyaluronidase (Sigma H-3631) à raison de 10ui pour 20µl, ou de l'héparine (Lab.Leo, Saint-Quentin, France) à raison de 180 IU/ml

4. Electrotransfert :

Après l'injection longitudinale d'ADN, le muscle à transférer est enduit d'un gel conducteur (Eko-Gel, Egna). Les impulsions électriques sont générées à l'aide du générateur Cliniporator (IGEA, Carpi, Modena, Italy) et appliquées au muscle, environ trente secondes après l'injection d'ADN, à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes de 5 millimètres et placées de part et d'autre de la patte de la souris.

D. Transfert de gène *in vivo* dans une tumeur sous cutanée dans la souris.

1. Culture cellulaire :

Cellules adhérentes B16 (ATCC CRL-6323) : mélanome de souris cultivés dans un milieu Dulbecco modifié avec du glucose 4,5g/l (DMEM-Gibco), de la glutamine (2mM), des antibiotiques (pénicilline 100U/ml et streptomycine 100µg/ml) et 10% de sérum de veau foetal. Les cellules sont cultivées dans des flacons de culture de 75cm² avec 25ml de milieu de culture dans des étuves à 37°C sous une atmosphère à 5% de CO₂ et 95% d'humidité. La confluence étant atteinte en deux ou trois jours, les cellules sont passées deux fois par semaine environ.

2. Inoculation des tumeurs sous cutanées :

Les souris sont injectées, en sous cutanées, dans le flanc gauche, avec 10⁶ cellules B16 dans 100 µl de milieu de culture DMEM. Les tumeurs sont traitées lorsqu'elles atteignent un diamètre de 6-7 mm (7-8 jours après inoculation).

3. Rasage :

Après l'anesthésie, les tumeurs des souris sont rasées à l'aide d'une tondeuse (Cordless rechargeable animal trimmer, Wahl USA).

4. Injection de plasmides :

Une solution d'ADN (50 µg dilué dans un volume final de 50µl par tumeur dans du PBS) est injectée dans la tumeur à l'aide d'une seringue Hamilton RN équipée d'une aiguille de type 4, de calibre 26 G et de longueur 16 mm.

5. Electrotransfert :

Après l'injection d'ADN, la tumeur à transfecter est enduite d'un gel conducteur (Eko-Gel, Egna). Les impulsions électriques sont générées à l'aide du générateur Cliniporator (IGEA, Carpi, Modena, Italy) et appliquées à la tumeur, environ trente secondes après l'injection d'ADN, à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes de 5 millimètres et placées de part et d'autre de la tumeur.

E. Transfert de gène in vivo dans le foie de la souris

1. Laparotomie

L'abdomen de la souris est rasé à l'aide d'une tondeuse (Cordless rechargeable animal trimmer, Wahl USA), puis une incision est pratiquée sous la xiphoïde, pour exposer le plus gros lobe gauche du foie.

2. Injection de plasmides :

Pour l'injection locale, une solution d'ADN (50 µg dilué dans un volume final de 250µl dans du PBS) est injectée dans le lobe à l'aide d'une seringue à insuline (BD U-100) équipée d'une aiguille de calibre 30 G.

Pour l'injection systémique une solution d'ADN (0,8 µg/µl dilué dans un volume final de 100µl dans du PBS) est injectée en rétroorbitale.

Lorsque nécessaire, nous avons ajouté à la solution à injecter dans le foie de la souris anesthésiée, de l'héparine (Lab.Leo, Saint-Quentin, France) à raison de 400 IU/ml.

L'héparine étant un anticoagulant, des saignements ont été observés, tout particulièrement lors des injections rapides dans le foie, induisant une mortalité des souris injectées. 1 mg d'héparine (MW 10–12 kDa) correspond à peu près à 137 IU.

3. Electrotransfert :

Après l'injection d'ADN, le lobe à transfecter est enduit d'un gel conducteur (Eko-Gel, Egna). Les impulsions électriques sont générées à l'aide du générateur Cliniporator (IGEA, Carpi, Modena, Italy) et appliquées au lobe, environ trente secondes après l'injection d'ADN,

à l'aide de deux électrodes plates en acier inoxydable, distantes de 3 millimètres et placées de part et d'autre du lobe.

Après traitement, le plan musculaire et la peau sont suturés.

F. Observations à la loupe binoculaire avec ou sans fluorescence.

1. Préparation de l'animal.

Les souris sont sacrifiées par asphyxie et l'organe à observer est exposé après dissection.

2. Optique

L'imagerie optique est réalisée avec un appareil photo numérique Camedia C-5050ZOOM, fixé sur une loupe binoculaire à fluorescence (Leica MZ FLIII). Pour les mesures de fluorescence l'acquisition est réalisée généralement pour un temps d'exposition compris entre 0,5 et 4 seconde. La fluorescence due à la GFP ou à la lucifer yellow sont observées à l'aide du filtre « Leica GFP Plus filter set » (Leica, Rueil-Malmaison, France), celle due à l'iodure de propidium est observée avec un filtre vert Leica (filtre d'excitation 546/10 nm, filtre passe haut 590 nm).

G. Prélèvements

1. Prélèvements des tissus chez la souris

Les souris sont sacrifiées par asphyxie. Le tissu traité est mis à nu puis prélevé. Pour le dosage de protéines ou d'ARN, les tissus sont directement mis dans des tubes contenant le tampon de récupération correspondant puis conservés à -20°C. Pour la réalisation de coupes histochimiques, les muscles sont fixés 24 h avec du Glyo-Fixx (Shandon, Pittsburgh, PA, USA).

2. Prélèvements de sang

Les échantillons de sang sont prélevés chez la souris par ponction rétro-orbitale à l'aide d'une pipette pasteur ou par ponction intra-cardiaque lorsque les souris devaient être sacrifiées. Le sang était laissé à température ambiante jusqu'à coagulation (environ une heure), puis les tubes étaient centrifugés à 2 000 g pendant 20 minutes à 4°C. Le sérum était alors récupéré puis stocké à -20°C jusqu'au dosage. Les dosages de la créatine kinase (CK, un marqueur de lésion musculaire) dans le sérum ont été réalisés par le laboratoire d'analyse de l'IGR.

H. Histologie

Les analyses histologiques ont été réalisées par Elisabeth Connault et le Dr. Paule Opolon de l'UMR 8121. Les muscles prélevés sont fixés 24 h dans du Glyo-Fixx (Shandon, Pittsburgh, PA, USA). Ils sont ensuite inclus dans un bloc de paraffine avant d'être découpés en tranches. Les lames (4 mm) sont colorées avec un mélange hématoxyline-éosine-safran.

La coloration hématoxyline, éosine, safran permet de mettre en évidence sur les coupes les noyaux, le cytoplasme ainsi que la matrice extracellulaire de la cellule musculaire. En effet, cette coloration associe un colorant nucléaire (hématoxyline), un colorant cytoplasmique (éosine), est un colorant du collagène III (safran). Ainsi, suite à cette coloration, les noyaux apparaissent colorés en bleu, le cytoplasme en rose et la matrice extracellulaire en jaune.

I. Dosage de l'activité Luciférase.

Le tissu à analysé est placé dans un tube avec des billes (Bio 101 Systems Lysing Matrix A tube) (Q-Biogene, Illkirch, France) et contenant 1 ml de tampon de lyse 1X (25mM Tris-phosphate pH7,8 ; 2mM DTT; 2mM acide 1,2-diaminocyclohexane- N,N,N',N'-tetraacétique ; 10% glycérol, 1% Triton® X-100) préparé à partir de Cell Culture Lysis Reagent 5X (Promega) supplémenté d'un cocktail d'antiprotéases (une tablette d'inhibiteur de protéase dissoute dans 50 ml de tampon de lyse 1X ; Complete/Protease Inhibitor Cocktail tablets, Roche Diagnostics). L'ensemble est ensuite broyé à l'aide d'un Fast Prep Instrument (Q-Biogene) pendant 30 s à vitesse 6,5. Pour éviter une dégradation de la luciférase par la chaleur, les tubes sont placés, immédiatement après l'homogénéisation, quelques secondes sur la glace. Le broyat est ensuite centrifugé 10 minutes à 12000 g et le surnageant récupéré. La quantité de luciférase produite par le muscle est évaluée par le dosage de son activité enzymatique à l'aide du kit Luciferase Assay System (Promega). Le principe du test repose sur le fait que la luciférase catalyse l'oxydation de la luciférine (contenue dans le tampon de réaction du kit) en oxyluciférine, réaction qui s'accompagne d'une émission de lumière proportionnelle à la quantité de protéine présente. Cette émission de photons est ensuite quantifiée. Ainsi, 20 µl du surnageant sont mélangés à 10 µl de substrat et la luminescence est mesurée par intégration de la lumière émise sur 10 s avec un luminomètre Lumat LB 9507 (Berthold France SA, Thoiry, France). Les résultats du luminomètre sont donnés en unité de luminescence relative (RLU). Une calibration avec différentes concentration d'enzyme luciférase purifiée permet de convertir les RLU en pg de luciférase ($\text{Log (pg)} = 1.24 \text{ log(RLU)} - 4.83$).

J. Protocole de quantification de l'expression de Hsp70.

1. Extraction d'ARN.

Remarque : tout le matériel et les solutions utilisés pour l'extraction des ARN doivent être réservés à la manipulation d'ARN et dépourvus de ribonucléases (RNases).

Les ARN totaux des muscles squelettiques de souris sont extraits à partir d'un protocole inspiré de la méthode développée par Chomczynski en 1987 en utilisant le Trizol® LS Reagent (GibcoBRL, Life Technologies).

Lors de la dissection de la patte de la souris, les muscles sont soigneusement récupérés et placés dans des tubes avec des billes (Bio 101 Systems Lysing Matrix A tube) (Q-Biogene, Illkirch, France) et contenant du RNA later® (Cliniscience, Montrouge, France), prête à l'emploi, pendant une nuit. Cette solution permet la stabilisation des ARN. Les muscles sont ensuite récupérés et congelés à sec à -80 °C. Lors de la décongélation, 1 ml de Trizol est ajouté à chaque tube et l'ensemble est broyé à l'aide d'un Fast Prep Instrument (Q-Biogene) pendant 13 s à vitesse 6,5. Après la lyse du muscle les tubes sont centrifugés à 12 000 g pendant 10 min. Le surnageant est récupéré et du chloroforme (Sigma) est ajouté (200 µl/ml de Trizol) et l'ensemble est vortexé 15s. Après une incubation de 10 minutes dans la glace, les tubes sont centrifugés 20 minutes à 4°C à 13 000 g. La phase aqueuse contient les ARN et la

phase organique contient l'ADN et les protéines. La phase aqueuse est récupérée et à cette phase est ajouté de l'isopropanol (Sigma) (0,5 ml/ml de Trizol). Après une incubation dans la glace de 30 minutes, les tubes sont centrifugés 20 minutes à 13 000 g. Le culot est récupéré et lavé avec 400 µl d'éthanol 70% (v/v) et séché. Il est ensuite remis en suspension dans 30 µl d'eau exempte de nucléase. Les solutions d'ARN doivent être conservées à -80°C. La non dégradation des ARN est vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose et la quantité d'ARN est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. Une densité optique de 1 correspond à une concentration de 40 µg/ml d'ARN simple brin. La concentration en ARN est donc donnée par la formule suivante :

$[ARN] = A_{260} \times D \times 40 \text{ µg/ml}$, où D est le facteur de dilution de l'échantillon.

2. Transcription inverse (RT)

L'ADNc est obtenu à partir de 2 µg d'ARN par transcription inverse en utilisant des amorces (polydT12-18) se fixant sur la séquence poly-Adénylée des ARN messagers. Ces amorces, contrairement aux amorces à fixation aléatoire, nous permettent d'obtenir l'ADN complémentaire uniquement des ARNs messagers. La synthèse du brin d'ADNc est réalisée dans le tampon RT, en présence des amorces polydT par la transcriptase inverse (Omniscript reverse transcriptase, Qiagen) pendant 90 minutes à 37 °C. Les ARN restants sont dénaturés par la chaleur (5 minutes, 95 °C).

3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Les ADNc des gènes codant pour les différentes protéines d'intérêt sont amplifiés par PCR. Les amorces ont été conçues selon des séquences publiées dans les numéros d'accension GenBank sont mentionnés dans le tableau 1. De plus, nous avons vérifié à l'aide du programme BLAST et de la banque de séquences GenBank que les amorces ainsi dessinées étaient spécifiques. La spécificité d'amplification a été déterminée à l'aide du programme Amplify 1.2 (Genetics Department of Wisconsin, USA). Les conditions de PCR pour chacun de ces marqueurs ont été préalablement optimisées. Les conditions de température d'hybridation des amorces et les nombres de cycles réalisés sont mentionnés dans le tableau 2. La PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycler (Mastercycler Gradient, Eppendorf, Le Pecq, France). Les échantillons sont d'abord chauffés à 95 °C pendant 15 minutes pour activer la Taq polymérase (Hot Start Taq polymérase, Qiagen). Les cycles d'amplification (dénaturation, fixation des amorces et synthèse) sont alors réalisés (45 s, 95 °C ; 45 s, T °C de fixation des amorces ; 45 s, 72 °C). L'étape d'élongation finale est réalisée dix minutes à 72 °C.

Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (p/v) dans un tampon TBE colorés par du BET (0,5 µg/ml) et pris en photo sous lumière UV. Les tailles des différents fragments sont rapportées dans le tableau 3. Le niveau d'expression des différents gènes est apprécié par une analyse densitométrique de chaque bande réalisée à l'aide d'un logiciel (Scion Image, Scion Corporation, Frederick, MD, USA) et les résultats sont exprimés par le rapport (Hsp70)/(gène constitutif GAPDH) en unités arbitraires (U.A.).

Gènes	Publications	Numéro d'accension GenBank
GAPDH	Piechaczik (1984)	NM_017008
Hsp70i	Mestril (1994)	X 75357

Tableaux 1 : numéros d'accension GenBank des différents de séquences publiées

Séquences	Sens	Antisens	Tm	Nombre de cycles
GAPDH	5'-GACAACTCACTCAAGATTGTCAG-3'	5'-CATTGTCATACCAGGAAATG-3'	56 °C	23
Hsp70i	5'-GGAGGTCATCTCCTGGCTGGACTC-3'	5'-CGCCTGGGCCCCGAAGCCCCCAGC-3'	71 °C	27

Tableau 2 : conditions de PCR pour l'étude de l'expression des ARNm des gènes codant pour les différentes protéines d'intérêt.

GAPDH **Hsp70i**
531-bp 158-bp

Tableaux 3 : tailles des fragments (paires de base) de PCR obtenus

K. Statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel StatView. Les résultats étaient exprimés en moyenne $\pm$ écart standard à la moyenne (SEM). Pour les variables discontinues, l'analyse statistique était effectuée à l'aide d'un test U de Mann-Withney. Concernant les mesures répétées, l'analyse statistique était effectuée à l'aide d'une analyse de variance (ANOVA).

Notations des statistiques : différence significative avec NS non significatif, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Références

Références

- Abdallah, B., A. Hassan, C. Benoist, D. Goula, J. P. Behr et B. A. Demeneix (1996). "A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine." Hum Gene Ther 7(16): 1947-54.
- Abidor, I. G., V. B. Arakelyan, L. V. Chernomordik, Y. A. Chizmadzhev, V. P. Pastushenko et M. R. Tarasevich (1979). "Electric breakdown of Bilayer Lipid Membranes. I : The main experimental facts and their qualitative discussion." Bioelectrochem Bioenerg 6: 37-52.
- Achenbach, T. V., B. Brunner et K. Heermeier (2003). "Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference." Chembiochem 4(10): 928-35.
- Adachi, O., A. Nakano, O. Sato, S. Kawamoto, H. Tahara, N. Toyoda, E. Yamato, A. Matsumori, K. Tabayashi et J. Miyazaki (2002). "Gene transfer of Fc-fusion cytokine by in vivo electroporation: application to gene therapy for viral myocarditis." Gene Ther 9(9): 577-83.
- Aihara, H. et J. Miyazaki (1998). "Gene transfer into muscle by electroporation in vivo." Nat Biotechnol 16(9): 867-70.
- Aiuti, A., S. Slavin, M. Aker, F. Ficari, S. Deola, A. Mortellaro, S. Morecki, G. Andolfi, A. Tabucchi, F. Carlucci, E. Marinello, F. Cattaneo, S. Vai, P. Servida, R. Miniero, M. G. Roncarolo et C. Bordignon (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." Science 296(5577): 2410-3.
- Akhtar, I., J. P. Gold, L. Y. Pan, J. L. Ferrara, X. D. Yang, J. I. Kim et K. N. Tan (1995). "CD4+ beta islet cell-reactive T cell clones that suppress autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice." J Exp Med 182(1): 87-97.
- Alba, R., A. Bosch et M. Chillon (2005). "Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy." Gene Ther 12 Suppl 1: S18-27.
- Alberts, B., D. Bray, S. Perelman, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts et P. Walter (1999). "L'essentiel de la biologie cellulaire. Introduction à la biologie moléculaire de la cellule." Collection : Médecine-Sciences, édition : Flammarion
- Alzghoul, M. B., D. Gerrard, B. A. Watkins et K. Hannon (2004). "Ectopic expression of IGF-I and Shh by skeletal muscle inhibits disuse-mediated skeletal muscle atrophy and bone osteopenia in vivo." Faseb J 18(1): 221-3.
- Amabile, P. G., J. M. Waugh, T. N. Lewis, C. J. Elkins, W. Janas et M. D. Dake (2001). "High-efficiency endovascular gene delivery via therapeutic ultrasound." J Am Coll Cardiol 37(7): 1975-80.
- Amado, R. G. et I. S. Chen (1999). "Lentiviral vectors--the promise of gene therapy within reach?" Science 285(5428): 674-6.
- Andre, F. et L. M. Mir (2004). "DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications." Gene Ther 11 Suppl 1: S33-42.
- Andre, F. M., C. Cournil-Henrionnet, D. Vernerey, P. Opolon et L. M. Mir (2006). "Variability of naked DNA expression after direct local injection: the influence of the injection speed." Gene Ther.
- Andreasson, G. L. et G. A. Evans (1988). "Introduction and expression of DNA molecules in eukaryotic cells by electroporation." Biotechniques 6(7): 650-60.
- Andreasson, G. L. et G. A. Evans (1989). "Optimization of electroporation for transfection of mammalian cell lines." Anal Biochem 180(2): 269-75.
- Andrews, J. M., G. C. Newbound et M. D. Lairmore (1997). "Transcriptional modulation of viral reporter gene constructs following induction of the cellular stress response." Nucleic Acids Res 25(5): 1082-4.
- Aubert, D., S. Menoret, E. Chiari, V. Pichard, S. Durand, L. Tesson, P. Moullier, I. Anegón et N. Ferry (2002). "Cytotoxic immune response blunts long-term transgene expression after efficient retroviral-mediated hepatic gene transfer in rat." Mol Ther 5(4): 388-96.
- Aurisicchio, L., H. Bujard, W. Hillen, R. Cortese, G. Ciliberto, N. La Monica et F. Palombo (2001). "Regulated and prolonged expression of mIFN(alpha) in immunocompetent mice mediated by a helper-dependent adenovirus vector." Gene Ther 8(24): 1817-25.
- Baba, M., H. Iishi et M. Tatsuta (2001). "Transfer of bcl-xs plasmid is effective in preventing and inhibiting rat hepatocellular carcinoma induced by N-nitrosomorpholine." Gene Ther 8(15): 1149-56.
- Babiuk, L. A., R. Pontarollo, S. Babiuk, B. Loehr et S. van Drunen Littel-van den Hurk (2003). "Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals." Vaccine 21(7-8): 649-58.
- Babiuk, S., M. E. Baca-Estrada, M. Foldvari, M. Storms, D. Rabussay, G. Widera et L. A. Babiuk (2002). "Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals." Vaccine 20(27-28): 3399-3408.

- Bachoud-Levi, A. C., N. Deglon, J. P. Nguyen, J. Bloch, C. Bourdet, L. Winkel, P. Remy, M. Goddard, J. P. Lefaucheur, P. Brugieres, S. Baudic, P. Cesaro, M. Peschanski et P. Aebischer (2000). "Neuroprotective gene therapy for Huntington's disease using a polymer encapsulated BHK cell line engineered to secrete human CNTF." *Hum Gene Ther* 11(12): 1723-9.
- Bachy, M., F. Boudet, M. Bureau, Y. Girerd-Chambaz, P. Wils, D. Scherman et C. Meric (2001). "Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse." *Vaccine* 19(13-14): 1688-93.
- Backman, C. M., Y. Zhang, B. J. Hoffer et A. C. Tomac (2004). "Tetracycline-inducible expression systems for the generation of transgenic animals: a comparison of various inducible systems carried in a single vector." *J Neurosci Methods* 139(2): 257-62.
- Baiker, A., C. Maercker, C. Piechaczek, S. B. Schmidt, J. Bode, C. Benham et H. J. Lipps (2000). "Mitotic stability of an episomal vector containing a human scaffold/matrix-attached region is provided by association with nuclear matrix." *Nat Cell Biol* 2(3): 182-4.
- Bakker, J. M., W. K. Bleeker et P. W. Parren (2004). "Therapeutic antibody gene transfer: an active approach to passive immunity." *Mol Ther* 10(3): 411-6.
- Barry, M. E., D. Pinto-Gonzalez, F. M. Orson, G. J. McKenzie, G. R. Petry et M. A. Barry (1999). "Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection." *Hum Gene Ther* 10(15): 2461-80.
- Beebe, S. J., J. White, P. F. Blackmore, Y. Deng, K. Somers et K. H. Schoenbach (2003). "Diverse effects of nanosecond pulsed electric fields on cells and tissues." *DNA Cell Biol* 22(12): 785-96.
- Bekeredjian, R., S. Chen, P. A. Frenkel, P. A. Grayburn et R. V. Shohet (2003). "Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart." *Circulation* 108(8): 1022-6.
- Belehradek, J., Jr., S. Orlowski, L. H. Ramirez, G. Pron, B. Poddevin et L. M. Mir (1994). "Electroporation of cells in tissues assessed by the qualitative and quantitative electroloading of bleomycin." *Biochim Biophys Acta* 1190(1): 155-63.
- Benz, R. et U. Zimmermann (1981). "The resealing process of lipid bilayers after reversible electrical breakdown." *Biochim Biophys Acta* 640(1): 169-78.
- Benz, R. et U. Zimmermann (1983). "Evidence for the presence of mobile charges in the cell membrane of *Valonia utricularis*." *Biophys J* 43(1): 13-26.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond et G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* 409(6818): 363-6.
- Bertrand, A., V. Ngo-Muller, D. Hentzen, J. P. Concordet, D. Daegelen et D. Tuil (2003). "Muscle electrotransfer as a tool for studying muscle fiber-specific and nerve-dependent activity of promoters." *Am J Physiol Cell Physiol* 285(5): C1071-81.
- Bessis, N., M. C. Boissier, P. Ferrara, T. Blankenstein, D. Fradelizi et C. Fournier (1996). "Attenuation of collagen-induced arthritis in mice by treatment with vector cells engineered to secrete interleukin-13." *Eur J Immunol* 26(10): 2399-403.
- Bessis, N., L. Guery, A. Mantovani, A. Vecchi, J. E. Sims, D. Fradelizi et M. C. Boissier (2000). "The type II decoy receptor of IL-1 inhibits murine collagen-induced arthritis." *Eur J Immunol* 30(3): 867-75.
- Bettan, M., F. Emmanuel, R. Dartail, J. M. Caillaud, F. Soubrier, P. Delaere, D. Branelec, A. Mahfoudi, N. Duverger et D. Scherman (2000). "High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle." *Mol Ther* 2(3): 204-10.
- Bettan, M., M. A. Ivanov, L. M. Mir, F. Boissiere, P. Delaere et D. Scherman (2000). "Efficient DNA electrotransfer into tumors." *Bioelectrochemistry* 52(1): 83-90.
- Bhindi, R., L. M. Khachigian et H. C. Lowe (2006). "DNAzymes targeting the transcription factor Egr-1 reduce myocardial infarct size following ischemia-reperfusion in rats." *J Thromb Haemost* 4(7): 1479-83.
- Bielinska, A. U., J. F. Kukowska-Latallo et J. R. Baker, Jr. (1997). "The interaction of plasmid DNA with polyamidoamine dendrimers: mechanism of complex formation and analysis of alterations induced in nuclease sensitivity and transcriptional activity of the complexed DNA." *Biochim Biophys Acta* 1353(2): 180-90.
- Bier, M., S. M. Hammer, D. J. Canaday et R. C. Lee (1999). "Kinetics of sealing for transient electropores in isolated mammalian skeletal muscle cells." *Bioelectromagnetics* 20(3): 194-201.
- Bird, A. P. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." *Nature* 321(6067): 209-13.
- Blair-Parks, K., B. C. Weston et D. A. Dean (2002). "High-level gene transfer to the cornea using electroporation." *J Gene Med* 4(1): 92-100.
- Blau, H. M. et M. L. Springer (1995). "Muscle-mediated gene therapy." *N Engl J Med* 333(23): 1554-6.
- Blomberg, P., M. Eskandarpour, S. Xia, C. Sylven et K. B. Islam (2002). "Electroporation in combination with a plasmid vector containing SV40 enhancer elements results in increased and persistent gene expression in mouse muscle." *Biochem Biophys Res Commun* 298(4): 505-10.
- Bloquel, C., N. Bessis, M. C. Boissier, D. Scherman et P. Bigey (2004). "Gene therapy of collagen-induced arthritis by electrotransfer of human tumor necrosis factor-alpha soluble receptor I variants." *Hum Gene Ther* 15(2): 189-201.

- Bloquel, C., E. Fabre, M. F. Bureau et D. Scherman (2004). "Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications." *J Gene Med* 6 Suppl 1: S11-23.
- Bodine, S. C., T. N. Stitt, M. Gonzalez, W. O. Kline, G. L. Stover, R. Bauerlein, E. Zlotchenko, A. Scrimgeour, J. C. Lawrence, D. J. Glass et G. D. Yancopoulos (2001). "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo." *Nat Cell Biol* 3(11): 1014-9.
- Bohl, D., N. Naffakh et J. M. Heard (1997). "Long-term control of erythropoietin secretion by doxycycline in mice transplanted with engineered primary myoblasts." *Nat Med* 3(3): 299-305.
- Bohl, D., A. Salvetti, P. Moullier et J. M. Heard (1998). "Control of erythropoietin delivery by doxycycline in mice after intramuscular injection of adeno-associated vector." *Blood* 92(5): 1512-7.
- Bonnafeuf, P., M. Vernhes, J. Teissie et B. Gabriel (1999). "The generation of reactive-oxygen species associated with long-lasting pulse-induced electroporation of mammalian cells is based on a non-destructive alteration of the plasma membrane." *Biochim Biophys Acta* 1461(1): 123-34.
- Bossard, C., L. Van den Berghe, H. Laurell, C. Castano, M. Cerutti, A. C. Prats et H. Prats (2004). "Antiangiogenic properties of fibrostatin, an extracellular FGF-2-binding polypeptide." *Cancer Res* 64(20): 7507-12.
- Boussif, O., T. Delair, C. Brua, L. Veron, A. Pavirani et H. V. Kolbe (1999). "Synthesis of polyallylamine derivatives and their use as gene transfer vectors in vitro." *Bioconjug Chem* 10(5): 877-83.
- Boussif, O., F. Lezoualc'h, M. A. Zanta, M. D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix et J. P. Behr (1995). "A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(16): 7297-301.
- Breakefield, X. O. et N. A. DeLuca (1991). "Herpes simplex virus for gene delivery to neurons." *New Biol* 3(3): 203-18.
- Brenner, S. et H. L. Malech (2003). "Current developments in the design of onco-retrovirus and lentivirus vector systems for hematopoietic cell gene therapy." *Biochim Biophys Acta* 1640(1): 1-24.
- Bretscher, M. S. (1985). "The molecules of the cell membrane." *Sci Am* 253(4): 100-8.
- Briguet, A., D. Bleckmann, M. Bettan, N. Mermod et T. Meier (2003). "Transcriptional activation of the utrophin promoter B by a constitutively active Ets-transcription factor." *Neuromuscul Disord* 13(2): 143-50.
- Brown, B. D. et D. Lillicrap (2002). "Dangerous liaisons: the role of "danger" signals in the immune response to gene therapy." *Blood* 100(4): 1133-40.
- Brown, M. D., A. G. Schatzlein et I. F. Uchegbu (2001). "Gene delivery with synthetic (non viral) carriers." *Int J Pharm* 229(1-2): 1-21.
- Brunner, S., E. Furtbauer, T. Sauer, M. Kursu et E. Wagner (2002). "Overcoming the nuclear barrier: cell cycle independent nonviral gene transfer with linear polyethylenimine or electroporation." *Mol Ther* 5(1): 80-6.
- Brunner, S., T. Sauer, S. Carotta, M. Cotten, M. Saltik et E. Wagner (2000). "Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus." *Gene Ther* 7(5): 401-7.
- Budker, V., T. Budker, G. Zhang, V. Subbotin, A. Loomis et J. A. Wolff (2000). "Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process." *J Gene Med* 2(2): 76-88.
- Budker, V., G. Zhang, I. Danko, P. Williams et J. Wolff (1998). "The efficient expression of intravascularly delivered DNA in rat muscle." *Gene Ther* 5(2): 272-6.
- Burcin, M. M., G. Schiedner, S. Kochanek, S. Y. Tsai et B. W. O'Malley (1999). "Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 355-60.
- Bureau, M. F., J. Gehl, V. Deleuze, L. M. Mir et D. Scherman (2000). "Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer." *Biochim Biophys Acta* 1474(3): 353-9.
- Bureau, M. F., S. Naimi, R. Torero Ibad, J. Seguin, C. Georger, E. Arnould, L. Maton, F. Blanche, P. Delaere et D. Scherman (2004). "Intramuscular plasmid DNA electrotransfer: biodistribution and degradation." *Biochim Biophys Acta* 1676(2): 138-48.
- Calvin, N. M. et P. C. Hanawalt (1988). "High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation." *J Bacteriol* 170(6): 2796-801.
- Canatella, P. J., J. F. Karr, J. A. Petros et M. R. Prausnitz (2001). "Quantitative study of electroporation-mediated molecular uptake and cell viability." *Biophys J* 80(2): 755-64.
- Capecci, M. R. (1980). "High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells." *Cell* 22(2 Pt 2): 479-88.
- Cappelletti, M., I. Zampaglione, G. Rizzuto, G. Ciliberto, N. La Monica et E. Fattori (2003). "Gene electro-transfer improves transduction by modifying the fate of intramuscular DNA." *J Gene Med* 5(4): 324-32.
- Carmen, I. H. (2001). "A death in the laboratory: the politics of the Gelsinger aftermath." *Mol Ther* 3(4): 425-8.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, G. de Saint Basile, F. Gross, E. Yvon, P. Nusbaum, F. Selz, C. Hue, S. Certain, J. L. Casanova, P. Bousso, F. L. Deist et A. Fischer (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." *Science* 288(5466): 669-72.

- Celiker, M. Y., M. Wang, E. Atsidaftos, X. Liu, Y. E. Liu, Y. Jiang, E. Valderrama, I. D. Goldberg et Y. E. Shi (2001). "Inhibition of Wilms' tumor growth by intramuscular administration of tissue inhibitor of metalloproteinases-4 plasmid DNA." *Oncogene* 20(32): 4337-43.
- Cemazar, M., A. Grosel, D. Glavac, V. Kotnik, M. Skobrne, S. Kranjc, L. M. Mir, F. Andre, P. Opolon et G. Sersa (2003). "Effects of electrogenetherapy with p53wt combined with cisplatin on survival of human tumor cell lines with different p53 status." *DNA Cell Biol* 22(12): 765-75.
- Chancham, P., T. van Ijperen, I. McDoom et J. A. Hughes (2003). "Nucleic acid-matrix attachment recognition regions--as facilitators in plasmid transfer." *J Drug Target* 11(4): 205-13.
- Chang, D. C. et T. S. Reese (1990). "Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy." *Biophys J* 58(1): 1-12.
- Chen, N., K. H. Schoenbach, J. F. Kolb, R. James Swanson, A. L. Garner, J. Yang, R. P. Joshi et S. J. Beebe (2004). "Leukemic cell intracellular responses to nanosecond electric fields." *Biochem Biophys Res Commun* 317(2): 421-7.
- Chen, W. et R. C. Lee (1994). "Evidence for electrical shock-induced conformational damage of voltage-gated ionic channels." *Ann N Y Acad Sci* 720: 124-35.
- Chernajovsky, Y., G. Adams, K. Triantaphyllopoulos, M. F. Ledda et O. L. Podhajcer (1997). "Pathogenic lymphoid cells engineered to express TGF beta 1 ameliorate disease in a collagen-induced arthritis model." *Gene Ther* 4(6): 553-9.
- Chernajovsky, Y., D. J. Gould et O. L. Podhajcer (2004). "Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis?" *Nat Rev Immunol* 4(10): 800-11.
- Chernomordik, L. V., S. I. Sukharev, I. G. Abidor et Y. A. Chizmadzhev (1983). "Breakdown of lipid bilayer membranes in an electric field." *Biochim Biophys Acta* 736: 203-13.
- Chesnoy, S. et L. Huang (2000). "Structure and function of lipid-DNA complexes for gene delivery." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 29: 27-47.
- Chesnoy, S. et L. Huang (2002). "Enhanced cutaneous gene delivery following intradermal injection of naked DNA in a high ionic strength solution." *Mol Ther* 5(1): 57-62.
- Chiou, H. C., M. V. Tangco, S. M. Levine, D. Robertson, K. Kormis, C. H. Wu et G. Y. Wu (1994). "Enhanced resistance to nuclease degradation of nucleic acids complexed to asialoglycoprotein-polylysine carriers." *Nucleic Acids Res* 22(24): 5439-46.
- Christopherson, K. S., M. R. Mark, V. Bajaj et P. J. Godowski (1992). "Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a Drosophila ecdysone receptor and chimeric transactivators." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(14): 6314-8.
- Chu, G., H. Hayakawa et P. Berg (1987). "Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA." *Nucleic Acids Res* 15(3): 1311-26.
- Chuang, T. H., J. Lee, L. Kline, J. C. Mathison et R. J. Ulevitch (2002). "Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling." *J Leukoc Biol* 71(3): 538-44.
- Clarke, D. C., D. Miskovic, X. X. Han, J. Calles-Escandon, J. F. Glatz, J. J. Luiken, J. J. Heikkila et A. Bonen (2004). "Overexpression of membrane-associated fatty acid binding protein (FABPpm) in vivo increases fatty acid sarcolemmal transport and metabolism." *Physiol Genomics* 17(1): 31-7.
- Colin, M., M. Maurice, G. Trugnan, M. Kornprobst, R. P. Harbottle, A. Knight, R. G. Cooper, A. D. Miller, J. Capeau, C. Coutelle et M. C. Brahimi-Horn (2000). "Cell delivery, intracellular trafficking and expression of an integrin-mediated gene transfer vector in tracheal epithelial cells." *Gene Ther* 7(2): 139-52.
- Collombet, J. M., V. C. Wheeler, F. Vogel et C. Coutelle (1997). "Introduction of plasmid DNA into isolated mitochondria by electroporation. A novel approach toward gene correction for mitochondrial disorders." *J Biol Chem* 272(8): 5342-7.
- Coonrod, A., F. Q. Li et M. Horwitz (1997). "On the mechanism of DNA transfection: efficient gene transfer without viruses." *Gene Ther* 4(12): 1313-21.
- Cordier, L., G. P. Gao, A. A. Hack, E. M. McNally, J. M. Wilson, N. Chirmule et H. L. Sweeney (2001). "Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies." *Hum Gene Ther* 12(2): 205-15.
- Coster, H. G. (1965). "A quantitative analysis of the voltage-current relationships of fixed charge membranes and the associated property of "punch-through". " *Biophys J* 5(5): 669-86.
- Crook, K., G. McLachlan, B. J. Stevenson et D. J. Porteous (1996). "Plasmid DNA molecules complexed with cationic liposomes are protected from degradation by nucleases and shearing by aerosolisation." *Gene Ther* 3(9): 834-9.
- Crowley, J. M. (1973). "Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability." *Biophys J* 13(7): 711-24.
- Cudd, A., T. Arvinte, B. Schulz et C. Nicolau (1989). "Dextran protection of erythrocytes from low-pH-induced hemolysis." *FEBS Lett* 250(2): 293-6.
- Cymbalyuk, E. S. et S. M. Serov (1994). "Transformation of immobilized cells at two-pulse electrotreatment with addition of donor DNA between pulses." *Biol Membr* 10(6): 581-6.

- Danielou, G., A. S. Comtois, R. W. Dudley, J. Nalbantoglu, R. Gilbert, G. Karpati, D. H. Jones et B. J. Petrof (2002). "Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage." *Mol Ther* 6(5): 687-93.
- Darquet, A. M., B. Cameron, P. Wils, D. Scherman et J. Crouzet (1997). "A new DNA vehicle for nonviral gene delivery: supercoiled minicircle." *Gene Ther* 4(12): 1341-9.
- Darquet, A. M., R. Rangara, P. Kreiss, B. Schwartz, S. Naimi, P. Delaere, J. Crouzet et D. Scherman (1999). "Minicircle: an improved DNA molecule for in vitro and in vivo gene transfer." *Gene Ther* 6(2): 209-18.
- Darteil, R., M. Wang, M. Latta-Mahieu, A. Caron, A. Mahfoudi, B. Staels et V. Thuillier (2002). "Efficient gene regulation by PPAR gamma and thiazolidinediones in skeletal muscle and heart." *Mol Ther* 6(2): 265-71.
- Dass, C. R. (2004). "Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection." *J Mol Med* 82(9): 579-91.
- Dauty, E. et A. S. Verkman (2005). "Actin cytoskeleton as the principal determinant of size-dependent DNA mobility in cytoplasm: a new barrier for non-viral gene delivery." *J Biol Chem* 280(9): 7823-8.
- Davalos, R. V., I. L. Mir et B. Rubinsky (2005). "Tissue ablation with irreversible electroporation." *Ann Biomed Eng* 33(2): 223-31.
- Davalos, R. V., B. Rubinsky et L. M. Mir (2003). "Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation." *Bioelectrochemistry* 61(1-2): 99-107.
- Davies, J. B., V. T. Ciavatta, J. H. Boatright et J. M. Nickerson (2003). "Delivery of several forms of DNA, DNA-RNA hybrids, and dyes across human sclera by electrical fields." *Mol Vis* 9: 569-78.
- Davis, H. L., M. L. Michel et R. G. Whalen (1993). "DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody." *Hum Mol Genet* 2(11): 1847-51.
- Davis, H. L., C. L. Millan et S. C. Watkins (1997). "Immune-mediated destruction of transfected muscle fibers after direct gene transfer with antigen-expressing plasmid DNA." *Gene Ther* 4(3): 181-8.
- Davis, H. L., R. G. Whalen et B. A. Demeneix (1993). "Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression." *Hum Gene Ther* 4(2): 151-9.
- de Gennes, P. G. (1999). "Passive entry of a DNA molecule into a small pore." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(13): 7262-4.
- Dean, D. A. (1997). "Import of plasmid DNA into the nucleus is sequence specific." *Exp Cell Res* 230(2): 293-302.
- Dean, D. A. (2000). "Peptide nucleic acids: versatile tools for gene therapy strategies." *Adv Drug Deliv Rev* 44(2-3): 81-95.
- Dean, D. A., J. N. Byrd, Jr. et B. S. Dean (1999). "Nuclear targeting of plasmid DNA in human corneal cells." *Curr Eye Res* 19(1): 66-75.
- Dean, D. A., D. Machado-Aranda, K. Blair-Parks, A. V. Yeldandi et J. L. Young (2003). "Electroporation as a method for high-level nonviral gene transfer to the lung." *Gene Ther* 10(18): 1608-15.
- Delort, J. P. et M. R. Capecchi (1996). "TAXI/UAS: A molecular switch to control expression of genes in vivo." *Hum Gene Ther* 7(7): 809-20.
- Delteil, C., J. Teissie et M. P. Rols (2000). "Effect of serum on in vitro electrically mediated gene delivery and expression in mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 1467(2): 362-8.
- Denet, A. R., R. Vanbever et V. Preat (2004). "Skin electroporation for transdermal and topical delivery." *Adv Drug Deliv Rev* 56(5): 659-74.
- Deng, C. X., F. Sieling, H. Pan et J. Cui (2004). "Ultrasound-induced cell membrane porosity." *Ultrasound Med Biol* 30(4): 519-26.
- Densmore, C. L. (2006). "Advances in noninvasive pulmonary gene therapy." *Curr Drug Deliv* 3(1): 55-63.
- Dezawa, M., M. Takano, H. Negishi, X. Mo, T. Oshitari et H. Sawada (2002). "Gene transfer into retinal ganglion cells by in vivo electroporation: a new approach." *Micron* 33(1): 1-6.
- Dias, N. et C. A. Stein (2002). "Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms." *Mol Cancer Ther* 1(5): 347-55.
- Dileo, J., T. E. Miller, Jr., S. Chesnoy et L. Huang (2003). "Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design." *Hum Gene Ther* 14(1): 79-87.
- Dimitrov, D. S. et A. E. Sowers (1990). "Membrane electroporation--fast molecular exchange by electroosmosis." *Biochim Biophys Acta* 1022(3): 381-92.
- Distel, B., S. J. Gould, T. Voorn-Brouwer, M. van der Berg, H. F. Tabak et S. Subramani (1992). "The carboxyl-terminal tripeptide serine-lysine-leucine of firefly luciferase is necessary but not sufficient for peroxisomal import in yeast." *New Biol* 4(2): 157-65.
- Doh, S. G., H. L. Vahlsing, J. Hartikka, X. Liang et M. Manthorpe (1997). "Spatial-temporal patterns of gene expression in mouse skeletal muscle after injection of lacZ plasmid DNA." *Gene Ther* 4(7): 648-63.
- Donahue, B. A., J. G. McArthur, S. K. Spratt, D. Bohl, C. Lagarde, L. Sanchez, B. A. Kaspar, B. A. Sloan, Y. L. Lee, O. Danos et R. O. Snyder (1999). "Selective uptake and sustained expression of AAV vectors following subcutaneous delivery." *J Gene Med* 1(1): 31-42.
- Dove, A. (2002). "Antisense and sensibility." *Nat Biotechnol* 20(2): 121-4.

- Dowty, M. E., P. Williams, G. Zhang, J. E. Hagstrom et J. A. Wolff (1995). "Plasmid DNA entry into postmitotic nuclei of primary rat myotubes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4572-6.
- Drabick, J. J., J. Glasspool-Malone, A. King et R. W. Malone (2001). "Cutaneous transfection and immune responses to intradermal nucleic acid vaccination are significantly enhanced by in vivo electroporabilization." *Mol Ther* 3(2): 249-55.
- Draghia-Akli, R., A. S. Khan, K. K. Cummings, D. Parghi, R. H. Carpenter et P. A. Brown (2002). "Electrical enhancement of formulated plasmid delivery in animals." *Technol Cancer Res Treat* 1(5): 365-72.
- Duguez, S., M. C. Bihan, D. Gouttefangeas, L. Feasson et D. Freyssenet (2003). "Myogenic and nonmyogenic cells differentially express proteinases, Hsc/Hsp70, and BAG-1 during skeletal muscle regeneration." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285(1): E206-15.
- Duguez, S., L. Feasson, C. Denis et D. Freyssenet (2002). "Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282(4): E802-9.
- Dujardin, N., E. Staes, Y. Kalia, P. Clarys, R. Guy et V. Preat (2002). "In vivo assessment of skin electroporation using square wave pulses." *J Control Release* 79(1-3): 219-27.
- Dujardin, N., P. Van Der Smissen et V. Preat (2001). "Topical gene transfer into rat skin using electroporation." *Pharm Res* 18(1): 61-6.
- Dunlap, D. D., A. Maggi, M. R. Soria et L. Monaco (1997). "Nanoscope structure of DNA condensed for gene delivery." *Nucleic Acids Res* 25(15): 3095-101.
- Dupuis, M., K. Denis-Mize, C. Woo, C. Goldbeck, M. J. Selby, M. Chen, G. R. Otten, J. B. Ulmer, J. J. Donnelly, G. Ott et D. M. McDonald (2000). "Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice." *J Immunol* 165(5): 2850-8.
- Durieux, A. C., R. Bonnefoy, T. Busso et D. Freyssenet (2004). "In vivo gene electrotransfer into skeletal muscle: effects of plasmid DNA on the occurrence and extent of muscle damage." *J Gene Med* 6(7): 809-16.
- During, M. J., R. Xu, D. Young, M. G. Kaplitt, R. S. Sherwin et P. Leone (1998). "Peroral gene therapy of lactose intolerance using an adeno-associated virus vector." *Nat Med* 4(10): 1131-5.
- Edd, J. F., L. Horowitz, R. V. Davalos, L. M. Mir et B. Rubinsky (2006). "In vivo results of a new focal tissue ablation technique: irreversible electroporation." *IEEE Trans Biomed Eng* 53(7): 1409-15.
- Edelstein, M. L., M. R. Abedi, J. Wixon et R. M. Edelstein (2004). "Gene therapy clinical trials worldwide 1989-2004-an overview." *J Gene Med* 6(6): 597-602.
- Ekmark, M., E. Gronevik, P. Schjerling et K. Gundersen (2003). "Myogenin induces higher oxidative capacity in pre-existing mouse muscle fibres after somatic DNA transfer." *J Physiol* 548(Pt 1): 259-69.
- el Ouagari, K., B. Gabriel, H. Benoist et J. Teissie (1993). "Electric field-mediated glycophorin insertion in cell membrane is a localized event." *Biochim Biophys Acta* 1151(1): 105-9.
- Escande-Geraud, M. L., M. P. Rols, M. A. Dupont, N. Gas et J. Teissie (1988). "Reversible plasma membrane ultrastructural changes correlated with electroporabilization in Chinese hamster ovary cells." *Biochim Biophys Acta* 939(2): 247-59.
- Escriou, V., M. Carriere, D. Scherman et P. Wils (2003). "NLS bioconjugates for targeting therapeutic genes to the nucleus." *Adv Drug Deliv Rev* 55(2): 295-306.
- Espinos, E., J. H. Liu, C. R. Bader et L. Bernheim (2001). "Efficient non-viral DNA-mediated gene transfer to human primary myoblasts using electroporation." *Neuromuscul Disord* 11(4): 341-9.
- Eynard, N., M. P. Rols, V. Ganeva, B. Galutzov, N. Sabri et J. Teissie (1997). "Electrotransformation pathways of prokaryotic and eukaryotic cells: recent developments." *Bioelectrochem Bioenerg* 44(1): 103-10.
- Eynard, N., S. Sixou, N. Duran et J. Teissie (1992). "Fast kinetics studies of Escherichia coli electrotransformation." *Eur J Biochem* 209(1): 431-6.
- Fakharzadeh, S. S., Y. Zhang, R. Sarkar et H. H. Kazazian, Jr. (2000). "Correction of the coagulation defect in hemophilia A mice through factor VIII expression in skin." *Blood* 95(9): 2799-805.
- Farhood, H., N. Serbina et L. Huang (1995). "The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer." *Biochim Biophys Acta* 1235(2): 289-95.
- Farre, J. C. et A. Araya (2001). "Gene expression in isolated plant mitochondria: high fidelity of transcription, splicing and editing of a transgene product in electroporated organelles." *Nucleic Acids Res* 29(12): 2484-91.
- Faurie, C., M. Golzio, P. Moller, J. Teissie et M. P. Rols (2003). "Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer." *DNA Cell Biol* 22(12): 777-83.
- Faurie, C., E. Phez, M. Golzio, C. Vossen, J. C. Lesbordes, C. Delteil, J. Teissie et M. P. Rols (2004). "Effect of electric field vectoriality on electrically mediated gene delivery in mammalian cells." *Biochim Biophys Acta* 1665(1-2): 92-100.
- Favre, D., Y. Cherel, N. Provost, V. Blouin, N. Ferry, P. Moullier et A. Salvetti (2000). "Hyaluronidase enhances recombinant adeno-associated virus (rAAV)-mediated gene transfer in the rat skeletal muscle." *Gene Ther* 7(16): 1417-20.
- Felgner, J. H., R. Kumar, C. N. Sridhar, C. J. Wheeler, Y. J. Tsai, R. Border, P. Ramsey, M. Martin et P. L. Felgner (1994). "Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations." *J Biol Chem* 269(4): 2550-61.

- Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold et M. Danielsen (1987). "Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure." Proc Natl Acad Sci U S A 84(21): 7413-7.
- Felgner, P. L. et G. M. Ringold (1989). "Cationic liposome-mediated transfection." Nature 337(6205): 387-8.
- Ferrer, A., H. Foster, K. E. Wells, G. Dickson et D. J. Wells (2004). "Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins." Gene Ther 11(11): 884-93.
- Ferrer, A., K. E. Wells et D. J. Wells (2000). "Immune responses to dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy." Gene Ther 7(17): 1439-46.
- Forster, Y. et B. Schwenzer (2004). "Inhibition of TF gene expression by antisense oligonucleotides in different cancer cell lines." J Exp Ther Oncol 4(4): 281-9.
- Foster, K. R. et H. P. Schwan (1989). "Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review." Crit Rev Biomed Eng 17(1): 25-104.
- Freundlieb, S., C. Schirra-Muller et H. Bujard (1999). "A tetracycline controlled activation/repression system with increased potential for gene transfer into mammalian cells." J Gene Med 1(1): 4-12.
- Friedmann, T. (1989). "Progress toward human gene therapy." Science 244(4910): 1275-81.
- Friedrich, U., N. Stachowicz, A. Simm, G. Fuhr, K. Lucas et U. Zimmermann (1998). "High efficiency electrotransfection with aluminum electrodes using microsecond controlled pulses." Bioelectrochem Bioenerg 47(1): 103-11.
- Frost, R. A., G. J. Nystrom et C. H. Lang (2006). "Multiple Toll-like receptor ligands induce an IL-6 transcriptional response in skeletal myocytes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 290(3): R773-84.
- Fukuda, K., N. Sakamoto, T. Narita, K. Saitoh, T. Kameda, H. Iba et S. Yasugi (2000). "Application of efficient and specific gene transfer systems and organ culture techniques for the elucidation of mechanisms of epithelial-mesenchymal interaction in the developing gut." Dev Growth Differ 42(3): 207-11.
- Furth, P. A., L. St Onge, H. Boger, P. Gruss, M. Gossen, A. Kistner, H. Bujard et L. Hennighausen (1994). "Temporal control of gene expression in transgenic mice by a tetracycline-responsive promoter." Proc Natl Acad Sci U S A 91(20): 9302-6.
- Fussenegger, M. (2001). "The impact of mammalian gene regulation concepts on functional genomic research, metabolic engineering, and advanced gene therapies." Biotechnol Prog 17(1): 1-51.
- Fynan, E. F., R. G. Webster, D. H. Fuller, J. R. Haynes, J. C. Santoro et H. L. Robinson (1993). "DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations." Proc Natl Acad Sci U S A 90(24): 11478-82.
- Gabriel, B. et J. Teissie (1994). "Generation of reactive-oxygen species induced by electroporation of Chinese hamster ovary cells and their consequence on cell viability." Eur J Biochem 223(1): 25-33.
- Gabriel, B. et J. Teissie (1995). "Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporation of Chinese hamster ovary cells." Biochim Biophys Acta 1266(2): 171-8.
- Gabriel, B. et J. Teissie (1997). "Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporated cell membrane." Biophys J 73(5): 2630-7.
- Ganeva, V., B. Galutov et J. Teissie (1995). "Fast kinetic studies of plasmid DNA transfer in intact yeast cells mediated by electroporation." Biochem Biophys Res Commun 214(3): 825-32.
- Gass, G. V. et L. V. Chernomordik (1990). "Reversible large-scale deformations in the membranes of electrically-treated cells: electroinduced bleb formation." Biochim Biophys Acta 1023(1): 1-11.
- Gehl, J. (2003). "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research." Acta Physiol Scand 177(4): 437-47.
- Gehl, J. et L. M. Mir (1999). "Determination of optimal parameters for in vivo gene transfer by electroporation, using a rapid in vivo test for cell permeabilization." Biochem Biophys Res Commun 261(2): 377-80.
- Gehl, J., T. Skovsgaard et L. M. Mir (2002). "Vascular reactions to in vivo electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery." Biochim Biophys Acta 1569(1-3): 51-8.
- Gehl, J., T. H. Sorensen, K. Nielsen, P. Raskmark, S. L. Nielsen, T. Skovsgaard et L. M. Mir (1999). "In vivo electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution." Biochim Biophys Acta 1428(2-3): 233-40.
- Gissel, H. et T. Clausen (2003). "Ca²⁺ uptake and cellular integrity in rat EDL muscle exposed to electrostimulation, electroporation, or A23187." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 285(1): R132-42.
- Glaser, R. W., S. L. Leikin, L. V. Chernomordik, V. F. Pastushenko et A. I. Sokirko (1988). "Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores." Biochim Biophys Acta 940(2): 275-87.
- Godbey, W. T., K. K. Wu et A. G. Mikos (1999). "Tracking the intracellular path of poly(ethylenimine)/DNA complexes for gene delivery." Proc Natl Acad Sci U S A 96(9): 5177-81.
- Goldspink, G. (2003). "Skeletal muscle as an artificial endocrine tissue." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 17(2): 211-22.

- Gollins, H., J. McMahon, K. E. Wells et D. J. Wells (2003). "High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle." *Gene Ther* 10(6): 504-12.
- Golzio, M., L. Mazzolini, P. Moller, M. P. Rols et J. Teissie (2005). "Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery." *Gene Ther* 12(3): 246-51.
- Golzio, M., M. P. Mora, C. Raynaud, C. Delteil, J. Teissie et M. P. Rols (1998). "Control by osmotic pressure of voltage-induced permeabilization and gene transfer in mammalian cells." *Biophys J* 74(6): 3015-22.
- Golzio, M., M. P. Rols et J. Teissie (2004). "In vitro and in vivo electric field-mediated permeabilization, gene transfer, and expression." *Methods* 33(2): 126-35.
- Golzio, M., J. Teissie et M. P. Rols (2002). "Cell synchronization effect on mammalian cell permeabilization and gene delivery by electric field." *Biochim Biophys Acta* 1563(1-2): 23-8.
- Golzio, M., J. Teissie et M. P. Rols (2002). "Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3): 1292-7.
- Gordon, J. W. et F. H. Ruddle (1983). "Gene transfer into mouse embryos: production of transgenic mice by pronuclear injection." *Methods Enzymol* 101: 411-33.
- Gordon, J. W., G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa et F. H. Ruddle (1980). "Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(12): 7380-4.
- Gossen, M. et H. Bujard (1992). "Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(12): 5547-51.
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Muller, W. Hillen et H. Bujard (1995). "Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells." *Science* 268(5218): 1766-9.
- Gothelf, A., L. M. Mir et J. Gehl (2003). "Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation." *Cancer Treat Rev* 29(5): 371-87.
- Goto, T., T. Nishi, O. Kobayashi, T. Tamura, S. B. Dev, H. Takeshima, M. Kochi, J. Kuratsu, T. Sakata et Y. Ushio (2004). "Combination electro-gene therapy using herpes virus thymidine kinase and interleukin-12 expression plasmids is highly efficient against murine carcinomas in vivo." *Mol Ther* 10(5): 929-37.
- Goto, T., T. Nishi, T. Tamura, S. B. Dev, H. Takeshima, M. Kochi, K. Yoshizato, J. Kuratsu, T. Sakata, G. A. Hofmann et Y. Ushio (2000). "Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 354-9.
- Gowrishankar, T. R., U. Pliquett et R. C. Lee (1999). "Dynamics of membrane sealing in transient electroporation of skeletal muscle membranes." *Ann N Y Acad Sci* 888: 195-210.
- Goyenvalle, A., A. Vulin, F. Fougereuse, F. Leturcq, J. C. Kaplan, L. Garcia et O. Danos (2004). "Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping." *Science* 306(5702): 1796-9.
- Granneman, J. G., P. Li, Y. Lu et J. Tilak (2004). "Seeing the trees in the forest: selective electroporation of adipocytes within adipose tissue." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 287(3): E574-82.
- Grasso, R. J., R. Heller, J. C. Cooley et E. M. Haller (1989). "Electrofusion of individual animal cells directly to intact corneal epithelial tissue." *Biochim Biophys Acta* 980(1): 9-14.
- Grieger, J. C. et R. J. Samulski (2005). "Packaging capacity of adeno-associated virus serotypes: impact of larger genomes on infectivity and postentry steps." *J Virol* 79(15): 9933-44.
- Grishok, A. (2005). "RNAi mechanisms in *Caenorhabditis elegans*." *FEBS Lett* 579(26): 5932-9.
- Grosse-Hovest, L., S. Muller, R. Minoia, E. Wolf, V. Zakhartchenko, H. Wenigerkind, C. Lassnig, U. Besenfelder, M. Muller, S. D. Lytton, G. Jung et G. Brem (2004). "Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18): 6858-63.
- Gurunathan, S., D. M. Klinman et R. A. Seder (2000). "DNA vaccines: immunology, application, and optimization*." *Annu Rev Immunol* 18: 927-74.
- Habel, M. E., M. Drouin et D. Jung (2004). "Maintenance of Epstein-Barr virus-derived episomal vectors in the murine Sp2/0 myeloma cell line is dependent upon exogenous expression of human EBP2." *Biochem Cell Biol* 82(3): 375-80.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. von Kalle, M. Schmidt, F. Le Deist, N. Wulffraat, E. McIntyre, I. Radford, J. L. Villeval, C. C. Fraser, M. Cavazzana-Calvo et A. Fischer (2003). "A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency." *N Engl J Med* 348(3): 255-6.
- Hagstrom, J. E., J. J. Ludtke, M. C. Bassik, M. G. Sebestyen, S. A. Adam et J. A. Wolff (1997). "Nuclear import of DNA in digitonin-permeabilized cells." *J Cell Sci* 110 (Pt 18): 2323-31.
- Hagstrom, J. E., I. N. Rybakova, T. Staeva, J. A. Wolff et J. M. Ervasti (1996). "Nonnuclear DNA binding proteins in striated muscle." *Biochem Mol Med* 58(1): 113-21.
- Han, S., R. I. Mahato, Y. K. Sung et S. W. Kim (2000). "Development of biomaterials for gene therapy." *Mol Ther* 2(4): 302-17.
- Hannon, G. J. (2002). "RNA interference." *Nature* 418(6894): 244-51.
- Harimoto, K., K. Sugimura, C. R. Lee, K. Kuratsukuri et T. Kishimoto (1998). "In vivo gene transfer methods in the bladder without viral vectors." *Br J Urol* 81(6): 870-4.

- Harrison, R. L., B. J. Byrne et L. Tung (1998). "Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue." FEBS Lett 435(1): 1-5.
- Hartikka, J., V. Bozoukova, D. Jones, R. Mahajan, M. K. Wloch, M. Sawdey, C. Buchner, L. Sukhu, K. M. Barnhart, A. M. Abai, J. Meek, N. Shen et M. Manthorpe (2000). "Sodium phosphate enhances plasmid DNA expression in vivo." Gene Ther 7(14): 1171-82.
- Hartikka, J., M. Sawdey, F. Cornefert-Jensen, M. Margalith, K. Barnhart, M. Nolasco, H. L. Vahlsing, J. Meek, M. Marquet, P. Hobart, J. Norman et M. Manthorpe (1996). "An improved plasmid DNA expression vector for direct injection into skeletal muscle." Hum Gene Ther 7(10): 1205-17.
- Hartikka, J., L. Sukhu, C. Buchner, D. Hazard, V. Bozoukova, M. Margalith, W. K. Nishioka, C. J. Wheeler, M. Manthorpe et M. Sawdey (2001). "Electroporation-facilitated delivery of plasmid DNA in skeletal muscle: plasmid dependence of muscle damage and effect of poloxamer 188." Mol Ther 4(5): 407-15.
- Hebert, E. (2003). "Improvement of exogenous DNA nuclear importation by nuclear localization signal-bearing vectors: a promising way for non-viral gene therapy?" Biol Cell 95(2): 59-68.
- Heller, R. et R. J. Grasso (1990). "Transfer of human membrane surface components by incorporating human cells into intact animal tissue by cell-tissue electrofusion in vivo." Biochim Biophys Acta 1024(1): 185-8.
- Heller, R., M. Jaroszeski, A. Atkin, D. Moradpour, R. Gilbert, J. Wands et C. Nicolau (1996). "In vivo gene electroinjection and expression in rat liver." FEBS Lett 389(3): 225-8.
- Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda et S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." Nature 408(6813): 740-5.
- Hengge, U. R., E. F. Chan, R. A. Foster, P. S. Walker et J. C. Vogel (1995). "Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA." Nat Genet 10(2): 161-6.
- Herweijer, H. et J. A. Wolff (2003). "Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy." Gene Ther 10(6): 453-8.
- Herweijer, H., G. Zhang, V. M. Subbotin, V. Budker, P. Williams et J. A. Wolff (2001). "Time course of gene expression after plasmid DNA gene transfer to the liver." J Gene Med 3(3): 280-91.
- Hickman, M. A., R. W. Malone, K. Lehmann-Bruinsma, T. R. Sih, D. Knoell, F. C. Szoka, R. Walzem, D. M. Carlson et J. S. Powell (1994). "Gene expression following direct injection of DNA into liver." Hum Gene Ther 5(12): 1477-83.
- Ho, S. H., W. Hahn, H. J. Lee, D. S. Kim, J. G. Jeong, S. Kim, S. S. Yu, E. S. Jeon, S. Kim et J. M. Kim (2004). "Protection against collagen-induced arthritis by electrotransfer of an expression plasmid for the interleukin-4." Biochem Biophys Res Commun 321(4): 759-66.
- Hofmann, G. (2000). "Instrumentation and electrodes for in vivo electroporation." In Jaroszeski, M. J., Heller, R., Gilbert, R., editors. Electrochemotherapy, electrogenethrapy and transdermal drug delivery: electrically mediated delivery of molecules to cells. Totowa, New Jersey: Humana press: 37-61.
- Hoover, F. et J. Magne Kalhovde (2000). "A double-injection DNA electroporation protocol to enhance in vivo gene delivery in skeletal muscle." Anal Biochem 285(1): 175-8.
- Hosseinkhani, H., T. Aoyama, O. Ogawa et Y. Tabata (2002). "Ultrasound enhancement of in vitro transfection of plasmid DNA by a cationized gelatin." J Drug Target 10(3): 193-204.
- Hosseinkhani, H., T. Aoyama, O. Ogawa et Y. Tabata (2003). "Ultrasound enhances the transfection of plasmid DNA by non-viral vectors." Curr Pharm Biotechnol 4(2): 109-22.
- Houk, B. E., R. Martin, G. Hochhaus et J. A. Hughes (2001). "Pharmacokinetics of plasmid DNA in the rat." Pharm Res 18(1): 67-74.
- Hristova, N. I., I. Tsoneva et E. Neumann (1997). "Sphingosine-mediated electroporative DNA transfer through lipid bilayers." FEBS Lett 415(1): 81-6.
- Huber, P. E., M. J. Mann, L. G. Melo, A. Ehsan, D. Kong, L. Zhang, M. Rezvani, P. Peschke, F. Jolesz, V. J. Dzau et K. Hynynen (2003). "Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery." Gene Ther 10(18): 1600-7.
- Hui, S. W. et D. A. Stenger (1993). "Electrofusion of cells: hybridoma production by electrofusion and polyethylene glycol." Methods Enzymol 220: 212-27.
- Huth, S., J. Lausier, S. W. Gersting, C. Rudolph, C. Plank, U. Welsch et J. Rosenecker (2004). "Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer." J Gene Med 6(8): 923-36.
- Imler, J. L. et J. A. Hoffmann (2001). "Toll receptors in innate immunity." Trends Cell Biol 11(7): 304-11.
- Imoto, J. et E. Konishi (2005). "Needle-free jet injection of a mixture of Japanese encephalitis DNA and protein vaccines: a strategy to effectively enhance immunogenicity of the DNA vaccine in a murine model." Viral Immunol 18(1): 205-12.
- Indenbom, A. V., P. I. Kuzmin et A. Chizmadzhev Yu (1997). "Changes in the electrical properties of the skin outermost layer during pulse electrotreatment." Membr Cell Biol 11(3): 367-80.
- Inoue, T. et R. Krumlauf (2001). "An impulse to the brain--using in vivo electroporation." Nat Neurosci 4 Suppl: 1156-8.
- Ishida, O., K. Maruyama, K. Sasaki et M. Iwatsuru (1999). "Size-dependent extravasation and interstitial localization of polyethyleneglycol liposomes in solid tumor-bearing mice." Int J Pharm 190(1): 49-56.

- Itaka, K., A. Harada, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi et K. Kataoka (2004). "In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine." J Gene Med 6(1): 76-84.
- Ivanov, M. A., B. Lamrihi, M. Szyf, D. Scherman et P. Bigey (2003). "Enhanced antitumor activity of a combination of MBD2-antisense electrotransfer gene therapy and bleomycin electrochemotherapy." J Gene Med 5(10): 893-9.
- Jadoul, A., J. Bouwstra et V. V. Preat (1999). "Effects of iontophoresis and electroporation on the stratum corneum. Review of the biophysical studies." Adv Drug Deliv Rev 35(1): 89-105.
- Jaichandran, S., S. T. Yap, A. B. Khoo, L. P. Ho, S. L. Tien et O. L. Kon (2006). "In vivo liver electroporation: optimization and demonstration of therapeutic efficacy." Hum Gene Ther 17(3): 362-75.
- Jakob, T., P. S. Walker, A. M. Krieg, M. C. Udey et J. C. Vogel (1998). "Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA." J Immunol 161(6): 3042-9.
- Jansen, B. et U. Zangemeister-Wittke (2002). "Antisense therapy for cancer--the time of truth." Lancet Oncol 3(11): 672-83.
- Janssen, A. P., R. M. Schiffelers, T. L. ten Hagen, G. A. Koning, A. J. Schraa, R. J. Kok, G. Storm et G. Molema (2003). "Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy." Int J Pharm 254(1): 55-8.
- Jaroszeski, M. J., R. Gilbert, C. Nicolau et R. Heller (2000). "Delivery of genes in vivo using pulsed electric fields " In Jaroszeski, M. J., Heller, R., Gilbert, R., editors. Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery: electrically mediated delivery of molecules to cells. Totowa, New Jersey: Humana press: 173-86.
- Jastreboff, M. M., E. Ito, J. R. Bertino et R. Narayanan (1987). "Use of electroporation for high-molecular-weight DNA-mediated gene transfer." Exp Cell Res 171(2): 513-7.
- Jayankura, M., C. Boggione, C. Frisen, O. Boyer, P. Fouret, G. Saillant et D. Klatzmann (2003). "In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer." J Gene Med 5(7): 618-24.
- Jen, K. Y. et A. M. Gewirtz (2000). "Suppression of gene expression by targeted disruption of messenger RNA: available options and current strategies." Stem Cells 18(5): 307-19.
- Jeong, J. G., J. M. Kim, S. H. Ho, W. Hahn, S. S. Yu et S. Kim (2004). "Electrotransfer of human IL-1Ra into skeletal muscles reduces the incidence of murine collagen-induced arthritis." J Gene Med 6(10): 1125-33.
- Jiang, Y., M. Wang, M. Y. Celiker, Y. E. Liu, Q. X. Sang, I. D. Goldberg et Y. E. Shi (2001). "Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery." Cancer Res 61(6): 2365-70.
- Kafri, T., U. Blomer, D. A. Peterson, F. H. Gage et I. M. Verma (1997). "Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors." Nat Genet 17(3): 314-7.
- Kanitakis, J. (2002). "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." Eur J Dermatol 12(4): 390-9; quiz 400-1.
- Kay, M. A., J. C. Glorioso et L. Naldini (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med 7(1): 33-40.
- Khan, A. S., L. C. Smith, R. V. Abruzzese, K. K. Cummings, M. A. Pope, P. A. Brown et R. Draghia-Akli (2003). "Optimization of electroporation parameters for the intramuscular delivery of plasmids in pigs." DNA Cell Biol 22(12): 807-14.
- Kim, H. J., J. F. Greenleaf, R. R. Kinnick, J. T. Bronk et M. E. Bolander (1996). "Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells." Hum Gene Ther 7(11): 1339-46.
- Kim, J. M., S. H. Ho, W. Hahn, J. G. Jeong, E. J. Park, H. J. Lee, S. S. Yu, C. S. Lee, Y. W. Lee et S. Kim (2003). "Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein." Gene Ther 10(15): 1216-24.
- Kim, S. H., S. Kim, C. H. Evans, S. C. Ghivizzani, T. Oligino et P. D. Robbins (2001). "Effective treatment of established murine collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express IL-4." J Immunol 166(5): 3499-505.
- Kinosita, K., M. Hibino, H. Itoh, M. Shigemori, K. Hirano, Y. Kirino et T. Hayakawa (1992). "Events of membrane electroporation visualized on a time scale from microsecond to seconds." In Guide to Electroporation and Electrofusion Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A., et Sowers, A. E., editors, Academic Press Inc., (New York): 29-46.
- Kinosita, K., Jr. et T. T. Tsong (1977). "Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field." Proc Natl Acad Sci U S A 74(5): 1923-7.
- Kinosita, K., Jr. et T. Y. Tsong (1977). "Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane." Nature 268(5619): 438-41.
- Kinosita, K., Jr. et T. Y. Tsong (1977). "Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes." Biochim Biophys Acta 471(2): 227-42.
- Kirman, J. R. et R. A. Seder (2003). "DNA vaccination: the answer to stable, protective T-cell memory?" Curr Opin Immunol 15(4): 471-6.

- Kishida, T., H. Asada, S. Gojo, S. Ohashi, M. Shin-Ya, K. Yasutomi, R. Terauchi, K. A. Takahashi, T. Kubo, J. Imanishi et O. Mazda (2004). "Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA." *J Gene Med* 6(1): 105-10.
- Kishida, T., H. Asada, E. Satoh, S. Tanaka, M. Shinya, H. Hirai, M. Iwai, H. Tahara, J. Imanishi et O. Mazda (2001). "In vivo electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice." *Gene Ther* 8(16): 1234-40.
- Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmer, H. Lubbert et H. Bujard (1996). "Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20): 10933-8.
- Klein, R. M., E. D. Wolf, R. Wu et J. C. Sanford (1992). "High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. 1987." *Biotechnology* 24: 384-6.
- Klenchin, V. A., S. I. Sukharev, S. M. Serov, L. V. Chernomordik et A. Chizmadzhev Yu (1991). "Electrically induced DNA uptake by cells is a fast process involving DNA electrophoresis." *Biophys J* 60(4): 804-11.
- Klinman, D. M., A. K. Yi, S. L. Beaucage, J. Conover et A. M. Krieg (1996). "CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(7): 2879-83.
- Knutson, J. C. et D. Yee (1987). "Electroporation: parameters affecting transfer of DNA into mammalian cells." *Anal Biochem* 164(1): 44-52.
- Kobayashi, S., K. Dono, T. Tanaka, S. Takahara, Y. Isaka, E. Imai, H. Nagano, K. Tomoaki, K. Umeshita, S. Nakamori, M. Sakon et M. Monden (2003). "Gene transfer into the liver by plasmid injection into the portal vein combined with electroporation." *J Gene Med* 5(3): 201-8.
- Koch, S., P. Pohl, U. Cobet et N. G. Rainov (2000). "Ultrasound enhancement of liposome-mediated cell transfection is caused by cavitation effects." *Ultrasound Med Biol* 26(5): 897-903.
- Koltover, I., T. Salditt, J. O. Radler et C. R. Safinya (1998). "An inverted hexagonal phase of cationic liposome-DNA complexes related to DNA release and delivery." *Science* 281(5373): 78-81.
- Konishi, E., S. Kosugi et J. Imoto (2006). "Dengue tetravalent DNA vaccine inducing neutralizing antibody and anamnestic responses to four serotypes in mice." *Vaccine* 24(12): 2200-7.
- Konishi, Y., J. Stegmüller, T. Matsuda, S. Bonni et A. Bonni (2004). "Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain." *Science* 303(5660): 1026-30.
- Koponen, J. K., H. Kankkonen, J. Kannasto, T. Wirth, W. Hillen, H. Bujard et S. Ylä-Herttuala (2003). "Doxycycline-regulated lentiviral vector system with a novel reverse transactivator rtTA2S-M2 shows a tight control of gene expression in vitro and in vivo." *Gene Ther* 10(6): 459-66.
- Koppelhus, U. et P. E. Nielsen (2003). "Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA)." *Adv Drug Deliv Rev* 55(2): 267-80.
- Kordower, J. H., O. Isacson et D. F. Emerich (1999). "Cellular delivery of trophic factors for the treatment of Huntington's disease: is neuroprotection possible?" *Exp Neurol* 159(1): 4-20.
- Kotnik, T., D. Miklavcic et L. M. Mir (2001). "Cell membrane electroporation by symmetrical bipolar rectangular pulses. Part II. Reduced electrolytic contamination." *Bioelectrochemistry* 54(1): 91-5.
- Kotnik, T., G. Pucihar, M. Rebersek, D. Miklavcic et L. M. Mir (2003). "Role of pulse shape in cell membrane electroporation." *Biochim Biophys Acta* 1614(2): 193-200.
- Kreiss, P., M. Bettan, J. Crouzet et D. Scherman (1999). "Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer." *J Gene Med* 1(4): 245-50.
- Kren, B. T. et C. J. Steer (2002). "The application of DNA repair vectors to gene therapy." *Curr Opin Biotechnol* 13(5): 473-81.
- Krieg, A. M. (1999). "Direct immunologic activities of CpG DNA and implications for gene therapy." *J Gene Med* 1(1): 56-63.
- Krieg, A. M. (2001). "Now I know my CpGs." *Trends Microbiol* 9(6): 249-52.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky et D. M. Klinman (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* 374(6522): 546-9.
- Krolenko, S. A., W. B. Amos, S. C. Brown, M. V. Tarunina et J. A. Lucy (1998). "Accessibility of T-tubule vacuoles to extracellular dextran and DNA: mechanism and potential application of vacuolation." *J Muscle Res Cell Motil* 19(6): 603-11.
- Krotz, F., H. Y. Sohn, T. Gloe, C. Plank et U. Pohl (2003). "Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells." *J Vasc Res* 40(5): 425-34.
- Krull, C. E. (2004). "A primer on using in ovo electroporation to analyze gene function." *Dev Dyn* 229(3): 433-9.
- Kuemmerle, N. B., P. S. Lin, R. J. Krieg, Jr., K. C. Lin, K. P. Ward et J. C. Chan (2000). "Gene expression after intrarenal injection of plasmid DNA in the rat." *Pediatr Nephrol* 14(2): 152-7.
- Kukowska-Latallo, J. F., A. U. Bielinska, J. Johnson, R. Spindler, D. A. Tomalia et J. R. Baker, Jr. (1996). "Efficient transfer of genetic material into mammalian cells using Starburst polyamidoamine dendrimers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(10): 4897-902.

- Kunaparaju, R., M. Liao et N. A. Sunstrom (2005). "Epi-CHO, an episomal expression system for recombinant protein production in CHO cells." *Biotechnol Bioeng* 91(6): 670-7.
- Labat-Moleur, F., A. M. Steffan, C. Brisson, H. Perron, O. Feugeas, P. Furstenberger, F. Oberling, E. Brambilla et J. P. Behr (1996). "An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines." *Gene Ther* 3(11): 1010-7.
- Lamartina, S., G. Roscilli, C. D. Rinaudo, E. Sporeno, L. Silvi, W. Hillen, H. Bujard, R. Cortese, G. Ciliberto et C. Toniatti (2002). "Stringent control of gene expression in vivo by using novel doxycycline-dependent trans-activators." *Hum Gene Ther* 13(2): 199-210.
- Lamartina, S., L. Silvi, G. Roscilli, D. Casimiro, A. J. Simon, M. E. Davies, J. W. Shiver, C. D. Rinaudo, I. Zampaglione, E. Fattori, S. Colloca, O. Gonzalez Paz, R. Laufer, H. Bujard, R. Cortese, G. Ciliberto et C. Toniatti (2003). "Construction of an rtTA2(s)-m2/tts(kid)-based transcription regulatory switch that displays no basal activity, good inducibility, and high responsiveness to doxycycline in mice and non-human primates." *Mol Ther* 7(2): 271-80.
- Larregina, A. T., S. C. Watkins, G. Erdos, L. A. Spencer, W. J. Storkus, D. Beer Stolz et L. D. Falo, Jr. (2001). "Direct transfection and activation of human cutaneous dendritic cells." *Gene Ther* 8(8): 608-17.
- Latchman, D. S. (1994). "Herpes simplex virus vectors for gene therapy." *Mol Biotechnol* 2(2): 179-95.
- Lechardeur, D., K. J. Sohn, M. Haardt, P. B. Joshi, M. Monck, R. W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich et G. L. Lukacs (1999). "Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer." *Gene Ther* 6(4): 482-97.
- Lee, A. H., Y. S. Suh, J. H. Sung, S. H. Yang et Y. C. Sung (1997). "Comparison of various expression plasmids for the induction of immune response by DNA immunization." *Mol Cells* 7(4): 495-501.
- Lee, M. J., S. S. Cho, H. S. Jang, Y. S. Lim, J. R. You, J. Park, H. Suh, J. A. Kim, J. S. Park et D. K. Kim (2002). "Optimal salt concentration of vehicle for plasmid DNA enhances gene transfer mediated by electroporation." *Exp Mol Med* 34(4): 265-72.
- Lee, R. C., L. P. River, F. S. Pan, L. Ji et R. L. Wollmann (1992). "Surfactant-induced sealing of electroporabilized skeletal muscle membranes in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10): 4524-8.
- Lefesvre, P., J. Attema et D. van Bekkum (2002). "A comparison of efficacy and toxicity between electroporation and adenoviral gene transfer." *BMC Mol Biol* 3: 12.
- Levy, M. Y., L. G. Barron, K. B. Meyer et F. C. Szoka, Jr. (1996). "Characterization of plasmid DNA transfer into mouse skeletal muscle: evaluation of uptake mechanism, expression and secretion of gene products into blood." *Gene Ther* 3(3): 201-11.
- Li, H., R. J. Bartlett, R. Pastori, N. S. Kenyon, C. Ricordi et R. Alejandro (1997). "Gene expression via direct injection of plasmid vector into the thymus." *Transplant Proc* 29(4): 2220.
- Li, L. H., A. Sen, S. P. Murphy, G. P. Jahreis, H. Fuji et S. W. Hui (1999). "Apoptosis induced by DNA uptake limits transfection efficiency." *Exp Cell Res* 253(2): 541-50.
- Li, S. et Z. Ma (2001). "Nonviral gene therapy." *Curr Gene Ther* 1(2): 201-26.
- Li, S., F. C. MacLaughlin, J. G. Fewell, M. Gondo, J. Wang, F. Nicol, D. A. Dean et L. C. Smith (2001). "Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid." *Gene Ther* 8(6): 494-7.
- Li, S., F. C. MacLaughlin, J. G. Fewell, Y. Li, V. Mehta, M. F. French, J. L. Nordstrom, M. Coleman, N. S. Belagali, R. J. Schwartz et L. C. Smith (1999). "Increased level and duration of expression in muscle by co-expression of a transactivator using plasmid systems." *Gene Ther* 6(12): 2005-11.
- Li, S., X. Xia, X. Zhang et J. Suen (2002). "Regression of tumors by IFN-alpha electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array." *Gene Ther* 9(6): 390-7.
- Liberles, S. D., S. T. Diver, D. J. Austin et S. L. Schreiber (1997). "Inducible gene expression and protein translocation using nontoxic ligands identified by a mammalian three-hybrid screen." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(15): 7825-30.
- Lin, C. R., M. H. Tai, J. T. Cheng, A. K. Chou, J. J. Wang, P. H. Tan, M. Marsala et L. C. Yang (2002). "Electroporation for direct spinal gene transfer in rats." *Neurosci Lett* 317(1): 1-4.
- Linden, R. M. et S. L. Woo (1999). "AAVant-garde gene therapy." *Nat Med* 5(1): 21-2.
- Liu, F. et L. Huang (2001). "Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature." *J Gene Med* 3(6): 569-76.
- Liu, F. et L. Huang (2002). "Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA." *Gene Ther* 9(16): 1116-9.
- Liu, F. et L. Huang (2002). "A syringe electrode device for simultaneous injection of DNA and electrotransfer." *Mol Ther* 5(3): 323-8.
- Liu, F., M. Nishikawa, P. R. Clemens et L. Huang (2001). "Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd(mdx/mdx) mice through systemic administration of plasmid DNA." *Mol Ther* 4(1): 45-51.
- Liu, F., Y. Song et D. Liu (1999). "Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA." *Gene Ther* 6(7): 1258-66.
- Liu, J., I. Jeppesen, K. Nielsen et T. G. Jensen (2006). "phic31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts." *Gene Ther*.

- Lohr, F., D. Y. Lo, D. A. Zaharoff, K. Hu, X. Zhang, Y. Li, Y. Zhao, M. W. Dewhirst, F. Yuan et C. Y. Li (2001). "Effective tumor therapy with plasmid-encoded cytokines combined with in vivo electroporation." *Cancer Res* 61(8): 3281-4.
- Long, Y. C., S. Jaichandran, L. P. Ho, S. L. Tien, S. Y. Tan et O. L. Kon (2005). "FVIII gene delivery by muscle electroporation corrects murine hemophilia A." *J Gene Med* 7(4): 494-505.
- Lopez, A., M. P. Rols et J. Teissie (1988). "31P NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporated Chinese hamster ovary cells." *Biochemistry* 27(4): 1222-8.
- Loste, F., N. Eynard et J. Teissie (1998). "Direct monitoring of the field strength during electroporation." *Bioelectrochem Bioenerg* 47(1): 119-27.
- Lu, Q. L., G. Bou-Gharios et T. A. Partridge (2003). "Non-viral gene delivery in skeletal muscle: a protein factory." *Gene Ther* 10(2): 131-42.
- Lu, Q. L., H. D. Liang, T. Partridge et M. J. Blomley (2003). "Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage." *Gene Ther* 10(5): 396-405.
- Lucas, M. L., L. Heller, D. Coppola et R. Heller (2002). "IL-12 plasmid delivery by in vivo electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma." *Mol Ther* 5(6): 668-75.
- Lucas, M. L. et R. Heller (2001). "Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle." *Mol Ther* 3(1): 47-53.
- Ludtke, J. J., G. Zhang, M. G. Sebestyen et J. A. Wolff (1999). "A nuclear localization signal can enhance both the nuclear transport and expression of 1 kb DNA." *J Cell Sci* 112 (Pt 12): 2033-41.
- Lukacs, G. L., P. Haggie, O. Seksek, D. Lechardeur, N. Freedman et A. S. Verkman (2000). "Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus." *J Biol Chem* 275(3): 1625-9.
- Lundstrom, K. (2003). "Latest development in viral vectors for gene therapy." *Trends Biotechnol* 21(3): 117-22.
- Luo, D. et W. M. Saltzman (2000). "Synthetic DNA delivery systems." *Nat Biotechnol* 18(1): 33-7.
- Maccarrone, M., M. R. Bladergroen, N. Rosato et A. F. Finazzi Agro (1995). "Role of lipid peroxidation in electroporation-induced cell permeability." *Biochem Biophys Res Commun* 209(2): 417-25.
- Mahato, R. I. (1999). "Non-viral peptide-based approaches to gene delivery." *J Drug Target* 7(4): 249-68.
- Mahato, R. I., Y. Takakura et M. Hashida (1997). "Nonviral vectors for in vivo gene delivery: physicochemical and pharmacokinetic considerations." *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 14(2): 133-72.
- Mallat, Z., A. Corbaz, A. Scoazec, P. Graber, S. Alouani, B. Esposito, Y. Humbert, Y. Chvatchko et A. Tedgui (2001). "Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability." *Circ Res* 89(7): E41-5.
- Malone, R. W., M. A. Hickman, K. Lehmann-Bruinsma, T. R. Sih, R. Walzem, D. M. Carlson et J. S. Powell (1994). "Dexamethasone enhancement of gene expression after direct hepatic DNA injection." *J Biol Chem* 269(47): 29903-7.
- Manthorpe, M., F. Cornefert-Jensen, J. Hartikka, J. Felgner, A. Rundell, M. Margalith et V. Dwarki (1993). "Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice." *Hum Gene Ther* 4(4): 419-31.
- Martel-Renoir, D., V. Trochon-Joseph, A. Galaup, C. Bouquet, F. Griscelli, P. Opolon, D. Opolon, E. Connault, L. Mir et M. Perricaudet (2003). "Coelectrotransfer to skeletal muscle of three plasmids coding for antiangiogenic factors and regulatory factors of the tetracycline-inducible system: tightly regulated expression, inhibition of transplanted tumor growth, and antimetastatic effect." *Mol Ther* 8(3): 425-33.
- Marth, J. D. (1996). "Recent advances in gene mutagenesis by site-directed recombination." *J Clin Invest* 97(9): 1999-2002.
- Martin, J. B., J. L. Young, J. N. Benoit et D. A. Dean (2000). "Gene transfer to intact mesenteric arteries by electroporation." *J Vasc Res* 37(5): 372-80.
- Martinenghi, S., G. Cusella De Angelis, S. Biressi, S. Amadio, F. Bifari, M. G. Roncarolo, C. Bordignon et L. Falqui (2002). "Human insulin production and amelioration of diabetes in mice by electrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to the skeletal muscle." *Gene Ther* 9(21): 1429-37.
- Maruyama, H., K. Ataka, F. Gejyo, N. Higuchi, Y. Ito, H. Hirahara, I. Imazeki, M. Hirata, F. Ichikawa, T. Neichi, H. Kikuchi, M. Sugawa et J. Miyazaki (2001). "Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats." *Gene Ther* 8(6): 461-8.
- Maruyama, H., N. Higuchi, Y. Nishikawa, S. Kameda, N. Iino, J. J. Kazama, N. Takahashi, M. Sugawa, H. Hanawa, N. Tada, J. Miyazaki et F. Gejyo (2002). "High-level expression of naked DNA delivered to rat liver via tail vein injection." *J Gene Med* 4(3): 333-41.
- Maruyama, H., M. Sugawa, Y. Moriguchi, I. Imazeki, Y. Ishikawa, K. Ataka, S. Hasegawa, Y. Ito, N. Higuchi, J. J. Kazama, F. Gejyo et J. I. Miyazaki (2000). "Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using in vivo electroporation." *Hum Gene Ther* 11(3): 429-37.
- Mathiesen, I. (1999). "Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo." *Gene Ther* 6(4): 508-14.
- Matsuda, T. et C. L. Cepko (2004). "Electroporation and RNA interference in the rodent retina in vivo and in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(1): 16-22.

- Matsumoto, T., K. Komori, T. Shoji, S. Kuma, M. Kume, T. Yamaoka, E. Mori, T. Furuyama, Y. Yonemitsu et K. Sugimachi (2001). "Successful and optimized in vivo gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse." *Gene Ther* 8(15): 1174-9.
- Mayo, K. E., R. Warren et R. D. Palmiter (1982). "The mouse metallothionein-I gene is transcriptionally regulated by cadmium following transfection into human or mouse cells." *Cell* 29(1): 99-108.
- McGee Sanftner, L. H., K. G. Rendahl, D. Quiroz, M. Coyne, M. Ladner, W. C. Manning et J. G. Flannery (2001). "Recombinant AAV-mediated delivery of a tet-inducible reporter gene to the rat retina." *Mol Ther* 3(5 Pt 1): 688-96.
- McMahon, J. M., E. Signori, K. E. Wells, V. M. Fazio et D. J. Wells (2001). "Optimisation of electrotransfer of plasmid into skeletal muscle by pretreatment with hyaluronidase -- increased expression with reduced muscle damage." *Gene Ther* 8(16): 1264-70.
- McMahon, J. M., K. E. Wells, J. E. Bamfo, M. A. Cartwright et D. J. Wells (1998). "Inflammatory responses following direct injection of plasmid DNA into skeletal muscle." *Gene Ther* 5(9): 1283-90.
- Meaking, W. S., J. Edgerton, C. W. Wharton et R. A. Meldrum (1995). "Electroporation-induced damage in mammalian cell DNA." *Biochim Biophys Acta* 1264(3): 357-62.
- Mehier-Humbert, S. et R. H. Guy (2005). "Physical methods for gene transfer: improving the kinetics of gene delivery into cells." *Adv Drug Deliv Rev* 57(5): 733-53.
- Mennuni, C., F. Calvaruso, I. Zampaglione, G. Rizzuto, D. Rinaudo, E. Dammassa, G. Ciliberto, E. Fattori et N. La Monica (2002). "Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle." *Hum Gene Ther* 13(3): 355-65.
- Mesika, A., V. Kiss, V. Brumfeld, G. Ghosh et Z. Reich (2005). "Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein." *Hum Gene Ther* 16(2): 200-8.
- Messina, J. P., G. S. Gilkeson et D. S. Pisetsky (1991). "Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA." *J Immunol* 147(6): 1759-64.
- Meyer, O., D. Kirpotin, K. Hong, B. Sternberg, J. W. Park, M. C. Woodle et D. Papahadjopoulos (1998). "Cationic liposomes coated with polyethylene glycol as carriers for oligonucleotides." *J Biol Chem* 273(25): 15621-7.
- Miklavcic, D., G. Pucihar, M. Pavlovic, S. Ribaric, M. Mali, A. Macek-Lebar, M. Petkovsek, J. Nastran, S. Kranjc, M. Cemazar et G. Sersa (2005). "The effect of high frequency electric pulses on muscle contractions and antitumor efficiency in vivo for a potential use in clinical electrochemotherapy." *Bioelectrochemistry* 65(2): 121-8.
- Miklavcic, D., D. Semrov, H. Mekid et L. M. Mir (2000). "A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy." *Biochim Biophys Acta* 1523(1): 73-83.
- Miller, D. L., S. V. Pislaru et J. E. Greenleaf (2002). "Sonoporation: mechanical DNA delivery by ultrasonic cavitation." *Somat Cell Mol Genet* 27(1-6): 115-34.
- Miller, D. L. et J. Song (2003). "Tumor growth reduction and DNA transfer by cavitation-enhanced high-intensity focused ultrasound in vivo." *Ultrasound Med Biol* 29(6): 887-93.
- Miller, L., J. Leor et B. Rubinsky (2005). "Cancer cells ablation with irreversible electroporation." *Technol Cancer Res Treat* 4(6): 699-705.
- Min, K. A., S. T. Oh, K. H. Yoon, C. K. Kim et S. K. Lee (2003). "Prolonged gene expression in primary porcine pancreatic cells using an Epstein-Barr virus-based episomal vector." *Biochem Biophys Res Commun* 305(1): 108-15.
- Mir, L. M., H. Banoun et C. Paoletti (1988). "Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporation: direct access to the cytosol." *Exp Cell Res* 175(1): 15-25.
- Mir, L. M., M. Belehradek, C. Domenge, S. Orlowski, B. Poddevin, J. Belehradek, Jr., G. Schwaab, B. Lubinski et C. Paoletti (1991). "[Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]." *C R Acad Sci III* 313(13): 613-8.
- Mir, L. M., M. F. Bureau, J. Gehl, R. Rangara, D. Rouy, J. M. Caillaud, P. Delaere, D. Branellec, B. Schwartz et D. Scherman (1999). "High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(8): 4262-7.
- Mir, L. M., M. F. Bureau, R. Rangara, B. Schwartz et D. Scherman (1998). "Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle." *C R Acad Sci III* 321(11): 893-9.
- Mir, L. M., L. F. Glass, G. Sersa, J. Teissie, C. Domenge, D. Miklavcic, M. J. Jaroszeski, S. Orlowski, D. S. Reintgen, Z. Rudolf, M. Belehradek, R. Gilbert, M. P. Rols, J. Belehradek, Jr., J. M. Bachaud, R. DeConti, B. Stabuc, M. Cemazar, P. Coninx et R. Heller (1998). "Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy." *Br J Cancer* 77(12): 2336-42.
- Mir, L. M., P. H. Moller, F. Andre et J. Gehl (2005). "Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues." *Adv Genet* 54: 83-114.
- Mir, L. M. et S. Orlowski (1999). "Mechanisms of electrochemotherapy." *Adv Drug Deliv Rev* 35(1): 107-118.

- Mir, L. M. et S. Orlowski (2000). "The basis of electrochemotherapy." *In* Jaroszeski, M. J., Heller, R., Gilbert, R., editors. Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery: electrically mediated delivery of molecules to cells. Totowa, New Jersey: Humana press: 99-117.
- Mislick, K. A. et J. D. Baldeschwieler (1996). "Evidence for the role of proteoglycans in cation-mediated gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A 93(22): 12349-54.
- Mitragotri, S. (2006). "Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors." Nat Rev Drug Discov 5(7): 543-8.
- Miyagishi, M., M. Hayashi et K. Taira (2003). "Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells." Antisense Nucleic Acid Drug Dev 13(1): 1-7.
- Miyatake, S., R. L. Martuza et S. D. Rabkin (1997). "Defective herpes simplex virus vectors expressing thymidine kinase for the treatment of malignant glioma." Cancer Gene Ther 4(4): 222-8.
- Mizuguchi, H., Z. L. Xu, F. Sakurai, T. Mayumi et T. Hayakawa (2003). "Tight positive regulation of transgene expression by a single adenovirus vector containing the rtTA and tTS expression cassettes in separate genome regions." Hum Gene Ther 14(13): 1265-77.
- Molnar, M. J., R. Gilbert, Y. Lu, A. B. Liu, A. Guo, N. Larochelle, K. Orlopp, H. Lochmuller, B. J. Petrof, J. Nalbantoglu et G. Karpatis (2004). "Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles." Mol Ther 10(3): 447-55.
- Montgomery, D. L., J. W. Shiver, K. R. Leander, H. C. Perry, A. Friedman, D. Martinez, J. B. Ulmer, J. J. Donnelly et M. A. Liu (1993). "Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors." DNA Cell Biol 12(9): 777-83.
- Morishita, R., G. H. Gibbons, M. Horiuchi, K. E. Ellison, M. Nakama, L. Zhang, Y. Kaneda, T. Ogihara et V. J. Dzau (1995). "A gene therapy strategy using a transcription factor decoy of the E2F binding site inhibits smooth muscle proliferation in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A 92(13): 5855-9.
- Mouneimne, Y., P. F. Tosi, R. Barhoumi et C. Nicolau (1990). "Electroinsertion of full length recombinant CD4 into red blood cell membrane." Biochim Biophys Acta 1027(1): 53-8.
- Munkonge, F. M., D. A. Dean, E. Hillery, U. Griesenbach et E. W. Alton (2003). "Emerging significance of plasmid DNA nuclear import in gene therapy." Adv Drug Deliv Rev 55(6): 749-60.
- Murakami, T., T. Nishi, E. Kimura, T. Goto, Y. Maeda, Y. Ushio, M. Uchino et Y. Sunada (2003). "Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation." Muscle Nerve 27(2): 237-41.
- Muramatsu, T., O. Shibata, S. Ryoki, Y. Ohmori et J. Okumura (1997). "Foreign gene expression in the mouse testis by localized in vivo gene transfer." Biochem Biophys Res Commun 233(1): 45-9.
- Naffakh, N., A. Henri, J. L. Villeval, P. Rouyer-Fessard, P. Moullier, N. Blumenfeld, O. Danos, W. Vainchenker, J. M. Heard et Y. Beuzard (1995). "Sustained delivery of erythropoietin in mice by genetically modified skin fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A 92(8): 3194-8.
- Nakamura, H., Y. Isaka, M. Tsujie, Y. Akagi, T. Sudo, N. Ohno, E. Imai et M. Hori (2001). "Electroporation-mediated PDGF receptor-IgG chimera gene transfer ameliorates experimental glomerulonephritis." Kidney Int 59(6): 2134-45.
- Napoli, C., C. Lemieux et R. Jorgensen (1990). "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans." Plant Cell 2(4): 279-289.
- Neumann, E. et K. Rosenheck (1972). "Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes." J Membr Biol 10(3): 279-90.
- Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang et P. H. Hofschneider (1982). "Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields." Embo J 1(7): 841-5.
- Neves, C., V. Escriou, G. Byk, D. Scherman et P. Wils (1999). "Intracellular fate and nuclear targeting of plasmid DNA." Cell Biol Toxicol 15(3): 193-202.
- Newman, C. M., A. Lawrie, A. F. Briskin et D. C. Cumberland (2001). "Ultrasound gene therapy: on the road from concept to reality." Echocardiography 18(4): 339-47.
- Nicol, F., M. Wong, F. C. MacLaughlin, J. Perrard, E. Wilson, J. L. Nordstrom et L. C. Smith (2002). "Poly-L-glutamate, an anionic polymer, enhances transgene expression for plasmids delivered by intramuscular injection with in vivo electroporation." Gene Ther 9(20): 1351-8.
- Niidade, T. et L. Huang (2002). "Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors." Gene Ther 9(24): 1647-52.
- Nishi, T., K. Yoshizato, S. Yamashiro, H. Takeshima, K. Sato, K. Hamada, I. Kitamura, T. Yoshimura, H. Saya, J. Kuratsu et Y. Ushio (1996). "High-efficiency in vivo gene transfer using intraarterial plasmid DNA injection following in vivo electroporation." Cancer Res 56(5): 1050-5.
- Nishikawa, M. et M. Hashida (2002). "Nonviral approaches satisfying various requirements for effective in vivo gene therapy." Biol Pharm Bull 25(3): 275-83.
- No, D., T. P. Yao et R. M. Evans (1996). "Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A 93(8): 3346-51.

- Noel, D., M. Pelegrin, S. Kramer, C. Jacquet, N. Skander et M. Piechaczyk (2002). "High in vivo production of a model monoclonal antibody on adenoviral gene transfer." Hum Gene Ther 13(12): 1483-93.
- Nuccitelli, R., U. Pliquett, X. Chen, W. Ford, R. James Swanson, S. J. Beebe, J. F. Kolb et K. H. Schoenbach (2006). "Nanosecond pulsed electric fields cause melanomas to self-destruct." Biochem Biophys Res Commun 343(2): 351-60.
- Ogura, M., S. Sato, K. Nakanishi, M. Uenoyama, T. Kiyozumi, D. Saitoh, T. Ikeda, H. Ashida et M. Obara (2004). "In vivo targeted gene transfer in skin by the use of laser-induced stress waves." Lasers Surg Med 34(3): 242-8.
- Ohashi, S., T. Kubo, T. Kishida, T. Ikeda, K. Takahashi, Y. Arai, R. Terauchi, H. Asada, J. Imanishi et O. Mazda (2002). "Successful genetic transduction in vivo into synovium by means of electroporation." Biochem Biophys Res Commun 293(5): 1530-5.
- Orida, N. et J. D. Feldman (1982). "Directional protrusive pseudopodial activity and motility in macrophages induced by extracellular electric fields." Cell Motil 2(3): 243-55.
- Orlowski, S., J. Belehradek, Jr., C. Paoletti et L. M. Mir (1988). "Transient electroporabilization of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs." Biochem Pharmacol 37(24): 4727-33.
- Orlowski, S. et L. M. Mir (1993). "Cell electroporabilization: a new tool for biochemical and pharmacological studies." Biochim Biophys Acta 1154(1): 51-63.
- Oshima, Y., T. Sakamoto, T. Hisatomi, C. Tsutsumi, Y. Sassa, T. Ishibashi et H. Inomata (2002). "Targeted gene transfer to corneal stroma in vivo by electric pulses." Exp Eye Res 74(2): 191-8.
- Parker, A. L., C. Newman, S. Briggs, L. Seymour et P. J. Sheridan (2003). "Nonviral gene delivery: techniques and implications for molecular medicine." Expert Rev Mol Med 2003: 1-15.
- Parrish, E. P., C. Cifuentes-Diaz, Z. L. Li, P. Vicart, D. Paulin, P. A. Dreyfus, M. Peschanski, A. J. Harris et L. Garcia (1996). "Targeting widespread sites of damage in dystrophic muscle: engrafted macrophages as potential shuttles." Gene Ther 3(1): 13-20.
- Paturneau-Jouas, M., E. Parzy, G. Vidal, P. G. Carlier, C. Wary, J. T. Vilquin, E. de Kerviler, K. Schwartz et A. Leroy-Willig (2003). "Electrotransfer at MR imaging: tool for optimization of gene transfer protocols--feasibility study in mice." Radiology 228(3): 768-75.
- Pavselj, N. et V. Preat (2005). "DNA electrotransfer into the skin using a combination of one high- and one low-voltage pulse." J Control Release 106(3): 407-15.
- Payen, E., M. Bettan, P. Rouyer-Fessard, Y. Beuzard et D. Scherman (2001). "Improvement of mouse beta-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA." Exp Hematol 29(3): 295-300.
- Pazmany, T., S. P. Murphy, S. O. Gollnick, S. P. Brooks et T. B. Tomasi (1995). "Activation of multiple transcription factors and fos and jun gene family expression in cells exposed to a single electric pulse." Exp Cell Res 221(1): 103-10.
- Peachman, K. K., M. Rao et C. R. Alving (2003). "Immunization with DNA through the skin." Methods 31(3): 232-42.
- Pekarik, V., D. Bourikas, N. Miglino, P. Joset, S. Preiswerk et E. T. Stoeckli (2003). "Screening for gene function in chicken embryo using RNAi and electroporation." Nat Biotechnol 21(1): 93-6.
- Perez, N., P. Bigey, D. Scherman, O. Danos, M. Piechaczyk et M. Pelegrin (2004). "Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by in vivo muscle electroporation." Genet Vaccines Ther 2(1): 2.
- Perez, N., P. Plence, V. Millet, D. Greuet, C. Minot, D. Noel, O. Danos, C. Jorgensen et F. Apparailly (2002). "Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after in vivo intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis." Hum Gene Ther 13(18): 2161-72.
- Piechaczek, C., C. Fetzer, A. Baiker, J. Bode et H. J. Lipps (1999). "A vector based on the SV40 origin of replication and chromosomal S/MARs replicates episomally in CHO cells." Nucleic Acids Res 27(2): 426-8.
- Pilwat, G., H. P. Richter et U. Zimmermann (1981). "Giant culture cells by electric field-induced fusion." FEBS Lett 133(1): 169-74.
- Plank, C., M. Anton, C. Rudolph, J. Rosenecker et F. Krotz (2003). "Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force." Expert Opin Biol Ther 3(5): 745-58.
- Plank, C., K. Mechtler, F. C. Szoka, Jr. et E. Wagner (1996). "Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery." Hum Gene Ther 7(12): 1437-46.
- Pliquett, U., R. Langer et J. C. Weaver (1995). "Changes in the passive electrical properties of human stratum corneum due to electroporation." Biochim Biophys Acta 1239(2): 111-21.
- Pollard, H., J. S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J. P. Behr et D. Escande (1998). "Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells." J Biol Chem 273(13): 7507-11.
- Pollard, H., G. Toumaniantz, J. L. Amos, H. Avet-Loiseau, G. Guihard, J. P. Behr et D. Escande (2001). "Ca²⁺-sensitive cytosolic nucleases prevent efficient delivery to the nucleus of injected plasmids." J Gene Med 3(2): 153-64.
- Pollock, R. et T. Clackson (2002). "Dimerizer-regulated gene expression." Curr Opin Biotechnol 13(5): 459-67.

- Poo, M. et K. R. Robinson (1977). "Electrophoresis of concanavalin A receptors along embryonic muscle cell membrane." *Nature* 265(5595): 602-5.
- Potter, H., L. Weir et P. Leder (1984). "Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(22): 7161-5.
- Prud'homme, G. J., Y. Chang et X. Li (2002). "Immunoinhibitory DNA vaccine protects against autoimmune diabetes through cDNA encoding a selective CTLA-4 (CD152) ligand." *Hum Gene Ther* 13(3): 395-406.
- Puc, M., S. Corovic, K. Flisar, M. Petkovsek, J. Nastran et D. Miklavcic (2004). "Techniques of signal generation required for electroporation; Survey of electroporation devices." *Bioelectrochemistry* 64(2): 113-24.
- Qin, L., Y. Ding, D. R. Pahud, E. Chang, M. J. Imperiale et J. S. Bromberg (1997). "Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression." *Hum Gene Ther* 8(17): 2019-29.
- Quinn, A., W. Jiang, M. Velaz-Faircloth, A. J. Cobb, S. C. Henry et R. Frothingham (2002). "In vivo protein expression and immune responses generated by DNA vaccines expressing mycobacterial antigens fused with a reporter protein." *Vaccine* 20(25-26): 3187-92.
- Raffy, S. et J. Teissie (1995). "Insertion of glycophorin A, a transmembraneous protein, in lipid bilayers can be mediated by electroporation." *Eur J Biochem* 230(2): 722-32.
- Ragot, T., N. Vincent, P. Chafey, E. Vigne, H. Gilgenkrantz, D. Couton, J. Cartaud, P. Briand, J. C. Kaplan, M. Perricaudet et al. (1993). "Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice." *Nature* 361(6413): 647-50.
- Rao, M., J. H. Baraban, F. Rajaii et S. Sockanathan (2004). "In vivo comparative study of RNAi methodologies by in ovo electroporation in the chick embryo." *Dev Dyn* 231(3): 592-600.
- Ratcliffe, P. J., J. F. O'Rourke, P. H. Maxwell et C. W. Pugh (1998). "Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression." *J Exp Biol* 201(Pt 8): 1153-62.
- Ravichandran, L. V., N. M. Dean et E. G. Marcusson (2004). "Use of antisense oligonucleotides in functional genomics and target validation." *Oligonucleotides* 14(1): 49-64.
- Rebersek, M., T. Cufer, M. Cemazar, S. Kranjc et G. Sersa (2004). "Electrochemotherapy with cisplatin of cutaneous tumor lesions in breast cancer." *Anticancer Drugs* 15(6): 593-7.
- Riquet, F. B., M. Rodriguez, N. Guigal, S. Dromaint, I. Naime, J. A. Boutin et J. P. Galizzi (2003). "In vivo characterisation of the human UCP3 gene minimal promoter in mice tibialis anterior muscles." *Biochem Biophys Res Commun* 311(3): 583-91.
- Rivera, V. M., X. Ye, N. L. Courage, J. Sachar, F. Cerasoli, Jr., J. M. Wilson et M. Gilman (1999). "Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(15): 8657-62.
- Rizzuto, G., M. Cappelletti, D. Maione, R. Savino, D. Lazzaro, P. Costa, I. Mathiesen, R. Cortese, G. Ciliberto, R. Laufer, N. La Monica et E. Fattori (1999). "Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(11): 6417-22.
- Rizzuto, G., M. Cappelletti, C. Mennuni, M. Wiznerowicz, A. DeMartis, D. Maione, G. Ciliberto, N. La Monica et E. Fattori (2000). "Gene electrotransfer results in a high-level transduction of rat skeletal muscle and corrects anemia of renal failure." *Hum Gene Ther* 11(13): 1891-900.
- Rols, M. P., J. M. Bachaud, P. Giraud, C. Chevreau, H. Roche et J. Teissie (2000). "Electrochemotherapy of cutaneous metastases in malignant melanoma." *Melanoma Res* 10(5): 468-74.
- Rols, M. P., D. Coulet et J. Teissie (1992). "Highly efficient transfection of mammalian cells by electric field pulses. Application to large volumes of cell culture by using a flow system." *Eur J Biochem* 206(1): 115-21.
- Rols, M. P., C. Delteil, M. Golzio, P. Dumond, S. Cros et J. Teissie (1998). "In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma." *Nat Biotechnol* 16(2): 168-71.
- Rols, M. P., C. Delteil, M. Golzio et J. Teissie (1998). "Control by ATP and ADP of voltage-induced mammalian-cell-membrane permeabilization, gene transfer and resulting expression." *Eur J Biochem* 254(2): 382-8.
- Rols, M. P., C. Delteil, G. Serin et J. Teissie (1994). "Temperature effects on electrotransfection of mammalian cells." *Nucleic Acids Res* 22(3): 540.
- Rols, M. P., M. Golzio, C. Delteil et J. Teissie (2000). "In vitro delivery of drugs and others molecules to cells." In Jaroszeski, M. J., Heller, R., Gilbert, R., editors. *Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery: electrically mediated delivery of molecules to cells*. Totowa, New Jersey: Humana press: 83-98.
- Rols, M. P., Y. Tamzali et J. Teissie (2002). "Electrochemotherapy of horses. A preliminary clinical report." *Bioelectrochemistry* 55(1-2): 101-5.
- Rols, M. P. et J. Teissie (1990). "Electroporation of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon." *Biophys J* 58(5): 1089-98.

- Rols, M. P. et J. Teissie (1990). "Modulation of electrically induced permeabilization and fusion of Chinese hamster ovary cells by osmotic pressure." *Biochemistry* 29(19): 4561-7.
- Rols, M. P. et J. Teissie (1992). "Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporation." *Biochim Biophys Acta* 1111(1): 45-50.
- Rols, M. P. et J. Teissie (1998). "Electroporation of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration." *Biophys J* 75(3): 1415-23.
- Rols, M. P. et J. Teissie (1998). "Flow cytometry quantification of electroporation." *Methods Mol Biol* 91: 141-7.
- Ronshaugen, M., F. Biemar, J. Piel, M. Levine et E. C. Lai (2005). "The Drosophila microRNA iab-4 causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings." *Genes Dev* 19(24): 2947-52.
- Ross, G. F., M. D. Bruno, M. Uyeda, K. Suzuki, K. Nagao, J. A. Whitsett et T. R. Korfhagen (1998). "Enhanced reporter gene expression in cells transfected in the presence of DMI-2, an acid nuclease inhibitor." *Gene Ther* 5(9): 1244-50.
- Roth, D. A., N. E. Tawa, Jr., J. M. O'Brien, D. A. Treco et R. F. Selden (2001). "Nonviral transfer of the gene encoding coagulation factor VIII in patients with severe hemophilia A." *N Engl J Med* 344(23): 1735-42.
- Rothman, S., H. Tseng et I. Goldfine (2005). "Oral gene therapy: a novel method for the manufacture and delivery of protein drugs." *Diabetes Technol Ther* 7(3): 549-57.
- Rubenstrunk, A., A. Mahfoudi et D. Scherman (2004). "Delivery of electric pulses for DNA electrotransfer to mouse muscle does not induce the expression of stress related genes." *Cell Biol Toxicol* 20(1): 25-31.
- Rubenstrunk, A., C. Orsini, A. Mahfoudi et D. Scherman (2003). "Transcriptional activation of the metallothionein I gene by electric pulses in vivo: basis for the development of a new gene switch system." *J Gene Med* 5(9): 773-83.
- Ruponen, M., S. Yla-Herttuala et A. Urtti (1999). "Interactions of polymeric and liposomal gene delivery systems with extracellular glycosaminoglycans: physicochemical and transfection studies." *Biochim Biophys Acta* 1415(2): 331-41.
- Russell, D. W. et M. A. Kay (1999). "Adeno-associated virus vectors and hematology." *Blood* 94(3): 864-74.
- Sabri, N., B. Pelissier et J. Teissie (1998). "Ascorbate increases electrotransformation efficiency of intact maize cells." *Anal Biochem* 264(2): 284-6.
- Saidenberg-Kermanach, N., N. Bessis, V. Deleuze, C. Bloquel, M. Bureau, D. Scherman et M. C. Boissier (2003). "Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis." *J Gene Med* 5(2): 164-71.
- Saito, T. et N. Nakatsuji (2001). "Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using in vivo electroporation." *Dev Biol* 240(1): 237-46.
- Sakamoto, T., E. Miyazaki, Y. Aramaki, H. Arima, M. Takahashi, Y. Kato, M. Koga et S. Tsuchiya (2004). "Improvement of dermatitis by iontophoretically delivered antisense oligonucleotides for interleukin-10 in NC/Nga mice." *Gene Ther* 11(3): 317-24.
- Sale, A. J. et W. A. Hamilton (1968). "Effects of high electric fields on micro-organisms. 3. Lysis of erythrocytes and protoplasts." *Biochim Biophys Acta* 163(1): 37-43.
- Salucci, V., A. Scarito, L. Aurisicchio, S. Lamartina, G. Nicolaus, S. Giampaoli, O. Gonzalez-Paz, C. Toniatti, H. Bujard, W. Hillen, G. Ciliberto et F. Palombo (2002). "Tight control of gene expression by a helper-dependent adenovirus vector carrying the rtTA2(s)-M2 tetracycline transactivator and repressor system." *Gene Ther* 9(21): 1415-21.
- Samakoglu, S., E. Fattori, S. Lamartina, C. Toniatti, D. Stockholm, J. M. Heard et D. Bohl (2001). "betaMinor-globin messenger RNA accumulation in reticulocytes governs improved erythropoiesis in beta thalassemic mice after erythropoietin complementary DNA electrotransfer in muscles." *Blood* 97(8): 2213-20.
- Samarsky, D. A., G. Ferbeyre, E. Bertrand, R. H. Singer, R. Cedergren et M. J. Fournier (1999). "A small nucleolar RNA:ribozyme hybrid cleaves a nucleolar RNA target in vivo with near-perfect efficiency." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(12): 6609-14.
- Sandri, M., E. Bortoloso, A. Nori et P. Volpe (2003). "Electrotransfer in differentiated myotubes: a novel, efficient procedure for functional gene transfer." *Exp Cell Res* 286(1): 87-95.
- Sarukhan, A., C. Soudais, O. Danos et K. Jooss (2001). "Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors." *J Gene Med* 3(3): 260-70.
- Satkauskas, S., F. Andre, M. F. Bureau, D. Scherman, D. Miklavcic et L. M. Mir (2005). "Electrophoretic Component of Electric Pulses Determines the Efficacy of In Vivo DNA Electrotransfer." *Hum Gene Ther*.
- Satkauskas, S., M. F. Bureau, A. Mahfoudi et L. M. Mir (2001). "Slow accumulation of plasmid in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis." *Mol Ther* 4(4): 317-23.
- Satkauskas, S., M. F. Bureau, M. Puc, A. Mahfoudi, D. Scherman, D. Miklavcic et L. M. Mir (2002). "Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electrophoresis." *Mol Ther* 5(2): 133-40.

- Scherer, F., M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Kruger, B. Gansbacher et C. Plank (2002). "Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo." Gene Ther 9(2): 102-9.
- Scherman, D., M. Bessodes, B. Cameron, J. Herscovici, H. Hofland, B. Pitard, F. Soubrier, P. Wils et J. Crouzet (1998). "Application of lipids and plasmid design for gene delivery to mammalian cells." Curr Opin Biotechnol 9(5): 480-5.
- Schratzberger, P., J. G. Krainin, G. Schratzberger, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, R. F. Zuk, A. F. Briskin, D. W. Losordo et J. M. Isner (2002). "Transcutaneous ultrasound augments naked DNA transfection of skeletal muscle." Mol Ther 6(5): 576-83.
- Schwartz, B., C. Benoist, B. Abdallah, R. Rangara, A. Hassan, D. Scherman et B. A. Demeneix (1996). "Gene transfer by naked DNA into adult mouse brain." Gene Ther 3(5): 405-11.
- Schwister, K. et B. Deuticke (1985). "Formation and properties of aqueous leaks induced in human erythrocytes by electrical breakdown." Biochim Biophys Acta 816(2): 332-48.
- Selby, M., C. Goldbeck, T. Pertile, R. Walsh et J. Ulmer (2000). "Enhancement of DNA vaccine potency by electroporation in vivo." J Biotechnol 83(1-2): 147-52.
- Selden, R. F., M. J. Skoskiewicz, K. B. Howie, P. S. Russell et H. M. Goodman (1987). "Implantation of genetically engineered fibroblasts into mice: implications for gene therapy." Science 236(4802): 714-8.
- Selmaj, K., C. Kowal, A. Walczak, J. Nowicka et C. S. Raine (2000). "Naked DNA vaccination differentially modulates autoimmune responses in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol 111(1-2): 34-44.
- Serguera, C., D. Bohl, E. Rolland, P. Prevost et J. M. Heard (1999). "Control of erythropoietin secretion by doxycycline or mifepristone in mice bearing polymer-encapsulated engineered cells." Hum Gene Ther 10(3): 375-83.
- Serrano, A. L., M. Murgia, G. Pallafacchina, E. Calabria, P. Coniglio, T. Lomo et S. Schiaffino (2001). "Calcineurin controls nerve activity-dependent specification of slow skeletal muscle fibers but not muscle growth." Proc Natl Acad Sci U S A 98(23): 13108-13.
- Sersa, G., M. Cemazar et Z. Rudolf (2003). "Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients." Cancer Therapy 1: 133-42.
- Sersa, G., M. Cemazar, D. Semrov et D. Miklavcic (1996). "Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice." Bioelectrochem Bioenerg 39(1): 61-6.
- Sersa, G., M. Krzic, M. Sentjurc, T. Ivanusa, K. Beravs, V. Kotnik, A. Coer, H. M. Swartz et M. Cemazar (2002). "Reduced blood flow and oxygenation in SA-1 tumours after electrochemotherapy with cisplatin." Br J Cancer 87(9): 1047-54.
- Sheu, E., S. Rothman, M. German, X. Wang, M. Finer et B. M. McMahon (2003). "The Gene Pill and its therapeutic applications." Curr Opin Mol Ther 5(4): 420-7.
- Shi, N. et W. M. Pardridge (2000). "Noninvasive gene targeting to the brain." Proc Natl Acad Sci U S A 97(13): 7567-72.
- Shi, X. B., P. H. Gumerlock, J. T. Muenzer et R. W. deVere White (2001). "BCL2 antisense transcripts decrease intracellular Bcl2 expression and sensitize LNCaP prostate cancer cells to apoptosis-inducing agents." Cancer Biother Radiopharm 16(5): 421-9.
- Shibata, M. A., J. Morimoto et Y. Otsuki (2002). "Suppression of murine mammary carcinoma growth and metastasis by HSVtk/GCV gene therapy using in vivo electroporation." Cancer Gene Ther 9(1): 16-27.
- Siess, D. C., C. T. Vedder, L. S. Merckens, T. Tanaka, A. C. Freed, S. L. McCoy, M. C. Heinrich, M. E. Deffebach, R. M. Bennett et S. H. Hefeneider (2000). "A human gene coding for a membrane-associated nucleic acid-binding protein." J Biol Chem 275(43): 33655-62.
- Sikes, M. L., B. W. O'Malley, Jr., M. J. Finegold et F. D. Ledley (1994). "In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection." Hum Gene Ther 5(7): 837-44.
- Silverman, S. K. (2004). "Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry." Org Biomol Chem 2(19): 2701-6.
- Sioud, M. (2006). "Ribozymes and siRNAs: from structure to preclinical applications." Handb Exp Pharmacol (173): 223-42.
- Skordis, L. A., M. G. Dunckley, B. Yue, I. C. Eperon et F. Muntoni (2003). "Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A 100(7): 4114-9.
- Sowers, A. E. (1988). "Fusion events and nonfusion contents mixing events induced in erythrocyte ghosts by an electric pulse." Biophys J 54(4): 619-26.
- Sowers, A. E. (1993). "Membrane electrofusion: a paradigm for study of membrane fusion mechanisms." Methods Enzymol 220: 196-211.
- Sowers, A. E. et M. R. Lieber (1986). "Electropore diameters, lifetimes, numbers, and locations in individual erythrocyte ghosts." FEBS Lett 205(2): 179-84.
- Spray, D. C., R. D. Ginzberg, E. A. Morales, Z. Gatmaitan et I. M. Arias (1986). "Electrophysiological properties of gap junctions between dissociated pairs of rat hepatocytes." J Cell Biol 103(1): 135-44.
- St George, J. A. (2003). "Gene therapy progress and prospects: adenoviral vectors." Gene Ther 10(14): 1135-41.

- Stacey, K. J., M. J. Sweet et D. A. Hume (1996). "Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA." *J Immunol* 157(5): 2116-22.
- Stapulionis, R. (1999). "Electric pulse-induced precipitation of biological macromolecules in electroporation." *Bioelectrochem Bioenerg* 48(1): 249-54.
- Stenger, D. A. et S. W. Hui (1986). "Kinetics of ultrastructural changes during electrically induced fusion of human erythrocytes." *J Membr Biol* 93(1): 43-53.
- Sukharev, S. I., V. A. Klenchin, S. M. Serov, L. V. Chernomordik et A. Chizmadzhev Yu (1992). "Electroporation and electrophoretic DNA transfer into cells. The effect of DNA interaction with electropores." *Biophys J* 63(5): 1320-7.
- Sullenger, B. A. et E. Gilboa (2002). "Emerging clinical applications of RNA." *Nature* 418(6894): 252-8.
- Suzuki, T., B. C. Shin, K. Fujikura, T. Matsuzaki et K. Takata (1998). "Direct gene transfer into rat liver cells by in vivo electroporation." *FEBS Lett* 425(3): 436-40.
- Svahn, M. G., K. E. Lundin, R. Ge, E. Tornquist, E. O. Simonson, S. Oscarsson, M. Leijon, L. J. Branden et C. I. Smith (2004). "Adding functional entities to plasmids." *J Gene Med* 6 Suppl 1: S36-44.
- Takeshita, F., C. A. Leifer, I. Gursel, K. J. Ishii, S. Takeshita, M. Gursel et D. M. Klinman (2001). "Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells." *J Immunol* 167(7): 3555-8.
- Tamura, T., T. Nishi, T. Goto, H. Takeshima, S. B. Dev, Y. Ushio et T. Sakata (2001). "Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with in vivo electroporation is effective for colon and renal cancer." *Hum Gene Ther* 12(10): 1265-76.
- Tamura, T., T. Nishi, T. Goto, H. Takeshima, Y. Ushio et T. Sakata (2003). "Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth." *Anticancer Res* 23(2B): 1173-9.
- Tamura, T. et T. Sakata (2003). "Application of in vivo electroporation to cancer gene therapy." *Curr Gene Ther* 3(1): 59-64.
- Tan, Y., S. Li, B. R. Pitt et L. Huang (1999). "The inhibitory role of CpG immunostimulatory motifs in cationic lipid vector-mediated transgene expression in vivo." *Hum Gene Ther* 10(13): 2153-61.
- Tanaka, T., N. Ichimaru, S. Takahara, K. Yazawa, M. Hatori, K. Suzuki, Y. Isaka, T. Moriyama, E. Imai, H. Azuma, T. Nakamura, A. Okuyama et H. Yamanaka (2002). "In vivo gene transfer of hepatocyte growth factor to skeletal muscle prevents changes in rat kidneys after 5/6 nephrectomy." *Am J Transplant* 2(9): 828-36.
- Tang, D. C., M. DeVit et S. A. Johnston (1992). "Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response." *Nature* 356(6365): 152-4.
- Taniyama, Y., K. Tachibana, K. Hiraoka, M. Aoki, S. Yamamoto, K. Matsumoto, T. Nakamura, T. Ogihara, Y. Kaneda et R. Morishita (2002). "Development of safe and efficient novel nonviral gene transfer using ultrasound: enhancement of transfection efficiency of naked plasmid DNA in skeletal muscle." *Gene Ther* 9(6): 372-80.
- Taniyama, Y., K. Tachibana, K. Hiraoka, T. Namba, K. Yamasaki, N. Hashiya, M. Aoki, T. Ogihara, K. Yasufumi et R. Morishita (2002). "Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound." *Circulation* 105(10): 1233-9.
- Tao, W., J. Wilkinson, E. J. Stanbridge et M. W. Berns (1987). "Direct gene transfer into human cultured cells facilitated by laser micropuncture of the cell membrane." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(12): 4180-4.
- Tate, P. H. et A. P. Bird (1993). "Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression." *Curr Opin Genet Dev* 3(2): 226-31.
- Tawk, M., D. Tuil, Y. Torrente, S. Vriz et D. Paulin (2002). "High-efficiency gene transfer into adult fish: a new tool to study fin regeneration." *Genesis* 32(1): 27-31.
- Taylor, J., C. F. Babbs, M. B. Alzghoul, A. Olsen, M. Latour, A. L. Pond et K. Hannon (2004). "Optimization of ectopic gene expression in skeletal muscle through DNA transfer by electroporation." *BMC Biotechnol* 4: 11.
- Teissie, J., M. Golzio et M. P. Rols (2005). "Mechanisms of cell membrane electroporation: a minireview of our present (lack of ?) knowledge." *Biochim Biophys Acta* 1724(3): 270-80.
- Teissie, J. et C. Ramos (1998). "Correlation between electric field pulse induced long-lived permeabilization and fusogenicity in cell membranes." *Biophys J* 74(4): 1889-98.
- Teissie, J. et M. P. Rols (1986). "Fusion of mammalian cells in culture is obtained by creating the contact between cells after their electroporation." *Biochem Biophys Res Commun* 140(1): 258-66.
- Teissie, J. et M. P. Rols (1993). "An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation." *Biophys J* 65(1): 409-13.
- Teissie, J. et M. P. Rols (1994). "Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporation." *Ann N Y Acad Sci* 720: 98-110.
- Teissie, J. et T. Yow Tsong (1981). "Voltage modulation of Na⁺/K⁺ transport in human erythrocytes." *J Physiol (Paris)* 77(9): 1043-53.
- Tekle, E., R. D. Astumian et P. B. Chock (1991). "Electroporation by using bipolar oscillating electric field: an improved method for DNA transfection of NIH 3T3 cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(10): 4230-4.

- Thomas, H. E., H. G. Stunnenberg et A. F. Stewart (1993). "Heterodimerization of the Drosophila ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle." *Nature* 362(6419): 471-5.
- Thomas, M. et A. M. Klibanov (2002). "Enhancing polyethylenimine's delivery of plasmid DNA into mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23): 14640-5.
- Thomas, M. et A. M. Klibanov (2003). "Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery." *Appl Microbiol Biotechnol* 62(1): 27-34.
- Tio, R. A., T. Tkebuchava, T. H. Scheuermann, C. Lebherz, M. Magner, M. Kearny, D. D. Esakof, J. M. Isner et J. F. Symes (1999). "Intramyocardial gene therapy with naked DNA encoding vascular endothelial growth factor improves collateral flow to ischemic myocardium." *Hum Gene Ther* 10(18): 2953-60.
- Titomirov, A. V., S. Sukharev et E. Kistanova (1991). "In vivo electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA." *Biochim Biophys Acta* 1088(1): 131-4.
- Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo et *et al.* (1984). "Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from Mycobacterium bovis BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity." *J Natl Cancer Inst* 72(4): 955-62.
- Tollefsen, S., T. Tjelle, J. Schneider, M. Harboe, H. Wiker, G. Hewinson, K. Huygen et I. Mathiesen (2002). "Improved cellular and humoral immune responses against Mycobacterium tuberculosis antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation." *Vaccine* 20(27-28): 3370-8.
- Tollefsen, S., M. Vordermeier, I. Olsen, A. K. Storset, L. J. Reitan, D. Clifford, D. B. Lowrie, H. G. Wiker, K. Huygen, G. Hewinson, I. Mathiesen et T. E. Tjelle (2003). "DNA injection in combination with electroporation: a novel method for vaccination of farmed ruminants." *Scand J Immunol* 57(3): 229-38.
- Tomov, T. et I. Tsoneva (2000). "Are the stainless steel electrodes inert?" *Bioelectrochemistry* 51(2): 207-9.
- Toneguzzo, F., A. C. Hayday et A. Keating (1986). "Electric field-mediated DNA transfer: transient and stable gene expression in human and mouse lymphoid cells." *Mol Cell Biol* 6(2): 703-6.
- Toniatti, C., H. Bujard, R. Cortese et G. Ciliberto (2004). "Gene therapy progress and prospects: transcription regulatory systems." *Gene Ther* 11(8): 649-57.
- Toulmé, J. J. et R. Giegé (1998). "Les aptamères : des ligands et des catalyseurs oligonucléotidiques obtenus par sélection in vitro." *médecine/sciences* 14(2): 155-66.
- Tranchant, I., B. Thompson, C. Nicolazzi, N. Mignet et D. Scherman (2004). "Physicochemical optimisation of plasmid delivery by cationic lipids." *J Gene Med* 6 Suppl 1: S24-35.
- Tripathy, S. K., H. B. Black, E. Goldwasser et J. M. Leiden (1996). "Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors." *Nat Med* 2(5): 545-50.
- Trollet, C., M. Ibañez-Ruiz, C. Bloquel, G. Valin, D. Scherman et P. Bigey (2004). "Regulation of gene expression using a conditional RNA antisense strategy." *J. Genome Sci. Tech.* 3(1): 1-13.
- Tsong, T. Y. (1990). "Electrical modulation of membrane proteins: enforced conformational oscillations and biological energy and signal transductions." *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 19: 83-106.
- Tsong, T. Y. (1991). "Electroporation of cell membranes." *Biophys J* 60(2): 297-306.
- Tsui, P., M. Rubenstein et P. Guinan (2005). "siRNA is not more effective than a first generation antisense oligonucleotide when directed against EGFR in the treatment of PC-3 prostate cancer." *In Vivo* 19(4): 653-6.
- Tsujie, M., Y. Isaka, H. Nakamura, E. Imai et M. Hori (2001). "Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli." *J Am Soc Nephrol* 12(5): 949-54.
- Tupin, E., B. Poirier, M. F. Bureau, J. Khallou-Laschet, R. Vranckx, G. Caligiuri, A. T. Gaston, J. P. Duong Van Huyen, D. Scherman, J. Bariety, J. B. Michel et A. Nicoletti (2003). "Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by in vivo electroporation." *Gene Ther* 10(7): 569-79.
- Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, S. E. Parker, G. H. Rhodes, P. L. Felgner, V. J. Dwarki, S. H. Gromkowski, R. R. Deck, C. M. DeWitt, A. Friedman et *et al.* (1993). "Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein." *Science* 259(5102): 1745-9.
- Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard et W. Hillen (2000). "Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7963-8.
- Van Craenenbroeck, K., P. Vanhoenacker et G. Haegeman (2000). "Episomal vectors for gene expression in mammalian cells." *Eur J Biochem* 267(18): 5665-78.
- Varley, A. W., S. M. Geiszler, R. B. Gaynor et R. S. Munford (1997). "A two-component expression system that responds to inflammatory stimuli in vivo." *Nat Biotechnol* 15(10): 1002-6.
- Vernhes, M. C., P. A. Cabanes et J. Teissie (1999). "Chinese hamster ovary cells sensitivity to localized electrical stresses." *Bioelectrochem Bioenerg* 48(1): 17-25.
- Vicat, J. M., S. Boisseau, P. Jourdes, M. Laine, D. Wion, R. Bouali-Benazzouz, A. L. Benabid et F. Berger (2000). "Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression." *Hum Gene Ther* 11(6): 909-16.

- Vile, R. G. et I. R. Hart (1993). "Use of tissue-specific expression of the herpes simplex virus thymidine kinase gene to inhibit growth of established murine melanomas following direct intratumoral injection of DNA." *Cancer Res* 53(17): 3860-4.
- Vilquin, J. T., B. Guerette, I. Kinoshita, B. Roy, M. Goulet, C. Gravel, R. Roy et J. P. Tremblay (1995). "FK506 immunosuppression to control the immune reactions triggered by first-generation adenovirus-mediated gene transfer." *Hum Gene Ther* 6(11): 1391-401.
- Vilquin, J. T., P. F. Kennel, M. Paturneau-Jouas, P. Chapdelaine, N. Boissel, P. Delaere, J. P. Tremblay, D. Scherman, M. Y. Fisman et K. Schwartz (2001). "Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies." *Gene Ther* 8(14): 1097-107.
- Vitadello, M., M. V. Schiaffino, A. Picard, M. Scarpa et S. Schiaffino (1994). "Gene transfer in regenerating muscle." *Hum Gene Ther* 5(1): 11-8.
- Voinea, M. et M. Simionescu (2002). "Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs." *J Cell Mol Med* 6(4): 465-74.
- Wadman, M. (1998). "Germline gene therapy 'must be spared excessive regulation'." *Nature* 392(6674): 317.
- Walther, W., U. Stein, I. Fichtner, D. Kobelt, J. Aumann, F. Arlt et P. M. Schlag (2005). "Nonviral jet-injection gene transfer for efficient in vivo cytosine deaminase suicide gene therapy of colon carcinoma." *Mol Ther* 12(6): 1176-84.
- Walther, W., U. Stein, I. Fichtner, L. Malcherek, M. Lemm et P. M. Schlag (2001). "Nonviral in vivo gene delivery into tumors using a novel low volume jet-injection technology." *Gene Ther* 8(3): 173-80.
- Wang, Y., F. J. DeMayo, S. Y. Tsai et B. W. O'Malley (1997). "Ligand-inducible and liver-specific target gene expression in transgenic mice." *Nat Biotechnol* 15(3): 239-43.
- Wang, Y., B. W. O'Malley, Jr., S. Y. Tsai et B. W. O'Malley (1994). "A regulatory system for use in gene transfer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 8180-4.
- Wang, Z., P. J. Troilo, X. Wang, T. G. Griffiths, S. J. Pacchione, A. B. Barnum, L. B. Harper, C. J. Pauley, Z. Niu, L. Denisova, T. T. Follmer, G. Rizzuto, G. Ciliberto, E. Fattori, N. L. Monica, S. Manam et B. J. Ledwith (2004). "Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation." *Gene Ther* 11(8): 711-21.
- Watanabe, K., M. Nakazawa, K. Fuse, H. Hanawa, M. Kodama, Y. Aizawa, T. Ohnuki, F. Gejyo, H. Maruyama et J. Miyazaki (2001). "Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation." *Circulation* 104(10): 1098-100.
- Weaver, J. C. (1993). "Electroporation: a general phenomenon for manipulating cells and tissues." *J Cell Biochem* 51(4): 426-35.
- Weeratna, R. D., T. Wu, S. M. Efler, L. Zhang et H. L. Davis (2001). "Designing gene therapy vectors: avoiding immune responses by using tissue-specific promoters." *Gene Ther* 8(24): 1872-8.
- Wei, C. M., M. Gibson, P. G. Spear et E. M. Scolnick (1981). "Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of Harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1." *J Virol* 39(3): 935-44.
- Weiss, B., G. Davidkova et L. W. Zhou (1999). "Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes." *Cell Mol Life Sci* 55(3): 334-58.
- Wells, D. J. (1993). "Improved gene transfer by direct plasmid injection associated with regeneration in mouse skeletal muscle." *FEBS Lett* 332(1-2): 179-82.
- Wells, D. J. (2004). "Gene therapy progress and prospects: electroporation and other physical methods." *Gene Ther* 11(18): 1363-9.
- Wells, K. E., J. Maule, R. Kingston, K. Foster, J. McMahon, E. Damien, A. Poole et D. J. Wells (1997). "Immune responses, not promoter inactivation, are responsible for decreased long-term expression following plasmid gene transfer into skeletal muscle." *FEBS Lett* 407(2): 164-8.
- Wheeler, J. J., L. Palmer, M. Ossanlou, I. MacLachlan, R. W. Graham, Y. P. Zhang, M. J. Hope, P. Scherrer et P. R. Cullis (1999). "Stabilized plasmid-lipid particles: construction and characterization." *Gene Ther* 6(2): 271-81.
- Whittaker, G. R. (2003). "Virus nuclear import." *Adv Drug Deliv Rev* 55(6): 733-47.
- Whittaker, G. R. et A. Helenius (1998). "Nuclear import and export of viruses and virus genomes." *Virology* 246(1): 1-23.
- Widera, G., M. Austin, D. Rabussay, C. Goldbeck, S. W. Barnett, M. Chen, L. Leung, G. R. Otten, K. Thudium, M. J. Selby et J. B. Ulmer (2000). "Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo." *J Immunol* 164(9): 4635-40.
- Williams, R. S., S. A. Johnston, M. Riedy, M. J. DeVit, S. G. McElligott et J. C. Sanford (1991). "Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(7): 2726-30.
- Wilson, G. L., B. S. Dean, G. Wang et D. A. Dean (1999). "Nuclear import of plasmid DNA in digitonin-permeabilized cells requires both cytoplasmic factors and specific DNA sequences." *J Biol Chem* 274(31): 22025-32.
- Wolf, H., M. P. Rols, E. Boldt, E. Neumann et J. Teissie (1994). "Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells." *Biophys J* 66(2 Pt 1): 524-31.

- Wolff, J. A. et V. Budker (2005). "The mechanism of naked DNA uptake and expression." *Adv Genet* 54: 3-20.
- Wolff, J. A., M. E. Dowty, S. Jiao, G. Repetto, R. K. Berg, J. J. Ludtke, P. Williams et D. B. Slautterback (1992). "Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle." *J Cell Sci* 103 (Pt 4): 1249-59.
- Wolff, J. A., J. J. Ludtke, G. Acsadi, P. Williams et A. Jani (1992). "Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle." *Hum Mol Genet* 1(6): 363-9.
- Wolff, J. A., R. W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani et P. L. Felgner (1990). "Direct gene transfer into mouse muscle in vivo." *Science* 247(4949 Pt 1): 1465-8.
- Wolff, J. A., P. Williams, G. Acsadi, S. Jiao, A. Jani et W. Chong (1991). "Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle in vivo." *Biotechniques* 11(4): 474-85.
- Wolfgang, M. J., V. S. Marshall, S. G. Eisele, M. L. Schotzko, J. A. Thomson et T. G. Golos (2002). "Efficient method for expressing transgenes in nonhuman primate embryos using a stable episomal vector." *Mol Reprod Dev* 62(1): 69-73.
- Wong, T. K. et E. Neumann (1982). "Electric field mediated gene transfer." *Biochem Biophys Res Commun* 107(2): 584-7.
- Woods, N. B., A. Muessig, M. Schmidt, J. Flygare, K. Olsson, P. Salmon, D. Trono, C. von Kalle et S. Karlsson (2003). "Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis." *Blood* 101(4): 1284-9.
- Wrobel, I. et D. Collins (1995). "Fusion of cationic liposomes with mammalian cells occurs after endocytosis." *Biochim Biophys Acta* 1235(2): 296-304.
- Wurm, F. M., K. A. Gwinn et R. E. Kingston (1986). "Inducible overproduction of the mouse c-myc protein in mammalian cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(15): 5414-8.
- Xenariou, S., U. Griesenbach, S. Ferrari, P. Dean, R. K. Scheule, S. H. Cheng, D. M. Geddes, C. Plank et E. W. Alton (2006). "Using magnetic forces to enhance non-viral gene transfer to airway epithelium in vivo." *Gene Ther*.
- Xie, T. D., L. Sun et T. Y. Tsong (1990). "Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. I. DNA entry by surface binding and diffusion through membrane pores." *Biophys J* 58(1): 13-9.
- Xu, Y., A. Linde, O. Larsson, D. Thormeyer, J. Elmen, C. Wahlestedt et Z. Liang (2004). "Functional comparison of single- and double-stranded siRNAs in mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun* 316(3): 680-7.
- Xue, F., T. Takahara, Y. Yata, M. Minemura, C. Y. Morioka, S. Takahara, E. Yamato, K. Dono et A. Watanabe (2002). "Attenuated acute liver injury in mice by naked hepatocyte growth factor gene transfer into skeletal muscle with electroporation." *Gut* 50(4): 558-62.
- Yamamoto, A., R. Hen et W. T. Dauer (2001). "The ons and offs of inducible transgenic technology: a review." *Neurobiol Dis* 8(6): 923-32.
- Yamashita, Y., M. Shimada, K. Tachibana, N. Harimoto, E. Tsujita, K. Shirabe, J. Miyazaki et K. Sugimachi (2002). "In vivo gene transfer into muscle via electro-sonoporation." *Hum Gene Ther* 13(17): 2079-84.
- Yamashita, Y., M. Shimada, S. Tanaka, M. Okamamoto, J. Miyazaki et K. Sugimachi (2002). "Electroporation-mediated tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)/Apo2L gene therapy for hepatocellular carcinoma." *Hum Gene Ther* 13(2): 275-86.
- Yang, L., N. Cheong, D. Y. Wang, B. W. Lee, I. C. Kuo, C. H. Huang et K. Y. Chua (2003). "Generation of monoclonal antibodies against Blo t 3 using DNA immunization with in vivo electroporation." *Clin Exp Allergy* 33(5): 663-8.
- Yang, N. S., J. Burkholder, B. Roberts, B. Martinell et D. McCabe (1990). "In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9568-72.
- Yang, N. S. et W. H. Sun (1995). "Gene gun and other non-viral approaches for cancer gene therapy." *Nat Med* 1(5): 481-3.
- Ye, X., V. M. Rivera, P. Zoltick, F. Cerasoli, Jr., M. A. Schnell, G. Gao, J. V. Hughes, M. Gilman et J. M. Wilson (1999). "Regulated delivery of therapeutic proteins after in vivo somatic cell gene transfer." *Science* 283(5398): 88-91.
- Yew, N. S., H. Zhao, M. Przybylska, I. H. Wu, J. D. Tousignant, R. K. Scheule et S. H. Cheng (2002). "CpG-depleted plasmid DNA vectors with enhanced safety and long-term gene expression in vivo." *Mol Ther* 5(6): 731-8.
- Yew, N. S., H. Zhao, I. H. Wu, A. Song, J. D. Tousignant, M. Przybylska et S. H. Cheng (2000). "Reduced inflammatory response to plasmid DNA vectors by elimination and inhibition of immunostimulatory CpG motifs." *Mol Ther* 1(3): 255-62.
- Yoon, Y. G. et M. D. Koob (2003). "Efficient cloning and engineering of entire mitochondrial genomes in Escherichia coli and transfer into transcriptionally active mitochondria." *Nucleic Acids Res* 31(5): 1407-15.
- Yoshizato, K., T. Nishi, T. Goto, S. B. Dev, H. Takeshima, T. Kino, K. Tada, T. Kimura, S. Shiraishi, M. Kochi, J. I. Kuratsu, G. A. Hofmann et Y. Ushio (2000). "Gene delivery with optimized electroporation parameters shows potential for treatment of gliomas." *Int J Oncol* 16(5): 899-905.

- Yovandich, J., B. O'Malley, Jr., M. Sikes et F. D. Ledley (1995). "Gene transfer to synovial cells by intra-articular administration of plasmid DNA." *Hum Gene Ther* 6(5): 603-10.
- Yuasa, K., M. Sakamoto, Y. Miyagoe-Suzuki, A. Tanouchi, H. Yamamoto, J. Li, J. S. Chamberlain, X. Xiao et S. Takeda (2002). "Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product." *Gene Ther* 9(23): 1576-88.
- Yue, Y. et D. Dongsheng (2002). "Development of multiple cloning site cis-vectors for recombinant adeno-associated virus production." *Biotechniques* 33(3): 672, 674, 676-8.
- Zabner, J., A. J. Fasbender, T. Moninger, K. A. Poellinger et M. J. Welsh (1995). "Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid." *J Biol Chem* 270(32): 18997-9007.
- Zaharoff, D. A., R. C. Barr, C. Y. Li et F. Yuan (2002). "Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery." *Gene Ther* 9(19): 1286-90.
- Zaharoff, D. A. et F. Yuan (2004). "Effects of pulse strength and pulse duration on in vitro DNA electromobility." *Bioelectrochemistry* 62(1): 37-45.
- Zamecnik, P. C. et M. L. Stephenson (1978). "Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide." *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1): 280-4.
- Zanta, M. A., P. Belguise-Valladier et J. P. Behr (1999). "Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(1): 91-6.
- Zeira, E., A. Manevitch, A. Khatchatourians, O. Pappo, E. Hyam, M. Darash-Yahana, E. Tavor, A. Honigman, A. Lewis et E. Galun (2003). "Femtosecond infrared laser-an efficient and safe in vivo gene delivery system for prolonged expression." *Mol Ther* 8(2): 342-50.
- Zelenin, A. V., V. A. Kolesnikov, O. A. Tarasenko, R. A. Shafei, I. A. Zelenina, V. V. Mikhailov, M. L. Semenova, D. V. Kovalenko, O. V. Artemyeva, T. E. Ivaschenko, O. V. Evgrafov, G. Dickson et V. S. Baranovand (1997). "Bacterial beta-galactosidase and human dystrophin genes are expressed in mouse skeletal muscle fibers after ballistic transfection." *FEBS Lett* 414(2): 319-22.
- Zhang, G., V. Budker, P. Williams, V. Subbotin et J. A. Wolff (2001). "Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates." *Hum Gene Ther* 12(4): 427-38.
- Zhang, G., V. Budker et J. A. Wolff (1999). "High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA." *Hum Gene Ther* 10(10): 1735-7.
- Zhang, G., X. Gao, Y. K. Song, R. Vollmer, D. B. Stolz, J. Z. Gasiorowski, D. A. Dean et D. Liu (2004). "Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery." *Gene Ther* 11(8): 675-82.
- Zhang, G. H., X. F. Tan, D. Shen, S. Y. Zhao, Y. L. Shi, C. K. Jin, W. G. Sun, Y. H. Guo, K. H. Chen et J. Tang (2003). "Gene expression and antitumor effect following im electroporation delivery of human interferon alpha 2 gene." *Acta Pharmacol Sin* 24(9): 891-6.
- Zhang, L., E. Nolan, S. Kreitschitz et D. P. Rabussay (2002). "Enhanced delivery of naked DNA to the skin by non-invasive in vivo electroporation." *Biochim Biophys Acta* 1572(1): 1-9.
- Zhou, X. et L. Huang (1994). "DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action." *Biochim Biophys Acta* 1189(2): 195-203.
- Zhu, C., Y. Zhang et W. M. Pardridge (2002). "Widespread expression of an exogenous gene in the eye after intravenous administration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43(9): 3075-80.
- Zimmermann, U., G. Pilwat et F. Riemann (1974). "Dielectric breakdown of cell membranes." *Biophys J* 14(11): 881-99.
- Zimmermann, U. et P. Scheurich (1981). "Fusion of Avena sativa mesophyll cell protoplasts by electrical breakdown." *Biochim Biophys Acta* 641(1): 160-5.
- Zimmermann, U. et H. B. Urnovitz (1987). "Principles of electrofusion and electroporabilization." *Methods Enzymol* 151: 194-221.
- Zimmermann, U. et J. Vienken (1982). "Electric field-induced cell-to-cell fusion." *J Membr Biol* 67(3): 165-82.
- Zucchelli, S., S. Capone, E. Fattori, A. Folgori, A. Di Marco, D. Casimiro, A. J. Simon, R. Laufer, N. La Monica, R. Cortese et A. Nicosia (2000). "Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer." *J Virol* 74(24): 11598-607.
- Zufferey, R., D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini et D. Trono (1997). "Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo." *Nat Biotechnol* 15(9): 871-5.

Annexes

Article 3

Article 3

Exemple d'application de l'électrotransfert en oncologie : électrotransfert d'un plasmide codant pour p53wt dans des tumeurs

Nous nous sommes aussi attachés à l'efficacité de l'électrotransfert en terme thérapeutique. Le traitement des cancers représentant l'application principale du transfert de gènes nous avons étudié en collaboration avec une équipe slovène, une application en oncologie (Cemazar, Grosel *et al.* 2003).

Cette étude comporte deux volets :

- dans un premier temps une étude *in vitro* de l'électrotransfert de p53wt, seul ou combiné avec un traitement au cisplatine, dans différentes lignées tumorales avec différents statuts concernant p53 a été réalisée
- dans un deuxième temps, la faisabilité de l'électrotransfert *in vivo*, dans des xénogreffes de cancer prostatique PC-3, d'un plasmide contenant le gène de la protéine p53 sauvage (p53wt) a été testée

C'est cette deuxième partie que nous avons effectuée dans le cadre de cette thèse.

Effects of Electrogenetherapy with *p53wt* Combined with Cisplatin on Survival of Human Tumor Cell Lines with Different *p53* Status

MAJA CEMAZAR,¹ ALENKA GROSEL,¹ DAMJAN GLAVAC,² VLADIMIR KOTNIK,³
MOJCA SKOBRNE,³ SIMONA KRANJC,¹ LLUIS M. MIR,⁴ FRANK ANDRE,⁴ PAULE OPOLON,⁴
and GREGOR SERSA¹

ABSTRACT

The aim of our study was to evaluate electrogenetherapy with *p53wt* alone or combined with cisplatin on two colorectal (HT-29 and LoVo) and two prostatic (PC-3 and Du145) carcinoma cell lines with different *p53* status. In addition, the feasibility of electrogenetherapy with *p53wt* was tested also *in vivo* on PC-3 prostatic cancer xenografts. Electrogenetherapy with *p53wt* was dependent on the *p53* status of the cell lines used. Electrogenetherapy was the most effective on the PC-3 (*p53 null*) and Du145 (*p53mt*) cells, and to the much lesser extent in LoVo cells (*p53wt*). The exception was the HT-29 cell line with overexpressed mutated *p53*, where electrogenetherapy with *p53wt* was the least effective. Sensitivity of the cell lines to cisplatin was independent of the *p53* status. Furthermore, the presence of exogenous *p53* due to electrogenetherapy did not enhance cisplatin cytotoxicity, since the combination of these therapies resulted in additive cytotoxic effect. The effectiveness of electrogenetherapy with *p53wt* was also demonstrated *in vivo* by successful treatment of subcutaneous PC-3 tumors in mice. In conclusion, our study shows that electrogenetherapy with *p53wt* is feasible, and resulted in comparable cytotoxic and antitumor effectiveness to viral-mediated *p53wt* gene therapy. This therapy was effective and dependent on the *p53* status of the tumor cell lines. Combination of electrogenetherapy and cisplatin resulted in additional cell kill by cisplatin, and was not dependent on the *p53* status.

INTRODUCTION

ELECTROPORATION HAS GAINED much attention in recent years as an emerging way for increasing drug and DNA delivery in different type of tissues (Neumann and Rosenheck, 1972; Jaroszeski *et al.*, 2000). In the case of electrochemotherapy, that is, combination of electroporation with chemotherapeutic drugs, this treatment strategy already reached clinical testing; however, in the case of electroporation-assisted gene delivery, it is still on the preclinical level (Gehl, 2003; Sersa *et al.*, 2003). So far, most of the studies on electroporation-assisted gene delivery, that is, electrogenetherapy, were focused on the optimization of the electric pulses parameters to achieve good transfection efficiency (Cemazar *et al.*, 2002; Gilbert *et al.*, 2002; Gehl, 2003).

Recent studies demonstrated the feasibility of electrogenetherapy using different genes in the treatment of tumors (Heller *et al.*, 2000; Cichon *et al.*, 2002; Mikata *et al.*, 2002; Gehl, 2003).

The *p53* gene encodes for a 593-amino acid nuclear phosphoprotein that acts as a transcription factor to control cell cycle and an inducer of apoptosis. DNA damage, oncogene activation, or different treatments cause an accumulation of the *p53* protein, which can arrest cells in the G₁ or G₂ cell-cycle phase, can lead to DNA repair or induction of apoptosis (Bullock and Fersht, 2001).

Up to recently, a tenet in oncology was that tumor cells

¹Institute of Oncology, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.

²Medical Faculty, Institute of Pathology, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.

³Medical Faculty, Institute of Microbiology and Immunology, SI-1000 Ljubljana, Slovenia.

⁴UMR 8121 CNRS, Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France.

treated with anticancer agents die from apoptosis, and that *p53* gene mutations are associated with resistance to chemo and radiotherapy (Nielsen and Maneval, 1998; Zeimet *et al.*, 2000). Several studies demonstrated that reintroduction of *p53wt* results in tumor regression of different tumor types (Baker *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1995; Miyake *et al.*, 1998; Narimatsu *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1999; Eastham *et al.*, 2000; Mikata *et al.*, 2002; Shono *et al.*, 2002). Based on preclinical studies, several clinical studies testing *p53* gene therapy on different tumors have been initiated (Roth *et al.*, 1996; Clayman *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2003; Makower *et al.*, 2003; Nemunaitis *et al.*, 2000a; Pagliaro *et al.*, 2003; Schwiser *et al.*, 2003).

However, recent studies using as the end point for cell killing long term, clonogenic assay and growth delay assay, rather than short term assay such as MTT or dye exclusion assay for *in vitro* studies and tumor volume at a specific day for *in vivo* studies, demonstrated that neither *p53* status nor the ability of cells to undergo apoptosis appeared to play a significant role in the sensitivity of these cells to DNA-damaging agents (Brown and Wouters, 1999). These do not apply to cancer of hematological origin, where apoptosis is a dominant form of cell death after exposure to DNA-damaging agents. Nevertheless, a number of clinical studies combining *p53*-based gene therapy with chemotherapeutic drugs or radiotherapy demonstrated that *p53wt* could enhance the efficacy of these therapies (Nguyen *et al.*, 1996; Nemunaitis *et al.*, 2000b; Galanis and Russell, 2001). This controversy requires further studies to investigate the role of *p53* in the sensitivity of tumor cells to cancer treatments.

Therefore, the aim of our study was to evaluate electrogenotherapy with *p53wt* alone or combined with cisplatin on two colorectal and two prostatic carcinoma cell lines with different *p53* status. In addition, the feasibility of electrogenotherapy with *p53wt* was tested *in vivo* on PC-3 prostatic cancer xenografts. For this purpose, long-term clonogenic assay for *in vitro* and tumor growth delay assay for *in vivo* studies were used.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and tumors

LoVo (CCL-229 ATCC, Manassas, VA) and HT-29 (91072201 EACACC, Port Down, UK) colorectal carcinoma and PC-3 (CRL-1435, ATCC) and Du145 (HTB-81 ATCC) prostatic carcinoma cell lines were used in experiments. LoVo and PC-3 cells were grown in F12 Ham's (Sigma, St. Louis, MO), HT-29 and Du145 in Eagle's minimum essential medium (EMEM, Sigma) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS; Sigma), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, and 100 IU/ml penicillin/streptomycin (Pliva, Zagreb, Croatia). Cells were routinely subcultured twice per week, and were maintained in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C. Cells for induction of subcutaneous PC-3 tumors in Nod Scid mice (bred and maintained at the Institut Gustave-Roussy, Villejuif, France) were prepared from *in vitro* cell culture. Tumors were implanted dorsolaterally by injection of 2.5×10^6 cells. After approximately 3 weeks when the tumors reached ~6 mm in diameter, the mice were subjected to specific treatment protocol.

Drugs

Cisplatin [cis-Diamminedichloroplatinum (II)] obtained from Pharmacia & Upjohn S. p. A. (Milan, Italy) as crystalline powder was dissolved in EMEM medium at a concentration 2 mg/ml for *in vitro* experiments. Further dilutions were prepared in EMEM just before the experiments.

Plasmids

In the experiments were used pCMV Neo-Bam vector (pCMV) and pC53-SN3 human wild-type *p53* cDNA inserted in pCMV Neo-Bam vector (*p53wt*), which were generously provided by B. Vogelstein (John Hopkins University, Baltimore, MO). The construction and characterization of these plasmids has been described previously (Baker *et al.*, 1990).

The ability of pC53-SN3 to express the *p53* protein was verified by immunochemical staining with DO7 anti *p53* antibody (DAKO; Glostrup, Denmark) after electroporation-assisted transfection into PC-3 cells *in vitro* and *in vivo*.

The plasmid DNA, pEGFP-N1 (Clontech, Basingstoke, UK) encoding enhanced GFP controlled by the CMV promoter was used to determine the electroporation's transfection efficiency.

Immunocytochemical determination of *p53* status

Immunocytochemical staining was performed on PC-3, Du145, LoVo, and HT-29 cell lines grown on microscopic chamber slides (NalgeNunc, Portsmouth, NH), using DO7 anti-*p53* antibody. First, cells were plated onto chamber slides, left to adhere, and to form a monolayer. Then, medium was removed and cells were fixed in ice-cold methanol for 5 min. Slides were rinsed three times with phosphate-buffered saline (PBS). To block nonspecific binding of primary antibody, cells were incubated with normal rabbit serum (DAKO) for 30 min and rinsed three times with PBS. The primary antibody DO7 was applied overnight at 1:300 dilution at 4°C in a humidified chamber. Biotinylated secondary FITC-labeled antibody (DAKO) was used to detect specific binding of DO7. Cells were then analyzed using an inverted fluorescence microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

DNA isolation

DNA was extracted with a DNA isolation kit from Nucleon (Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK). In brief, 5×10^5 – 2×10^6 cells were collected by centrifugation, lysed, and deproteinized. DNA was extracted with chloroform, precipitated with cold absolute ethanol, washed with 70% ethanol, and dissolved in water.

PCR

The exons 5, 6, 7, and 8 of the *p53* gene were amplified. A PCR reaction contained 50 ng genomic DNA, 0.15 μ M of each primer (*p53Ex5*(1)–*p53Ex8*(2); Table 1), Eppendorf HotMaster Taq DNA Polymerase, 2.5 mM MgCl₂, 0.23 mM dNTP mix, and H₂O to the total volume of 25 μ l. The PCR program was 2 min at 95°C, followed by 33 cycles of 20 sec at 95°C, 10 sec at 60°C, 30 sec at 65°C, and a final extension of 7 min at 65°C.

TABLE 1. OLIGONUCLEOTIDES USED IN THE STUDY

Exon	Forward primer		Reverse primer	
	Name	Sequence	Name	Sequence
5	p53Ex5(1)	GTACTCCCCTGCCCTCAACA	p53Ex5(2)	CTCACCATCGCTATCTGAGCA
6	p53Ex6(1)	TTGCTCTTAGGTCTGGCCC	p53Ex6(2)	CAGACCTCAGGCGGCTCATA
7	p53Ex7(1)	TAGGTTGGCTCTGACTGTACC	p53Ex7(2)	TGACCTGGAGTCTTCCAGTGT
8	p53Ex8(1)	AGTGGAATCTACTGGGACGG	p53Ex8(2)	ACCTCGCTTAGTGCTCCCTG

Sequencing

The PCR products were purified with QIA PCR purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), and the nucleotide sequences were obtained by automatic sequencing using an ABI prism 310 automatic sequencer and an ABI PRISM Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit.

Cytotoxicity of cisplatin

To determine the sensitivity of PC-3, Du145, LoVo, and HT-29 cell lines to continuous exposure to cisplatin, the cells were plated onto Petri dishes (CorningCostar, Acton, MA) in 4 ml of medium containing different cisplatin concentrations ranging from 0.05 to 1 $\mu\text{g/ml}$ and incubated in a 5% CO_2 humidified incubator at 37°C. After 10–12 days, colonies were fixed, stained with crystal violet, and counted. Colonies containing less than 50 cells were ignored. Plating efficiency and the surviving fraction were then calculated. The experiments were performed in triplicate and repeated three times. From survival curves, the IC_{50} value (drug concentration required to reduce cell survival for 50%) was determined for each cell line.

Determination of transfection efficiency using pEGFP-N1

To determine transfection efficiency of electroporation-assisted gene delivery, pEGFP-N1 plasmid was used. Dense cell suspension with concentration 1×10^6 of cells and 10 μg of plasmid DNA in 50 μl of EMEM was placed between two flat parallel stainless steel electrodes with a 2-mm gap connected to the GT-1 electroporator (Puc *et al.*, 2001) and subjected to eight square-wave-shaped electric pulses with a 5-msec duration, repetition frequency of 1 Hz, and electric field intensity of 600 V/cm. After exposure to electric pulses, the cells were incubated for 5 min at room temperature. Thereafter, cells were plated on 100-mm Petri dishes (CorningCostar) and at selected time points up to 72 h, cells were trypsinized and collected by centrifugation. Transfection efficiency was determined by counting the fluorescent, that is, green fluorescent protein (GFP)-positive cells in relation to the number of cells in a bright field using a hemocytometer. Transfection efficiency was expressed as the percentage of GFP-positive cells compared to all counted cells in the bright field.

Electrogenetherapy with *p53* combined with cisplatin in vitro

The protocol for electroporation-assisted transfection was the same as described above. After exposure to electric pulses the

cells were incubated for 5 min at room temperature. Colony-forming assay cells were diluted 60 times with appropriate medium containing 10% FCS and plated on Petri dishes in 4 ml of medium containing 10% FCS. After 24 h cisplatin at IC_{50} concentration was added. Cells were further incubated in a 5% CO_2 humidified incubator at 37°C. After 10–12 days, colonies were fixed, stained with crystal violet, and counted. Colonies containing less than 50 cells were ignored. Plating efficiency and surviving fraction were then calculated. The experiments were performed in triplicate and repeated three times.

Apoptosis determined by flow cytometry

To quantitatively determine the percentage of cells undergoing apoptosis annexin V-FITC binding (BD PharMingen, San Diego, CA) was used. Forty-eight hours after electrogenetherapy, cells were trypsinized and washed with PBS. Cells (2×10^5 cells) were stained with FITC-labeled annexin V and propidium iodide (Sigma) according to the manufacturer's instructions and subjected to flow cytometry analysis. The percentage of apoptotic (annexin V positive and propidium iodide negative) and dead (propidium iodide positive) cells were determined.

Electrogenetherapy with *p53wt* in vivo

Antitumor effectiveness of electrogenetherapy with *p53wt* was determined on PC-3 tumors. Plasmid DNA was injected intratumorally (i.e., 50 μg in 50 μl water) with or without subsequent electroporation. Electric pulses were delivered immediately after i.t. injection as described previously (Cemazar *et al.*, 2002). Briefly, electrodes were placed percutaneously at the opposite margins of the tumor. Electrodes consisted of two flat stainless steel strips with the gap between them of 5 mm. Good contact between the electrodes and the overlying skin was assured by means of a conductive gel (Parker Laboratories, Inc., New York). Eight square-wave pulses of 600 V/cm (amplitude/electrode distance ratio) and a 5 ms pulse duration at a repetition frequency of 1 Hz were generated by a Jouan GHT 1287 electroporator (Jouan, St. Herblaine, France). Response of the tumor to electrogenetherapy was followed by measuring three mutually orthogonal diameters, and tumor volume calculated by the formula for ellipsoid. To demonstrate transfection efficiency of electroporation-assisted transfection of PC-3 tumor pEGFP-N1 plasmid was used. Tumors were excised 48 h thereafter and cut in half along the longest diameter. The GFP fluorescence on the tumor specimen was assessed using a fluorescence binocular. In addition, transfection efficiency of electrogenetherapy with *p53wt* was assessed by immunohisto-

TABLE 2. STATUS OF *p53* IN DIFFERENT CELL LINES

Cell lines	Immune staining with DO7	Mutation at <i>cDNA</i> nucleotide position	Amino acid change
HT-29	+++	Exon 8: 1070 G > A homozygous	273 Arg > His
LoVo	+	No mutation	
PC-3	—	—	
Du145	++	Exon 8: 1072 G > T heterozygous	274 Val > Phe

chemical staining on paraffin sections using DO7, an anti-p53 antibody.

Statistical analysis

Significance tests were carried out on the data groups using analysis of variance (ANOVA) followed by the Student's *t*-test for individual pairwise comparisons, with values of $P < 0.05$ considered as significant.

RESULTS

Determination of *p53* status

To determine *p53* status and confirm the data from the literature on *p53* status of the tested cell lines, DO7 anti-p53 antibody and sequencing were used. The status of the *p53* gene in HT-29 colorectal carcinoma is homozygous; mutated at codon 273 (O'Connor *et al.*, 1997). Strong positive reaction obtained by immunostaining also indicated on the presence of mu-

tated p53 protein. Sequencing of *p53* gene exons showed no mutation, and only few LoVo cells showed weak positive reaction, which also indicated on the expression of wild-type *p53* (O'Connor *et al.*, 1997). In PC-3 cells, which have deleted the *p53* gene, complete absence of the positive staining was obtained. Reaction in Du145 cells was strongly positive, and status of the *p53* gene was determined as heterozygous; wild type and mutated at codon 274 (Table 2) (Rubin *et al.*, 1991).

Transfection efficiency using *pEGFP-N1* in vitro and in vivo

To determine the transfection efficiency of electroporation-assisted gene delivery *in vitro*, the expression of GFP was followed over time period of 72 h. In all the cell lines tested, transfection efficiency was already observed at 4 h posttransfection. The maximal transfection efficiency was obtained at 24 h posttransfection, except for the Du145 cells, where the maximal transfection was obtained already at 8 h posttransfection. The percentage of transfected cells varied between the cell lines.

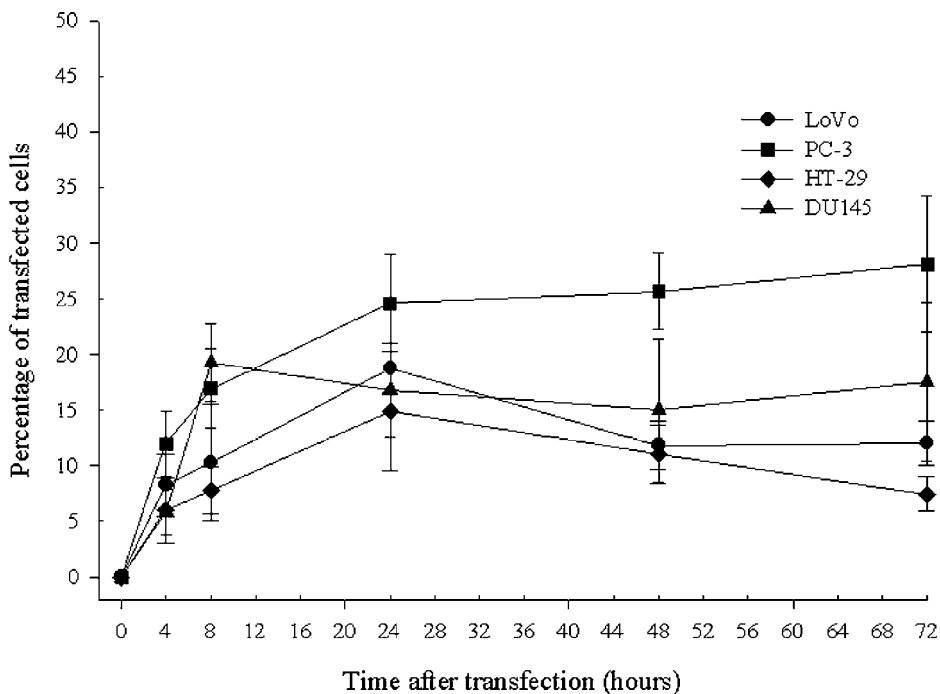


FIG. 1. Percentage of GFP positive cells after electroporation-assisted gene delivery at different time points. Data points are AM $\pm$ SE of three experiments.

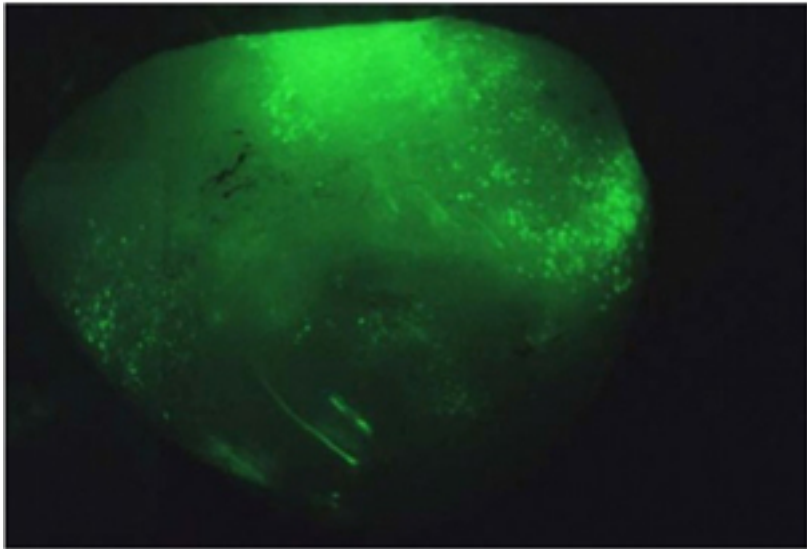


FIG. 2. Expression of GFP in solid subcutaneous PC-3 human tumor xenografts. Tumors were treated with intratumoral injection of pEGFP-N1 combined with application of electric pulses to the tumor and excised 48 h thereafter. The GFP fluorescence on the whole-tumor specimen was observed using fluorescence binocular.

The transfection efficiency was the highest in PC-3 cells (~25%), in the other cell lines was lower (~15%) at 24 h posttransfection. For the colorectal carcinoma cell lines (HT-29 and LoVo) transfection efficiency thereafter slowly decreased to ~10% at 72 h posttransfection. In PC-3 and Du145 prostatic carcinoma cells, transfection efficiency remained at the maximal level up to 72 h posttransfection (Fig. 1). In the subsequent

experiments on electrogenetherapy with *p53wt* combined with cisplatin, cisplatin was added to the cells at maximal *p53wt* expression, that is, 24 h. To determine the transfection efficiency of electroporation-assisted gene delivery *in vivo*, expression of GFP was determined in PC-3 tumors 48 h posttransfection. Focal expression of GFP was observed, especially at the tumor edges (Fig. 2).

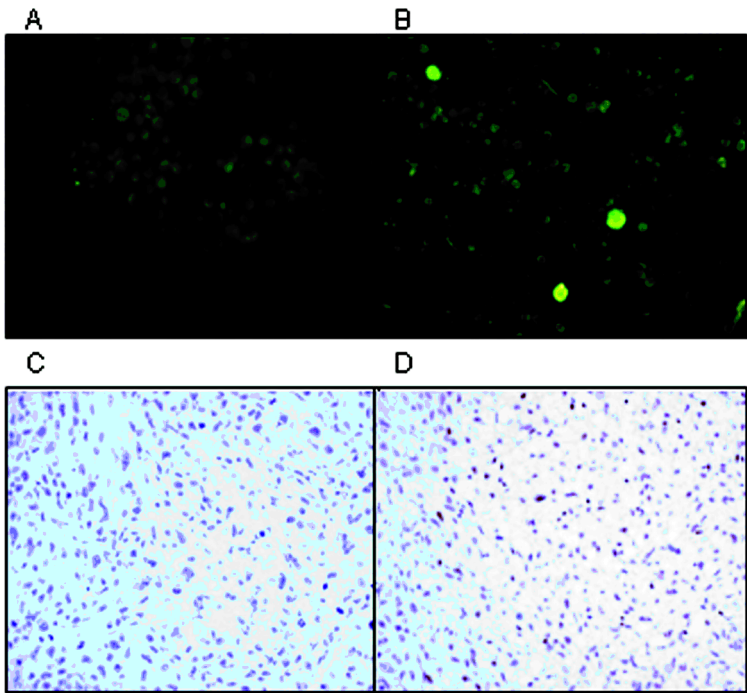


FIG. 3. Expression of *p53wt* in PC-3 cells (A,B; $\times 400$) and tumors (C,D; $\times 200$) 24 h after electrogenetherapy with *p53wt* detected with DO7 anti p53 antibody. Treatment of cells or tumor with *p53wt* only did not cause detectable p53 expression (A,C). Electrogenetherapy with *p53wt* resulted in the expression of p53 (positive nuclear staining) in cells (B) as well as in tumors (D).

In addition to GFP transfection, in the PC-3 cells and tumors, which are *p53* null, the transfection efficiency and ability of *p53wt* to express p53 protein was verified by immunocytochemical staining with DO7 anti p53 antibody (Fig. 3). Positive reaction was observed only in the cells and tumor section of tumors that were treated with electrogenotherapy with *p53wt* (Fig. 3B and D). No staining was observed in cells or tumors that were treated with *p53wt* only (Fig. 3A and C).

Cisplatin cytotoxicity

To determine the intrinsic sensitivity of the cell lines used in the study to cisplatin, cells were continuously exposed to cisplatin in a colony-forming assay. HT-29 and LoVo cells were equally sensitive to cisplatin with an IC_{50} value of 0.21 and 0.24 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, respectively. Du145 cells were slightly less sensitive with an IC_{50} value of 0.28 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin. For all these three cell lines, concentration of 0.25 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin was chosen for subsequent experiments on electrogenotherapy combined with cisplatin. PC-3 cells were more sensitive to cisplatin cytotoxic action, compared to other three cell lines tested. The IC_{50} value was 0.085 $\mu\text{g/ml}$ cisplatin, and this concentration was chosen for subsequent experiments (Fig. 4).

Electrogenotherapy with *p53* combined with cisplatin in vitro

HT-29 and LoVo colorectal carcinoma cells. To determine the survival of cells after electrogenotherapy with *p53wt* combined with cisplatin colony-forming assay was performed. Nei-

ther the pCMV vector nor *p53wt* plasmid affected survival of HT-29 and LoVo cells. Cisplatin alone reduced survival of HT-29 and LoVo cells to $\sim 50\%$, as expected. Combination of cisplatin and both plasmids did not further reduce survival of these cell lines. Electric pulses reduced survival to approximately the same level as treatment with cisplatin or a combination of cisplatin and plasmids.

Survival of the cells treated with electric pulses and cisplatin and/or plasmids were normalized to the electric pulses treatment alone. Exposure of cells to cisplatin 24 h after application of electric pulses reduced survival for $\sim 60\%$. Electrogenotherapy with *p53wt* or the pCMV vector reduced survival of HT-29 cells for $\sim 70\%$, which was probably due to the toxicity of DNA. Compared to electrogenotherapy alone, the survival of cells treated with electrogenotherapy combined with cisplatin was further reduced for 50%, which was due to the cytotoxic action of cisplatin. On the other hand, in LoVo cells, electrogenotherapy with *p53wt* was more effective compared to electrogenotherapy with the pCMV vector only. Furthermore, survival of LoVo cells was greatly reduced after electrogenotherapy with *p53wt* combined with cisplatin compared to electrogenotherapy with the pCMV vector combined with cisplatin (Fig. 5).

PC-3 and Du145 prostatic carcinoma cells. Cytotoxicity of either of the plasmids alone did not affect the survival of PC-3 and Du145 cells. Cisplatin alone reduced survival of PC-3 and Du145 cells to $\sim 50\%$, as expected. Combination of cisplatin and plasmids did not further reduce survival of PC-3 cells, but showed some effect on Du145 cells. Electric pulses

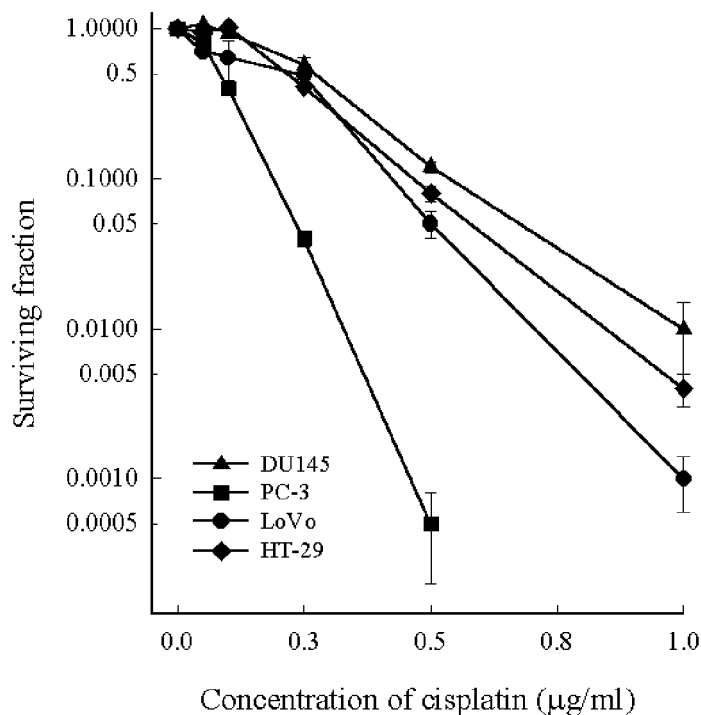


FIG. 4. Sensitivity of PC-3, Du145, LoVo, and HT-29 cell lines to continuous exposure to different concentrations of cisplatin. Data points are AM $\pm$ SE of three experiments performed in triplicate.

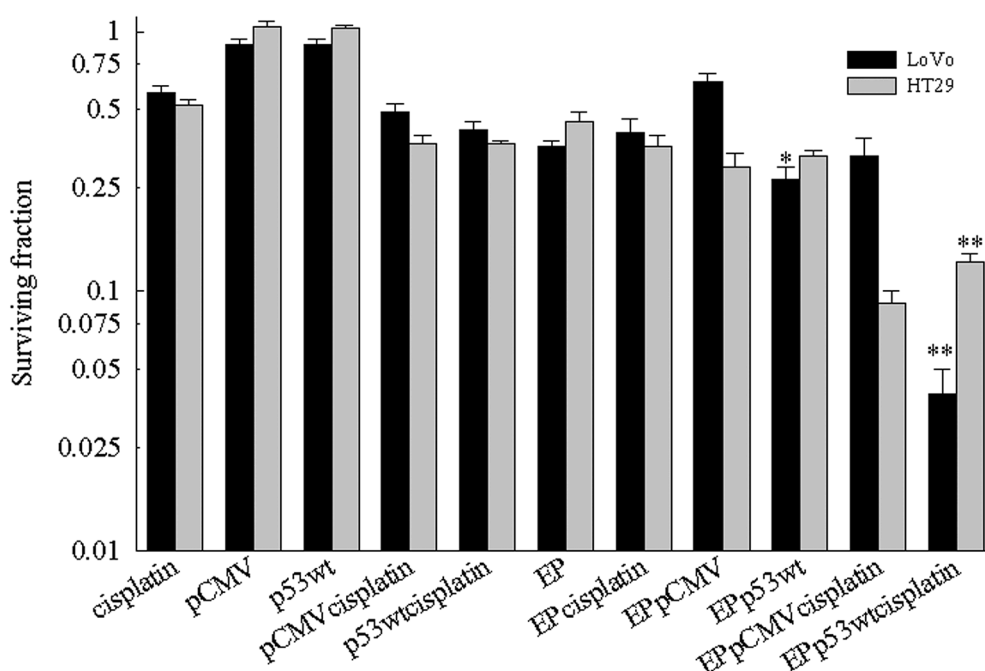


FIG. 5. Surviving fraction of human colorectal carcinoma cells HT29 and LoVo after electrogenetherapy with *p53wt* alone or combined with cisplatin. Survival of the cells treated with electric pulses and cisplatin and/or plasmids were normalized to the electric pulses treatment alone. Experiments were performed three times using triplicate samples. Each column represents $AM \pm SE$. * $P < 0.001$ compared group EPp53wt to EPpCMV in the cell line LoVo, ** $P = 0.024$ and $P < 0.001$ compared group EPp53wt cisplatin to EPpCMV cisplatin in cell line HT29 and LoVo, respectively.

were more cytotoxic to prostatic carcinoma cells compared to colorectal carcinoma cells and reduced survival to ~40%.

Survival of the cells treated with electric pulses and cisplatin and/or plasmids were normalized to the electric pulses treatment alone. Exposure of cells to cisplatin 24 h after application of electric pulses reduced survival for ~50%. Electrogenetherapy with pCMV vector reduced survival of PC-3 and Du145 cells for ~70%, which was probably due to the toxicity of DNA. Compared to electrogenetherapy with the pCMV vector electrogenetherapy with *p53wt* in these cell lines significantly reduced cell survival. The effect of electrogenetherapy with *p53wt* was more pronounced on Du145 cells compared to PC-3 cells. Addition of cisplatin to electrotransfected cells further reduced cell survival for 50%, which was due to the cisplatin cytotoxic action (Fig. 6).

Detection of apoptosis in vitro

Apoptosis was determined 48 h after electrogenetherapy alone or combined with cisplatin using annexin V binding. At the selected time point we did not observe an increase in apoptosis for HT-29 and LoVo colorectal carcinoma cells in any of the treatment groups compared to the control. Furthermore, in PC-3 prostatic carcinoma cells, electrogenetherapy with *p53wt* alone or combined with cisplatin, apoptotic cell death was also not detected. The only increase in apoptosis was observed in Du145 cells after electrogenetherapy with *p53wt*, however not statistically significant. Addition of cisplatin to electrotrans-

fected cells did not further increase apoptosis in this cell line (data not shown). However, in all the treatment groups where the cells were exposed to electric pulses a high percentage, up to 99%, of dead cells (propidium iodide positive) was detected, which is in accordance with the data obtained by colony-forming assay after electrogenetherapy with or without cisplatin described above in the section titled Electrogenetherapy with *p53* combined with cisplatin *in vitro*. Therefore, the analysis of annexin V binding on the remaining small percentage of viable cells could not be conclusive.

Electrogenetherapy with *p53wt* in vivo

To demonstrate the therapeutic potential of electrogenetherapy with *p53wt* PC-3 human prostatic carcinoma xenografts were used. Tumors were treated three times, on days 0, 6, and 12 with electroporation, *p53wt*, pCMV alone, or electrogenetherapy with either of the plasmids. Monotherapies with electric pulses and either of the plasmids alone did not substantially affect tumor growth of PC-3 tumors. Combination of electrogenetherapy with the pCMV vector delayed growth of the tumors for 8 days compared to the untreated control group. Electrogenetherapy with *p53wt* was much more effective. It delayed tumor growth for 16 days in comparison with the untreated control group. Tumor growth was arrested during the treatment period up to 12 days; however, after the last treatment, tumors started to grow with approximately the same growth rate as the control tumors (Fig. 7).

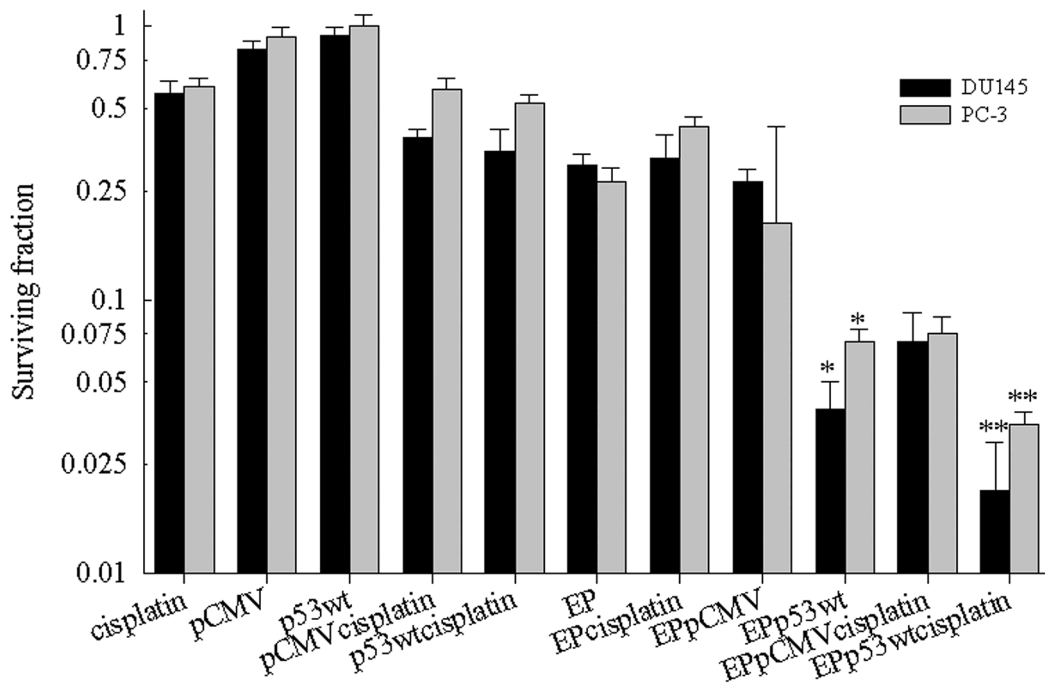


FIG. 6. Surviving fraction of human prostatic carcinoma cells PC-3 and DU145 after electrogenetherapy with *p53wt* alone or combined with cisplatin. Survival of the cells treated with electric pulses and cisplatin and/or plasmids were normalized to the electric pulses treatment alone. Experiments were performed three times using triplicate samples. Each column represents AM $\pm$ SE. * $P < 0.001$ compared group EPp53wt to EPpCMV with both cell lines, ** $P = 0.009$ and $P = 0.034$ compared group EPp53wtcisplatin to EPpCMVcisplatin with cell line PC3 and DU145, respectively.

DISCUSSION

Our study shows that cells with different *p53* status respond differently to electrogenetherapy with *p53wt* alone or combined with cisplatin. Electrogenetherapy with *p53wt* was dependent on *p53* status of the cell lines used. Electrogenetherapy was the most effective on the PC-3 (*p53* null) and DU145 (*p53mt*) cells, and to the much lesser extent in LoVo cells (*p53wt*). The exception was HT-29 cell line with overexpressed mutated *p53*, where electrogenetherapy with *p53wt* was the least effective. Sensitivity of the cell lines to cisplatin was independent of the *p53* status. Furthermore, the presence of exogenous *p53* due to electrogenetherapy did not enhance cisplatin cytotoxicity, since the combination of these therapies resulted in additive cytotoxic effect. The effectiveness of electrogenetherapy with *p53wt* was demonstrated also *in vivo* by successful treatment of subcutaneous PC-3 human tumor xenografts in nude mice.

Dysfunction of *p53* tumor suppressor gene is seen in more than 50% of all human malignancies (Hollstein *et al.*, 1991). Therefore, gene replacement therapy with *p53wt* gained a lot of attention in the last decade. Numerous clinical trials in a variety of tumor types, such as glioma, bladder carcinoma, hepatobiliary tumors, ovarian carcinoma, nonsmall-cell lung carcinoma, and head and neck tumors have been performed. In most of these clinical studies adenoviral-mediated *p53* gene transfer using intratumoral, intraperitoneal or intravesicular injection was used either alone or combined with chemo or radiotherapy (Roth *et al.*, 1996; Clayman *et al.*, 1998, 1999; Nemunaitis *et*

al., 2000a, 2000b; Buller *et al.*, 2002; Kuball *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2003; Makower *et al.*, 2003; Pagliaro *et al.*, 2003; Swisher *et al.*, 2003). The results of these studies were mostly encouraging, and therefore, gene replacement therapy with *p53wt* deserves further development. However, there are problems associated with the adenoviral vectors, such as immunogenicity of viral protein that induces a loss of transgene expression after repeated administration which is limiting its use especially in the cases of repetitive administration of the therapy. In the case of gene therapy with *p53wt*, due to the transient expression of *p53wt*, repetitive administration of the vector is recommended (Dolivet *et al.*, 2002). Considering these problems with the adenoviral gene delivery systems, nonviral gene delivery systems appear attractive strategy for gene therapy.

In the present study, we used electroporation, a physical delivery system, which has already proven its effectiveness in enhancing drug and plasmid DNA delivery to different types of tissues, including tumors (Jaroszeski *et al.*, 2000). Electrochemotherapy with cisplatin and bleomycin has already been tested in clinical trials demonstrating that electroporation increases chemotherapeutic drug effectiveness. The trials demonstrated that electrochemotherapy is an effective treatment for local tumor control (Gehl, 2003; Sersa *et al.*, 2003). However, electrogenetherapy is still in preclinical testing awaiting clinical trials, where the same electric pulses generators could be used as in electrochemotherapy. Electroporation-assisted delivery of therapeutic genes, such as *endostatin*, *IL-12*, *IL-18*, *IFN- α* , *HSVtk/GCV*, *Stat3*, *GM-CSF*, *IL-2*, and *p53* demonstrated

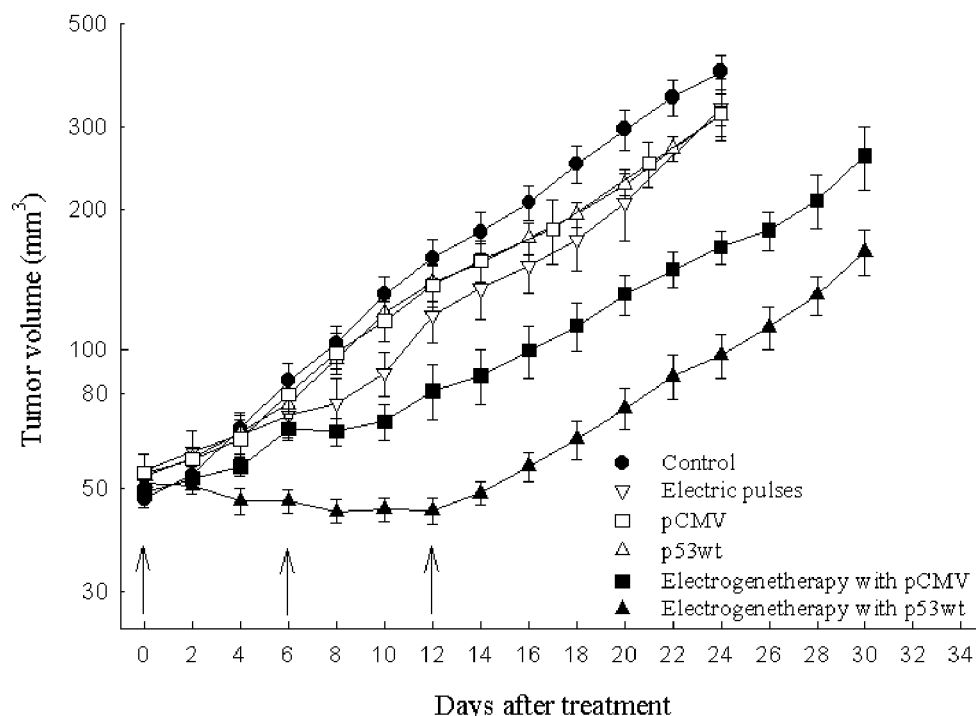


FIG. 7. Tumor growth curves of PC-3 prostatic carcinoma xenografts in nude mice treated by electrogenetherapy with *p53*wt and pCMV. Treatment was performed by intratumoral injection of the plasmid followed immediately by application of electric pulses to the tumors three times in an interval of 6 days (arrows). Data are AM $\pm$ SE pooled from six animals per group.

antitumor effectiveness on both primary tumors as well as on metastases (Rols *et al.*, 1998; Niu *et al.*, 1999; Heller *et al.*, 2000; Goto *et al.*, 2000; Lohr *et al.*, 2001; Matsubara *et al.*, 2001; Cichon *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2001; Mikata *et al.*, 2002; Shibata *et al.*, 2002; Tamura *et al.*, 2003). Antitumor effectiveness of electrogenetherapy with *p53*wt has been already demonstrated for head and neck human tumor xenografts and the PC-3 prostatic tumor model, the same as we have used in the present study (Matsubara *et al.*, 2001; Mikata *et al.*, 2002). The experimental protocol used in the study of Mikata *et al.* differed from ours. We used different parameters for electroporation (lower amplitude and longer pulses), different treatment schedule (treatment of tumors three times every 6th day instead of every 3rd day), and the plasmid DNA was injected immediately before application of electric pulses, not after application of electric pulses as in the study of Mikata *et al.* In that study, the growth of the tumors treated with electrogenetherapy with *p53*wt was slowed down and resulted in 5 day's growth delay compared to electrogenetherapy with pCMV. However, in our study, growth of the tumors treated with electrogenetherapy with *p53*wt was arrested during therapy and resulted in 8 day's growth delay. One possible reason for better antitumor effectiveness is that better transfection efficiency was obtained in our study, mainly due to the fact that DNA was present in the tumor during application of electric pulses. This has been shown in a recent study on CHO cells, showing that the DNA must be present during electroporation to obtain gene transfer (Golzio *et al.*, 2002). However, other parameters of electroporation, which are also responsible for

the transfection efficiency of the electroporation-assisted gene delivery, may also have influence on the treatment outcome. Furthermore, our results on electrogene therapy with *p53*wt are comparable to the results obtained with adenoviral-mediated *p53*wt delivery into the same tumor model; PC-3 prostatic tumors (Eastham *et al.*, 2000). In both studies, gene therapy reduced the tumor volume substantially compared to untreated control tumors; tumors were approximately four times smaller 3 and 4 weeks after the therapy.

Besides demonstration of feasibility of electrogenetherapy with *p53*wt in the tumors, our aim was also to evaluate electrogenetherapy with *p53*wt alone or combined with cisplatin on two colorectal carcinoma cells and two prostatic carcinoma cells with different *p53* status. We found that electrogenetherapy with *p53*wt was more effective in reducing cell survival in prostatic Du145 with heterozygous mutated *p53* and PC-3 cells with deleted *p53* than in colorectal carcinoma cells, HT-29 with homozygous overexpressed mutated *p53* and LoVo, which have wild-type *p53*. Our results are in accordance with the published studies on gene therapy with *p53*wt that presume that effectiveness of gene therapy with *p53*wt is dependent on *p53* status. These studies demonstrated that gene therapy with *p53*wt is effective in tumor cells with deleted or mutated *p53*. The results on Du145, PC-3, and LoVo cells confirm the results from the literature (Nielsen and Maneval, 1998). The only exception was the HT-29 cell line, where electrogenetherapy with *p53*wt was the least effective. HT-29 cells have homozygous mutation of *p53*, which is overexpressed. One possible reason for the failure of electrogenetherapy in HT-29 cells is that there was

not enough wild-type p53 in relation to mutated p53 to influence the growth of the cells or to induce apoptosis. The presence of mutated p53 may confer genomic instability and mutator ability, which allows cells to escape the effect of exogenous p53wt and contributes to the failure of p53wt gene therapy (Vinyals *et al.*, 1999).

The idea of combining chemotherapy and irradiation with forced expression of p53 wt is to increase the sensitivity of cells and tumors to these therapies. It is known that in cancer cells that genetically lost p53wt, the p53-dependent cellular apoptotic pathway can be blocked, so the cells fail to die despite of the chemotherapy or irradiation (Nielsen and Maneval, 1998; Zeimet *et al.*, 2000). On the other hand, there is increasing evidence that apoptosis and genes controlling it, such as p53 and bcl-2, appear to play little or no role in the sensitivity of these cells to killing by chemotherapy or irradiation (Brown and Wouters, 1999). Our results on the cytotoxicity of cisplatin in the cell lines showed that p53 status does not influence the cisplatin cytotoxicity, and thus confirm the notion that p53 does not play a role in sensitivity of cancer cells to chemotherapy. Specifically, we observed that cisplatin cytotoxicity was more pronounced in p53 null PC-3 cells than in cells that have p53wt (LoVo) and those that have mutated p53 (Du145 and HT-29). Furthermore, addition of cisplatin to electroporated cells resulted in additive interaction in all cell lines regardless of the p53 status and the presence of exogenous wild-type p53. The effect was, however, more pronounced in LoVo cells, which have p53wt. The reason for the observed effect is currently not known, and further studies are warranted.

In conclusion, our study showed that electrogenetherapy with p53wt is feasible, and results in comparable cytotoxic effect to viral-mediated p53wt gene delivery. This therapy was effective and dependent on the p53 status of the cell lines used. Combination of electrogenetherapy and cisplatin resulted in additional cell kill by cisplatin and was not dependent on the p53 status in these cell lines. The antitumor effectiveness of electrogenetherapy with p53wt on PC-3 prostatic human tumor xenografts was also demonstrated.

ACKNOWLEDGEMENT

This work was supported by the Ministry of Education, Science and Sport of the Republic of Slovenia, and CNRS, France-MSZS, Slovenia exchange program. We would like to thank M. Rokavec for excellent technical assistance, the staff of the Service Commun d'Expérimentation Animale (M. P. Ardouin) for housing the mice, and E. Connault for the histological processing of the tumors. We gratefully acknowledge the EU commission for the support of M.C., L.M.M., F.A. and G.S. through the project Cliniporator QLK3-1999-00484.

REFERENCES

- BAKER, S.J., MARKOWITZ, S., FEARON, E.R., WILLSON, J.K., and VOGELSTEIN, B. (1990). Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science* **249**, 912-915.
- BROWN, J.M., and WOUTERS, B.G. (1999). Apoptosis, p53, and tumor cell sensitivity to anticancer agents. *Cancer Res.* **59**, 1391-1399.
- BULLER, R.E., RUNNEBAUM, I.B., KARLAN, B.Y., HOROWITZ, J.A., SHAHIN, M., PETRAUSKAS, S., KREIENBERG, R., SLAMON, D., PEGRAM, M., and BUEKERS, T. (2002). A phase I/II trial of rAd/p53 (SCH 58500) gene replacement in recurrent ovarian cancer. *Cancer Gene Ther.* **7**, 553-566.
- BULLOCK, A., and FERSHT, A. (2001). Rescuing the function of mutant p53. *Nat. Rev. Cancer* **1**, 68-76.
- CEMAZAR, M., SERSA, G., WILSON, J., TOZER, G.M., HART, S.L., GROSEL, A., and DACHS, G.U. (2002). Effective gene transfer to solid tumors using different non-viral gene delivery techniques: Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Ther.* **9**, 399-406.
- CICHON, T., JAMROZY, L., GLOGOWSKA, J., MISSOL-KOLKA, E., and SZALA, S. (2002). Electrotransfer of gene encoding endostatin into normal and neoplastic mouse tissues: Inhibition of primary tumor growth and metastatic spread. *Cancer Gene Ther.* **9**, 771-777.
- CLAYMAN, G.L., EL-NAGGAR, A.K., LIPPMAN, S.M., HENDERSON, Y.C., FREDERICK, M., MERRITT, J., ZUMSTEIN, L.A., TIMMONS, T.M., LIU, T.J., GINSBERG, L., *et al.* (1998). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in patients with advanced recurrent head and neck squamous cell carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **12**, 3155-3157.
- CLAYMAN, G.L., FRANK, D.K., BRUSO, P.A., and GOEPFERT, H. (1999). Adenovirus-mediated wild-type p53 gene transfer as a surgical adjuvant in advanced head and neck cancers. *Clin. Cancer Res.* **5**, 1715-1722.
- DOLIVET, G., MERLIN, J.L., BARBERI-HEYOB, M., RAMACCI, C., ERBACHER, P., PARACHE, R.M., BEHR, J.P., and GUILLEMIN, F. (2002). In vivo growth inhibitory effect of iterative wild-type p53 gene transfer in human head and neck carcinoma xenografts using glucosylated polyethylenimine nonviral vector. *Cancer Gene Ther.* **8**, 708-714.
- EASTHAM, J.A., GRAFTON, W., MARTIN, C.M., and WILLIAMS, B.J. (2000). Suppression of primary tumor growth and the progression to metastasis with p53 adenovirus in human prostate cancer. *J. Urol.* **164**, 814-819.
- GALANIS, E., and RUSSELL, S. (2001). Cancer gene therapy clinical trials: Lessons for the future. *Br. J. Cancer* **85**, 1432-1436.
- GEHL, J. (2003). Electroporation: Theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. *Acta Physiol. Scand.* **177**, 437-447.
- GILBERT, R., JAROSZESKI, M.J., HELLER, L., and HELLER, R. (2002). Electric field enhanced plasmid delivery to liver hepatocellular carcinomas. *Technol. Cancer Res. Treat.* **5**, 355-364.
- GOLZIO, M., TEISSIE, J., and ROLS, M.P. (2002). Direct visualization at the single-cell level of electrically mediated gene delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 1292-1297.
- GOTO, T., NISHI, T., TAMURA, T., DEV, S.B., TAKESHIMA, H., KOCHI, M., YOSHIZATO, K., KURATSU, J., SAKATA, T., HOFMANN, G.A., *et al.* (2000). Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 354-359.
- HELLER, L., POTTINGER, C., JAROSZESKI, M.J., GILBERT, R., and HELLER, R. (2000). In vivo electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumor immunity. *Melanoma Res.* **10**, 577-583.
- HOLLSTEIN, M., SIDRANSKY, D., VOGELSTEIN, B., and HARRIS, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* **253**, 49-53.
- JAROSZESKI, M.J., HELLER, R., and GILBERT, R. (2000). Electrochemotherapy, electrogenetherapy and transdermal drug delivery. Clifton, NJ: Humana Press.
- KUBALL, J., WEN, S.F., LEISSNER, J., ATKINS, D., MEINHARDT, P., QUIJANO, E., ENGLER, H., HUTCHINS, B., MANEVAL, D.C., GRACE, M.J., *et al.* (2002). Successful adenovirus-mediated

- wild-type p53 gene transfer in patients with bladder cancer by intravesical vector instillation. *J. Clin. Oncol.* **20**, 957–965.
- LANG, F.F., BRUNER, J.M., FULLER, G.N., ALDAPE, K., PRA-DOS, M.D., CHANG, S., BERGER, M.S., MCDERMOTT, M.W., KUNWAR, S.M., JUNCK, L.R., *et al.* (2003). Phase I trial of adenovirus-mediated p53 gene therapy for recurrent glioma: Biological and clinical results. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2508–2518.
- LI, S., ZHANG X., XIA, X., ZHOU, L., BREAU, R., SUEN, J., and HANNA, E. (2001). Intramuscular electroporation delivery of IFN- α gene therapy for inhibition of tumour growth located at a distant site. *Gene Ther.* **8**, 400–407.
- LOHR, F., LO, D.Y., ZAHAROFF, D.A., HU, K., ZHANG, X., LI, Y., ZHAO, Y., DEWHIRST, M.W., YUAN, F., and LI, C.Y. (2001). Effective tumor therapy with plasmid-encoded cytokines combined with in vivo electroporation. *Cancer Res.* **61**, 3281–3284.
- MAKOWER, D., ROZENBLIT, A., KAUFMAN, H., EDELMAN, M., LANE, M.E., ZWIEBEL, J., HAYNES, H., and WADLER, S. (2003). Phase II clinical trial of intralesional administration of the oncolytic adenovirus ONYX-015 in patients with hepatobiliary tumors with correlative p53 studies. *Clin. Cancer Res.* **9**, 693–702.
- MATSUBARA, H., MAEDA, M., GUNJI, Y., KOIDE, Y., ASANO, T., OCHIAI, T., SAKIYAMA, S., and TAGAWA, M. (2001). Combinatory anti-tumor effects of electroporation-mediated chemotherapy and wild-type p53 gene transfer to human esophageal cancer cells. *Int. J. Oncol.* **18**, 825–829.
- MIYAKE, H., HARA, I., GOHJI, K., YAMANAKA, K., ARAKAWA, S., and KAMIDONO, S. (1998). Enhancement of chemosensitivity in human bladder cancer cells by adenoviral-mediated p53 gene transfer. *Anticancer Res.* **18**, 3087–3092.
- MIKATA, K., UEMURA, H., OHUCHI, H., OHTA, S., NAGASHIMA, Y., and KUBOTA, Y. (2002). Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of p53 gene: Gene transfer by electroporation. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 247–252.
- NARIMATSU, M., NAGAYAMA, Y., AKINO, K., YASUDA, M., YAMAMOTO, T., YANG, T.T., OHTSURI, A., NAMBA, H., YAMASHITA, S., AYABE, H., *et al.* (1998). Therapeutic usefulness of wild-type p53 gene introduction in a p53-null anaplastic thyroid carcinoma cell line. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **83**, 3668–3672.
- NEMUNAITIS, J., GANLY, I., KHURI, F., ARSENEAU, J., KUHN, J., MCCARTY, T., LANDERS, S., MAPLES, P., ROMEL, L., RANDLEV, B., *et al.* (2000a). Selective replication and oncolysis in p53 mutant tumors with ONYX-015, an E1B-55kD gene-deleted adenovirus, in patients with advanced head and neck cancer: A phase II trial. *Cancer Res.* **60**, 6359–6366.
- NEMUNAITIS, J., SWISHER, S.G., TIMMONS, T., CONNORS, D., MACK, M., DOERKSEN, L., WEILL, D., WAIT, J., LAWRENCE, D.D., KEMP, B.L., *et al.* (2000b). Adenovirus-mediated p53 gene transfer in sequence with cisplatin to tumors of patients with non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **18**, 609–622.
- NEUMANN, E., and ROSENHECK, K. (1972). Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *J. Membr. Biol.* **10**, 279–290.
- NGUYEN, D., SPITZ, F., YEN, N., CRISTIANO, R., and ROTH, J. (1996). Gene therapy for lung cancer: Enhancement of tumor suppression by a combination of sequential systemic cisplatin and adenovirus-mediated p53 gene transfer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **112**, 1372–1377.
- NIELSEN, L.L., and MANEVAL, D.C. (1998). P53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Cancer Gene Ther.* **5**, 52–63.
- NIU, G., HELLER, R., CATLETT-FALCONE, R., COPPOLA, D., JAROSZESKI, M., DALTON, W., JOVE, R., and YU, H. (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res.* **59**, 5059–5063.
- O'CONNOR, P.M., JACKMAN, J., BAE, I., MYERS, T.G., FAN, S., MUTOH, M., SCUDIERO, D.A., MONKS, A., SAUSVILLE, E.A., WEINSTEIN, J.N., *et al.* (1997). Characterization of the p53 tumour suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* **57**, 4285–4300.
- PAGLIARO, L.C., KEYHANI, A., WILLIAMS, D., WOODS, D., LIU, B., PERROTTE, P., SLATON, J.W., MERRITT, J.A., GROSSMAN, H.B., and DINNEY, C.P. (2003). Repeated intravesical instillations of an adenoviral vector in patients with locally advanced bladder cancer: A phase I study of p53 gene therapy. *J. Clin. Oncol.* **21**, 2247–2253.
- PUC, M., FLISAR, K., REBERSEK, S., and MIKLAVCIC, D. (2001). Electroporation for in vitro cell permeabilization. *Radiol. Oncol.* **35**, 203–207.
- ROLS, M.P., DELTEIL, C., GOLZIO, M., DUMOND, P., CROS, S., and TEISSIE, J. (1998). In vivo electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat. Biotechnol.* **16**, 168–171.
- ROTH, J.A., NGUYEN, D., LAWRENCE, D.D., KEMP, B.L., CAR-RASCO, C.H., FERSON, D.Z., HONG, W.K., KOMAKI, R., LEE, J.J., NESBITT, J.C., *et al.* (1996). Retrovirus-mediated wild-type p53 gene transfer to tumors of patients with lung cancer. *Nat. Med.* **2**, 985–991.
- ROTH, J.A., SWISHER, S.G., and MEYN, R.E. (1999). p53 tumor suppressor gene therapy for cancer. *Oncology (Huntingt)* **13**, 148–154.
- RUBIN, S.J., HALLAHAN, D.E., ASHMAN, C.R., BRACHMAN, D.G., BECKETT, M.A., VIRUDACHALAM, S., YANDELL, D.W., and WEICHSELBAUM, R.R. (1991). Two prostate carcinoma cell lines demonstrate abnormalities in tumour suppressor genes. *J. Surg. Oncol.* **46**, 31–36.
- SERSA, G., CEMAZAR, M., and RUDOLF, Z. (2003). Electrochemotherapy: Advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Ther.* **1**, 133–142.
- SHIBATA, M., MORIMOTO, J., and OTSUKI, Y. (2002). Suppression of murine mammary carcinoma growth and metastasis by HSVtk/GCV gene therapy using in vivo electroporation. *Cancer Gene Ther.* **1**, 16–27.
- SHONO, T., TOFILON, P.J., SCHAEFER, T.S., PARIKH, D., LIU, T.J., and LANG, F.F. (2002). Apoptosis induced by adenovirus-mediated p53 gene transfer in human glioma correlates with site-specific phosphorylation. *Cancer Res.* **62**, 1069–1076.
- SWISHER, S.G., ROTH, J.A., KOMAKI, R., GU, J., LEE, J.J., HICKS, M., RO, J.Y., HONG, W.K., MERRITT, J.A., AHRAR, K., *et al.* (2003). Induction of p53-regulated genes and tumor regression in lung cancer patients after intratumoral delivery of adenoviral p53 (INGN 201) and radiation therapy. *Clin. Cancer Res.* **9**, 93–101.
- TAMURA, T., NISHI, T., GOTO, T., TAKESHIMA, H., USHIO, Y., and SAKATA, T. (2003). Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth. *Anticancer Res.* **23**, 1173–1179.
- VINYALS, A., PEINADO, M., GONZALEZ-GARRIGUES, M., MONZO, M., BONFIL, R. and FABRA, A. (1999). Failure of wild-type p53 gene therapy in human cancer cells expressing a mutant p53 protein. *Gene Ther.* **6**, 22–33.
- YANG, C., CIRIELLI, C., CAPOGROSSI, M.C., and PASSANITI, A. (1995). Adenovirus-mediated wild-type p53 expression induces apoptosis and suppresses tumorigenesis of prostatic tumor cells. *Cancer Res.* **55**, 4210–4213.
- ZEIMET, A.G., RIHA, K., BERGER, J., WIDSCHWENDTER, M., HERMANN, M., DAXENBICHLER, G., and MARTH, C. (2000). New insights into p53 regulation and gene therapy for cancer. *Biochem. Pharmacol.* **8**, 1153–1163.

Address reprint requests to:
Maja Cemazar, Ph.D.
Institute of Oncology
Zaloska 2
SI-1000 Ljubljana, Slovenia

E-mail: mcemazar@onko-i.si

Revue 1

REVIEW

DNA electrotransfer: its principles and an updated review of its therapeutic applications

F André and LM Mir

Laboratory of Vectorology and Gene Transfer, UMR 8121 CNRS – Institut Gustave-Roussy, Villejuif Cedex, France

The use of electric pulses to transfect all types of cells is well known and regularly used in vitro for bacteria and eukaryotic cells transformation. Electric pulses can also be delivered in vivo either transcutaneously or with electrodes in direct contact with the tissues. After injection of naked DNA in a tissue, appropriate local electric pulses can result in a very high expression of the transferred genes. This manuscript describes the evolution in the concepts and the various

optimization steps that have led to the use of combinations of pulses that fit with the known roles of the electric pulses in DNA electrotransfer, namely cell electroporation and DNA electrophoresis. A summary of the main applications published until now is also reported, restricted to the in vivo preclinical trials using therapeutic genes.

Gene Therapy (2004) 11, S33–S42. doi:10.1038/sj.gt.3302367

Keywords: electrogenotherapy; DNA electrotransfer; nonviral gene therapy; electroporation; electroporation; electroporation; naked DNA

Introduction

Nonviral gene therapy using the combination of ‘physical’ approaches and naked DNA is rapidly developing for two main reasons: the use of naked DNA eliminates the limitations and the risks linked to the use of viruses (coding sequence length in the case of the adenovirus associated virus, insertional mutagenesis in the case of the retrovirus, immunological responses in the case of the adenoviruses, etc) and, in spite of extensive research, efficient and safe chemical vectors have not yet been developed for *in vivo* gene delivery.

There are several physical approaches for nonviral gene therapy. (i) The simplest, of course, is the injection of naked DNA, which in the skeletal or cardiac muscle leads to some expression of the injected genes;^{1–3} however, this expression is very low and very variable from sample to sample. (ii) The hydrodynamic method consists in the very rapid injection through the mouse tail vein of a large volumes of DNA solution: it results in a very efficient transfection of liver cells, even though the procedure is somehow dangerous for the treated mice;^{4–6} indeed, part of the mechanism is based on the transient heart failure resulting from the injection, which blocks the fluid distribution in the body and provokes a liquid overpressure in the liver.⁶ (iii) For physical DNA transfer to superficial tissues like the skin or the leaves in the plant kingdom, the ‘biolistic’ approach (‘jet injection’ and ‘gene gun’) also leads to good transfection levels. The commonly termed ‘gene gun’ consists in a device propelling plasmid-coated gold microparticles.^{7,8} For the ‘jet injection’ or ‘needle-free’ injection, the DNA is pushed at high pressure and high speed through a tiny

orifice at the head of the injector, creating an ultrafine stream of high-pressure fluid that penetrates the skin.^{9,10} (iv) The proof of the concept of sonoporation (use of focused ultrasounds to permeate the cells) has just been developed and still requires further elaboration.¹¹ (v) DNA electrotransfer has been used with success since 1998 and is becoming a real alternative to the viral methods for *in vivo* gene transfer.

The use of electric pulses is very popular for the transfection of bacterial and eukaryotic cells *in vitro*. The initial limitation of the so-called electroporation, a low cell survival, could be overcome by the use of appropriate electric pulses. The technique was then transferred *in vivo*, and termed DNA electrotransfer or electrogenotherapy. In this article, we present an historical survey of this approach, which will include the description of the bases of cell electroporation and DNA electrotransfer, as well as several consecutive optimization efforts that have led to a very efficient and safe procedure. A summary of the main applications published until now is also reported, restricted to the *in vivo* preclinical trials using therapeutic genes.

The origin of DNA electrotransfer (the *in vitro* only period)

The first pioneering demonstration that DNA could be introduced into living cells by means of electric pulses was published by E Neumann in 1982.¹² He built a device with chambers specifically designed for the pulse delivery to the suspension of cells and DNA. More than 2 years were necessary before the publication of the second paper describing successful transfer of DNA to eukaryotic cells *in vitro* by H Potter in 1984.¹³ Since this result

was achieved using a classical (thus accessible) laboratory equipment, the ISCO 494 generator for proteins and DNA gel electrophoresis, many other groups could try this approach. The procedure consisted in creating a short circuit through the cell suspension, which caused the delivery of an exponentially decaying electric pulse to the cells. Since then, devices delivering exponentially decaying pulses have been developed by various companies.¹⁴ However, already in 1985, J Teissié developed the first square wave pulse generator with outputs compatible with the needs for cell electroporation in *vitro*.¹⁵ In any case, since 1986, DNA electrotransfer is the most popular way to transfect bacterial cells and one of the good options for the *in vitro* transfection of eukaryotic cells as well.

Principles of the DNA electrotransfer

The exposure of living cells to short and intense electric pulses induces position-dependent changes in the transmembrane potential difference. These changes are well described by the equation of Schwann, which indicates that the value of the induced change is proportional to the cell radius and the scalar value of the external electric field (Figure 1). This change will superimpose to the resting transmembrane potential. When the transmembrane potential difference net value (the sum of the vectorial values of the induced and resting potential differences) is greater than 0.2–0.4 V, transient permeation structures are generated at the cell membrane level, because the membrane structure cannot resist the electrocompressive forces due to this potential difference. Electroporation is thus a threshold phenomenon, imposed by the need to overpass a threshold value of the transmembrane potential difference.

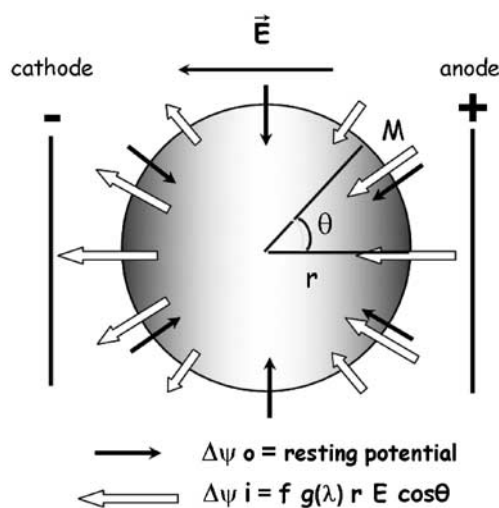


Figure 1 Effect of an external electric field applied on a living cell. The external electric field induces a change ($\Delta\psi_i$) in the resting transmembrane potential ($\Delta\psi_o$) of the cell. The value of the induced change depends on the shape of the cell (f) and the conductivity of the media $g(\lambda)$. At point M on the cell surface, it is also proportional to the cell radius (r), the scalar value of the external electric field (E) and the cosine of the angle θ (polar coordinate of point M).

The structure of these transient permeation structures is not yet elucidated. Some models proposed the generation of 'electropores' (described as 'holes' in the membranes), but cell electroporation can be totally reversible and the theory hardly explains the resealing of these 'electropores'. Recent modelization by molecular dynamics¹⁶ has suggested that under transmembrane potential differences, much larger than those necessary to obtain the 'physiological' reversible cell electroporation, pores could indeed be generated. Still, the reversible structure remains undefined.

Properties of cell electroporation: cell membrane crossing

Cell electroporation is a general phenomenon that can be obtained in the cells of archaeobacteria, eubacteria and eucaryota phyla. Indeed, all living cells are limited by a nonconductive membrane that isolates the internal conductive medium from the external medium. Thus, all cells will react to external electric fields by the induction of a transmembrane potential difference that, above a threshold value, will provoke the membrane destabilization. Under appropriate electrical parameters, this destabilization will be totally reversible, ensuring the survival of the transiently permeabilized cell. Owing to the use of very short pulses, cell electroporation is a nonthermal phenomenon: this characteristic contributes to its reversibility (no denaturation of the membrane proteins, even though one of the cell electroporation early models, which was not validated, considered protein denaturation as the *primum movens* of the membrane properties changes).¹⁷ Finally, the most interesting property of the cell electroporation, which supports several biomedical and biotechnological applications, is the fact that cell electroporation allows the direct delivery of nonpermeant molecules inside the cell cytoplasm, bypassing the normal internalization route for these molecules (usually the endocytosis pathway). Small nonpermeant molecules can enter the electroporated cells by diffusion through the transiently permeabilized cell membrane, while large nonpermeant molecules like DNA enter by other mechanisms as discussed below.

In vivo delivery of electric pulses

Before the *in vivo* delivery of electric pulses in the frame of the electrogenotherapy, other applications of the *in vivo* cell electroporation were developed. In 1989 and 1990, Grasso *et al*¹⁸ Grasso and Heller¹⁹ applied electric pulses *in vivo* to rabbit cornea, in order to fuse human Hela cells to the cells of the cornea. Cell electrofusion, *in vitro*, is the consequence of the electroporation of two adjacent cells or of the fact that two previously electroporated cells are brought in close contact. In 1988, it was found that bleomycin toxicity is several hundreds of thousands times higher on electroporated cells than on cells unexposed to the electric pulses.²⁰ This increase in toxicity was also found in preclinical experiments in which permeabilizing electric pulses were delivered transcutaneously to

transplanted²¹ or spontaneous tumours in mice.²² Moreover, because of the antitumour efficacy of this approach, clinical trials were rapidly performed.^{23,24} This approach was termed electrochemotherapy, and the pulse conditions, used in almost all the published clinical trials,^{25–27} were eight identical square wave pulses of 100 μ s and 1300 V/cm at a repetition frequency of 1 Hz using external electrodes (transcutaneous pulses). These trials demonstrated that it is possible to deliver *in vivo* electric pulses to animals and patients and they greatly facilitated the development of the *in vivo* DNA electrotransfer.

Indeed, in parallel, Jon Wolff showed in 1990¹ that direct injection of naked DNA in skeletal muscle *in vivo* results in gene expression at low and variable levels. Thus, it seemed tempting to combine the injection of DNA and the electric pulses delivery.

In 1991, Titomirov *et al*²⁸ delivered exponentially decaying short pulses to skin after myc and ras genes injection and they were able to recover a few growing cells expressing myc and ras proteins that could, eventually, reflect the *in vivo* electrotransfer of these oncogenes. In 1996, Heller *et al*²⁹ delivered electrochemotherapy-type trains of short pulses (100 μ s) to the liver after the injection of reporter genes DNA, with good levels of transfection that nowadays could also be partly explained by the injection itself, taking into account the results of the hydrodynamics method. In 1998, four groups, in three different tissues, consistently demonstrated good transfection levels using long pulses (5–50 ms): MP Rols and J Teissie in tumours,³⁰ Suzuki *et al* in the liver,³¹ and Aihara and Miyazaki,³² and Mir *et al*³³ in the skeletal muscle. The use of trains of several identical pulses in the milliseconds to tens of milliseconds duration range actually results in a highly significant increase in the level of expression of the reporter genes coded by the naked DNA injected in the target tissues. Later on, Lucas and Heller³⁴ compared short and long pulses, demonstrating that the level of expression was higher, and expression duration longer, when long pulses were delivered into the tissues.

Use of trains of identical electric pulses for efficient DNA electrotransfer in skeletal muscle

The earliest and most exhaustive series of experiments allowing to understand the mechanisms of DNA electrotransfer as well as to optimize such trains of identical electric pulses were reported in 1999.³⁵ Experiments analysed the respective influence of the pulse duration, voltage applied (or more precisely of the applied voltage to electrodes distance ratio), number of pulses and repetition frequency. Using the gene coding for the firefly luciferase, an increase of 200 times of the expression with respect to the naked DNA injection alone was shown, a large decrease in the variability of this expression, as well as a long-term expression since the high level of expression remained stable for at least 9 months. In the mouse skeletal muscle, using external electrodes (transcutaneous electric pulses) and trains of identical electric pulses, optimal conditions are eight pulses of 20 ms and 200 V/cm at a repetition frequency

of 1 or 2 Hz, delivered after the intramuscular injection of the DNA).^{36,37} These conditions have been adapted to other tissues: in tumours, transfection levels that depended on the tumour type were found maximal using eight identical pulses of 20 ms and 500 or 600 V/cm at a repetition frequency of 1 or 2 Hz,³⁸ 250 V/cm in the liver,³⁹ and 500 or 750 V/cm for the skeletal muscle in neonate mice (7–10 days old mice).⁴⁰

Roles of the electric pulses in DNA electrotransfer

Experiments showed that, after the electric pulses delivery, tissues remain permeabilized for several minutes.^{35,41,42} Moreover, for an efficient transfer, DNA must be injected before the electric pulses delivery. Thus, permeabilization of the cells is not sufficient even though it is necessary since efficient electrotransfer requires sufficiently intense electric fields (above cell permeabilization threshold).^{36,37} Moreover, efficient electrotransfer requires sufficiently long pulses. The mechanism of DNA electrotransfer could not be just cell electropermeabilization and DNA diffusion through the permeabilized plasma membrane.

The role of the electric pulses in DNA electrotransfer has then been studied using combinations of pulses. Instead of delivering trains of eight identical pulses (of 20 ms and 200 V/cm, at a repetition frequency of 1 Hz), cells were exposed to:

- 1 HV (high voltage, short pulse) of 100 μ s at 800 V/cm (an electrochemotherapy-like pulse, with a field strength adapted to the skeletal muscle, the muscle fibres having a diameter larger than the average diameter of the tumour cells; using eight of such pulses at 1 Hz repetition frequency, Gehl *et al*³⁷ showed that this field strength was the highest that one could deliver to the muscle fibres without provoking their irreversible electropermeabilization).
- 1 or several LV (low voltage, long pulse) of 100 ms at 80 V/cm (nonpermeabilizing pulses, of a field intensity below the threshold for reversible permeabilization in the mice skeletal muscle).⁴³

followed by

The first experiments were performed using two classical square wave generators, with LV of 83 ms, a limitation imposed by the devices used, and a manual switch to deliver the LV(s) after the HV.⁴³ Then a device for the controlled generation of such combinations of HV and LV pulses, with, moreover, a controlled gap between the HV and LV pulses, was prepared by the Faculty of Electrical Engineering of the University of Ljubljana, based on a previously developed electroporator.⁴⁴ With such an equipment, the roles of the electric pulses in DNA electrotransfer could actually be analysed.

The efficacy of several combinations of pulses (1 HV alone, or 1 HV followed by 1 LV, or 1 HV followed by 4 LV) was compared.⁴² It was shown that the duration of the high permeabilized state of the muscle fibres was the same for the three combinations tested, all of them including the same HV pulse. On the contrary, the authors found that efficacy was only achieved if at least



Figure 2 The Cliniporator. This new pulse generator (Cliniporator™, IGEA s.r.l., Carpi, Italy) has been developed within the Cliniporator project (QLK3-1999-00484) of the 5th Framework Program of the European Union. It delivers combinations of HV and LV pulses.

an LV was delivered after the HV. They also reported that the efficacy of a single LV could be observed even if this LV was delivered up to 100 s after the HV, while in the case of the delivery of 4 LV, efficacy could be achieved even if the 4 LV were delivered up to 3000 s after the HV. Since almost no efficacy was found with the LV alone, the conclusions of the authors were that the HV pulses delivery (permeabilizing pulses) were mandatory, but that the efficacy of the procedure was brought by the LV pulses. Other arguments have contributed to point out that the long LV pulses act on DNA, provoking its electrophoretic displacement.⁴⁵

The electric pulses thus have two roles, the 'electroporation' of the target cells and the electrophoretic transport of the DNA 'towards or across' the cell membrane. Target cell electroporation is mandatory, but the electrophoretic component of the electric pulses is actually instrumental in DNA electrotransfer efficacy.

These combinations have been studied within the Cliniporator project (QLK3-1999-00484) of the 5th Framework Program of the European Union. Moreover, a new pulse generator (Cliniporator™, IGEA s.r.l., Carpi, Italy), able to deliver these combinations of pulses, has been developed within this project (Figure 2). In the skeletal muscle and the skin, appropriate pulses parameters have led to a further increase of the expression of the luciferase coding plasmid with almost no histological modification.

Interests of DNA electrotransfer

In vitro, DNA electrotransfer is interesting because it is based on cell electroporation, which is the perturbation of cell membrane impermeability by physical means, with neither addition nor withdrawal of membrane components as it happens when chemical permeabilization means are used. Thus, full recovery is facilitated. Moreover, if actually controlled, cell electroporation is a nonthermal effect, without protein

denaturation (which also facilitates cell recovery). Moreover, the method is simple, since it only requires to mix the cells and the DNA and to pulse the mixture.

In vivo, DNA electrotransfer is also interesting because it allows the transfer of genes into tissues without using virus. Moreover, no chemical method works *in vivo* better than the direct electrotransfer of the naked DNA. The method is also very rapid: the new constructs made by usual molecular biology approaches can be amplified by rapid 'minipreparations' of DNA and quantified by optical density determination; then it is sufficient to adjust plasmid concentration, to inject, and to 'pulse' (with viral methods, constructs must be inserted in a viral background, transfected in producing cells, and then virions must be produced, collected, isolated, concentrated and titrated before they could be injected).

Therapeutic applications already developed in preclinical trials

Tables 1 and 2 summarize the result of an extensive search for publications reporting the *in vivo* delivery of genes of therapeutic interest by means of DNA electrotransfer. Publications using only reporter genes have not been included in the tables. Experiments have been classified according to the main applications foreseen by their authors.

Most of the experiments deal with gene transfer to the skeletal muscle in mice. However, gene transfer to tumours, brain, lumbar intrathecal space, skin, liver, cornea, brain, penile corpora cavernosa and seminiferous tubes have also been reported. Experiments, mainly in mice (about 80% of the publications) have also been performed in rats, pigs, rabbits, guinea pigs, sheep, goats, dogs and cattle. These experiments also demonstrate the safety of the procedure, the possibility to repeat the treatment (shown already in 1999 by Rizzutto *et al*¹²⁰), as well as the possibility to coelectrotransfer up to three plasmids into the same skeletal muscle fibres.⁸⁵ The main general application is Immunotherapy (48%; 54/113). Cancer treatment (38%; 43/113), metabolic disorders or metabolism modification (17%; 19/113) and correction of organ or site-specific diseases (14%; 16/113) are the three other frequent applications. Monogenetic diseases (9%; 10/113), cardiovascular diseases (9%; 10/113) and analgesia (2%; 2/113) are other applications also found in the literature.

It must be noted that each of these applications includes the use of a large variety of genes. In this respect, it is necessary to point out that the genes of proteins involved in the immune system responses have been the most usually transferred genes for vaccination, cancer, treatment of arthritis, immunological protocols, etc. These genes include those coding for the IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, IL-18, IL-18 binding protein, soluble TNF receptor, GM-CSF, tumour epitopes, the HIV gag gene, recombinant monoclonal antibodies, mycobacterial antigens, etc. The details are listed in the Table 2. In fact, this observation must be related to the fact that in many cases the transfected tissue is the skeletal muscle, used as a cell factory for the production of factors that will act systemically on distant targets.

Therapeutic levels have been achieved. For example, in the case of the gene coding for the erythropoietin

**Table 1** Applications of the *in vivo* delivery of genes of therapeutic interest by means of DNA electrotransfer

Applications ^a	Diseases ^a	Genes	Tissues	Animals	Ref.
Analgesia 2 Cancer 43	Analgesia 2 Cancer 43	POMC (proopiomelanocortin) IL-2; IL-12; IL-18; INF α ; GM-CSF; CpG containing DNA; full TRP-2 or epitopes; diphtheria toxin; HSV TK; TIMP; p53; bcl-xs; MBD-2; antisens VEGF; Flk-1 VEGF receptor; metargidine (MDC-15); Stat3 variant; K1-5; K1-3-HAS; endostatin	Intrathecal space Muscle, tumour, skin, liver	Rat Mouse, rat	46, 47 34, 48–87, 101, 102
Cardiovascular diseases 10	Atherosclerosis 2 Ischaemia 4 Myocarditis 4 See Table 2	IL-12; Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase (PAF-AH) IL-10; IL-18; NF- κ B binding sites containing DNA; hVEGF-A and hVEGF-B, protein-disulfide isomerase IL1- α ; IL-10 See Table 2	Muscle Muscle, right hippocampus Muscle See Table 2	Mouse Mouse, rat Mouse, rat See Table 2	88, 89 90–93 94–97
Immuno-therapy 54 Metabolic disorders 19	Anaemia 10 Diabetes 6	Epo; dimeric erythropoietin fusion protein IL-4; insulin precursors; codelivery of B7-1 and PPins or CEA; IGF-I	Muscle, skin Muscle	Mouse, rat Mouse	113–122 123–128
Monogenetic diseases 10	Neuropathy 1 Thrombocytopenia 2 β -Thalassemia 2 Haemophilia B 1 Mucopolysaccharidosis 1 Myodystrophy 5	NT3 neurotrophin3 Recombinant human thrombopoietin (rhTpo) Epo Factor IX IDS (iduronate-2-sulphatase) Dystrophin or minidystrophin; laminin α 2; GA-binding protein	Muscle Muscle Muscle Muscle Muscle Muscle	Mouse Mouse Mouse Mouse, dog Mouse Mouse	129 130, 131 132, 133 134 135 136–140
Organ- or tissue-specific diseases 16	Neuron degeneration 1 Arthritis 6 Bone formation 1 Bronchopulmonary hyperreactivity 1 Erectile dysfunction 1 Gastric disorders 1 Kidney regeneration 1 Liver regeneration 2 Muscle regeneration 2 Ocular diseases 1 Spermatogenesis rescue 1	Cardiostrophin IL-10; POMC (proopiomelanocortin); soluble TNF Receptor BMP-4 IL-10 Neuronal NOS (nitric oxide synthase), penile NOS Gastrin HGF HGF IGF-1 Human tPA (tissue plasminogen activator) Stem cell factor (SCF) cytoplasmic domain	Muscle Muscle Muscle Muscle Penile corpora cavernosa Muscle Muscle Muscle Muscle Corneal endothelium Seminiferous tubules	Mouse Mouse, rat Mouse Mouse Rat Mouse, rat Rat Mouse, rat Mouse Rat Mouse	40 95, 141–145 146 112 147 148 149 150, 151 128, 152 153 154

^aNumber in bold letters corresponds to the number of publications concerning the application or disease.

Table 2 Details of the applications involving immune system-related genes (cytokines, antigens, etc)

Applications ^a	Diseases ^a	Genes	Tissues	Animals	Ref.
Cancer 27	Cancer 27	IL-2; IL-12; IL-18; INF α ; CpG containing DNA; GM-CSF; FLT3-L; Rlakt; TRP-2 or epitopes	Muscle, tumour, skin	Mouse	34, 48–70, 76, 101, 102
Cardiovascular diseases 7	Atherosclerosis 1 Ischaemia 2	IL-12 IL-10; IL-18	Muscle	Mouse	88
Metabolic disorders 2	Myocarditis 4	IL-1-ra; IL-10	Muscle	Mouse	88, 90
Organ- or tissue-specific diseases 6	Diabetes 2	IL-4; Codelivery of B7-1 or B7-1wa	Muscle, rat	Mouse, rat	94–97
	Bronchopulmonary hyperreactivity 1	IL-10	Muscle	Mouse	123, 125
	Arthritis 5	IL-10; soluble p75 TNF receptor linked to the Fc portion of human IgG1 (sTNFR-Fc)	Muscle	Mouse, rat	112
Vaccination 12		INF α ; HBsAg; HA influenza virus; HIV gag; Japanese encephalitis virus; mycobacterial antigens; recombinant mAb; chains of the Tg10 mouse mAb; chimeric hepatitis C virus env2 glycoprotein; Blo t3	Muscle, skin	Mouse, pig, sheep, goats, cattle, rabbit, guinea pig	95, 142–145 98–100, 103–111

^aNumbers in bold letters correspond to the number of publications concerning the application or disease.

(epo), hematocrit increase has been achieved in many cases (Table 1). Expression of electrotransferred mini-dystrophin gene in the altered myodystrophic muscles of the mdx mice has been demonstrated (Table 1). The electrotransfer of the genes coding for antioangiogenic factors has demonstrated distant antitumour effects as well as antimetastatic effects in the murine model consisting in the intravenous injection of B16F10 cells.^{83,85} Noticeable concentrations of the cytokines Interleukin-2 and GM-CSF in tumours transfected with the corresponding genes have been measured.⁵⁹ The biological effects observed in the publications listed in Table 1 demonstrate the efficacy of the electrogenotherapy for the treatment of various diseases.

Finally, DNA electrotransfer has also been used for biotechnological purposes. For example, the electrotransfer of the human erythropoietin gene in the oviduct of laying hens has also been carried out for the production of the human erythropoietin,¹⁵⁵ and the transfer of the growth hormone-releasing hormone has also been successfully performed in pigs, not for the treatment of a pig disease but for the achievement of an enhanced weight gain and improved body composition.^{156–158}

Conclusion

In conclusion, DNA electrotransfer or electrogenotherapy constitutes a real alternative to viral approaches for gene transfer *in vivo*. Its efficacy is proven and there is no doubt on its biological safety. Moreover, DNA preparation is easy and secure, the roles of the electric pulses are described, the control of transfer conditions is achievable and appropriate equipment is available.

Acknowledgements

We acknowledge the financial support of CNRS, IGR, AFM and the EU Commission through the projects Cliniporator (QLK3-1999-00484)¹⁵⁹ and Esope (QLK3-2002-02003) coordinated by LMM. We also acknowledge all their colleagues for fruitful discussions and collaborative work. FA is the recipient of an 'aide aux études' from the AFM (Association Française contre les Myopathies).

References

- Wolff JA *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; **247**: 1465–1468.
- Budker V *et al.* Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells *in vivo* by a receptor-mediated process. *J Gene Med* 2000; **2**: 76–88.
- Satkauskas S, Bureau MF, Mahfoudi A, Mir LM. Slow accumulation of plasmid in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis. *Mol Ther* 2001; **4**: 317–323.
- Liu F, Song Y, Liu D. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 1999; **6**: 1258–1266.
- Liu F, Huang L. Improving plasmid DNA-mediated liver gene transfer by prolonging its retention in the hepatic vasculature. *J Gene Med* 2001; **3**: 569–576.

- 6 Zhang G *et al.* Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Therapy* 2004; **11**: 675–682.
- 7 Udvardi A *et al.* Uptake of exogenous DNA via the skin. *J Mol Med* 1999; **77**: 744–750.
- 8 Godon C, Caboche M, Daniel-Vedele F. Transient plant gene expression: a simple and reproducible method based on flowing particle gun. *Biochimie* 1993; **75**: 591–595.
- 9 Furth PA, Shamay A, Wall RJ, Hennighausen L. Gene transfer into somatic tissues by jet injection. *Anal Biochem* 1992; **205**: 365–368.
- 10 Walther W *et al.* Intratumoral low-volume jet-injection for efficient nonviral gene transfer. *Mol Biotechnol* 2002; **21**: 105–115.
- 11 Wang G *et al.* Ultrasound-guided gene transfer to hepatocytes *in utero*. *Fetal Diagn Ther* 1998; **13**: 197–205.
- 12 Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; **1**: 841–845.
- 13 Potter H, Weir L, Leder P. Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; **81**: 7161–7165.
- 14 Puc M *et al.* Techniques of signal generation required for electroporation: Survey of electroporation devices. *Bioelectrochemistry* 2004; **64**: 113–124.
- 15 Zerbib D, Amalric F, Teissie J. Electric field mediated transformation: isolation and characterization of a TK+ subclone. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; **129**: 611–618.
- 16 Tieleman DP, Leontiadou H, Mark AE, Marrink SJ. Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields. *J Am Chem Soc* 2003; **125**: 6382–6383.
- 17 Tsong TY, Su ZD. Biological effects of electric shock and heat denaturation and oxidation of molecules, membranes, and cellular functions. *Ann NY Acad Sci* 1999; **888**: 211–232.
- 18 Grasso RJ, Heller R, Cooley JC, Haller EM. Electrofusion of individual animal cells directly to intact corneal epithelial tissue. *Biochim Biophys Acta* 1989; **980**: 9–14.
- 19 Heller R, Grasso RJ. Transfer of human membrane surface components by incorporating human cells into intact animal tissue by cell-tissue electrofusion *in vivo*. *Biochim Biophys Acta* 1990; **1024**: 185–188.
- 20 Orlowski S, Belehradek Jr J, Paoletti C, Mir LM. Transient electroporation of cells in culture. Increase of the cytotoxicity of anticancer drugs. *Biochem Pharmacol* 1988; **37**: 4727–4733.
- 21 Mir LM, Orlowski S, Belehradek Jr J, Paoletti C. Electrochemotherapy potentiation of antitumor effect of bleomycin by local electric pulses. *Eur J Cancer* 1991; **27**: 68–72.
- 22 Belehradek Jr J *et al.* Electrochemotherapy of spontaneous mammary tumours in mice. *Eur J Cancer* 1991; **27**: 73–76.
- 23 Mir LM *et al.* Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. *C R Acad Sci III* 1991; **313**: 613–618.
- 24 Belehradek M *et al.* Electrochemotherapy, a new antitumor treatment. First clinical phase I–II trial. *Cancer* 1993; **72**: 3694–3700.
- 25 Mir LM *et al.* Effective treatment of cutaneous and subcutaneous malignant tumours by electrochemotherapy. *Br J Cancer* 1998; **77**: 2336–2342.
- 26 Gothelf A, Mir LM, Gehl J. Electrochemotherapy: results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat Rev* 2003; **29**: 371–387.
- 27 Sersa G, Cemazar M, Rudolf Z. Electrochemotherapy: advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Ther* 2003; **1**: 133–142.
- 28 Titomirov AV, Sukharev S, Kistanova E. *In vivo* electroporation and stable transformation of skin cells of newborn mice by plasmid DNA. *Biochim Biophys Acta* 1991; **1088**: 131–134.
- 29 Heller R *et al.* *In vivo* gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett* 1996; **389**: 225–228.
- 30 Rols MP *et al.* *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 168–171.
- 31 Suzuki T *et al.* Direct gene transfer into rat liver cells by *in vivo* electroporation. *FEBS Lett* 1998; **425**: 436–440.
- 32 Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 1998; **16**: 867–870.
- 33 Mir LM *et al.* Long-term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C R Acad Sci III* 1998; **321**: 893–899.
- 34 Lucas ML, Heller R. Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. *Mol Ther* 2001; **3**: 47–53.
- 35 Mir LM *et al.* High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4262–4267.
- 36 Gehl J, Mir LM. Determination of optimal parameters for *in vivo* gene transfer by electroporation, using a rapid *in vivo* test for cell permeabilization. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **261**: 377–380.
- 37 Gehl J *et al.* *In vivo* electroporation of skeletal muscle: threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1428**: 233–240.
- 38 Bettan M *et al.* Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry* 2000; **52**: 83–90.
- 39 Liu F, Huang L. Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA. *Gene Therapy* 2002; **9**: 1116–1119.
- 40 Lesbordes JC *et al.* *In vivo* electrotransfer of the cardiotrophin-1 gene into skeletal muscle slows down progression of motor neuron degeneration in pmn mice. *Hum Mol Genet* 2002; **11**: 1615–1625.
- 41 Gehl J, Skovsgaard T, Mir LM. Vascular reactions to *in vivo* electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim Biophys Acta* 2002; **1569**: 51–58.
- 42 Satkauskas S *et al.* Mechanisms of *in vivo* DNA electrotransfer: respective contributions of cell electroporation and DNA electroporation. *Mol Ther* 2002; **5**: 133–140.
- 43 Bureau MF *et al.* Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1474**: 353–359.
- 44 Puc M, Flisar K, Rebersek S, Miklavcic D. Electroporation for *in vitro* cell electroporation. *Radiol Oncol* 2001; **35**: 203–207.
- 45 Zaharoff DA, Barr RC, Li CY, Yuan F. Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Therapy* 2002; **9**: 1286–1290.
- 46 Lin CR *et al.* Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats. *Gene Therapy* 2002; **9**: 1247–1253.
- 47 Lee TH *et al.* *In vivo* electroporation of proopiomelanocortin induces analgesia in a formalin-injection pain model in rats. *Pain* 2003; **104**: 159–167.
- 48 Yu DS, Lee CF, Hsieh DS, Chang SY. Antitumor effects of recombinant BCG and interleukin-12 DNA vaccines on xenografted murine bladder cancer. *Urology* 2004; **63**: 596–601.
- 49 Heller LC, Coppola D. Electrically mediated delivery of vector plasmid DNA elicits an antitumor effect. *Gene Therapy* 2002; **9**: 1321–1325.
- 50 Kalat M *et al.* *In vivo* plasmid electroporation induces tumor antigen-specific CD8+ T-cell responses and delays tumor growth in a syngeneic mouse melanoma model. *Cancer Res* 2002; **62**: 5489–5494.
- 51 Tamura T *et al.* Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with *in vivo* electroporation is effective for colon and renal cancer. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 1265–1276.
- 52 Tanaka M *et al.* Inhibition of RL male 1 tumor growth in BALB/c mice by introduction of the RLakt gene coding for antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes and the GM-CSF gene by *in vivo* electroporation. *Cancer Sci* 2004; **95**: 154–159.

- 53 Yamashita YI *et al.* Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model. *Cancer Res* 2001; **61**: 1005–1012.
- 54 Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Treatment of bladder carcinomas using recombinant BCG DNA vaccines and electroporative gene immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 2004; **11**: 194–207.
- 55 Lee CF, Chang SY, Hsieh DS, Yu DS. Immunotherapy for bladder cancer using recombinant bacillus Calmette-Guerin DNA vaccines and interleukin-12 DNA vaccine. *J Urol* 2004; **171**: 1343–1347.
- 56 Lucas ML, Heller L, Coppola D, Heller R. IL-12 plasmid delivery by *in vivo* electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol Ther* 2002; **5**: 668–675.
- 57 Matsubara H *et al.* Electroporation-mediated transfer of cytokine genes into human esophageal tumors produces antitumor effects in mice. *Anticancer Res* 2001; **21**: 2501–2503.
- 58 Heller R *et al.* Intradermal delivery of interleukin-12 plasmid DNA by *in vivo* electroporation. *DNA Cell Biol* 2001; **20**: 21–26.
- 59 Heller L *et al.* *In vivo* electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumor immunity. *Melanoma Res* 2000; **10**: 577–583.
- 60 Kishida T *et al.* *In vivo* electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. *Gene Therapy* 2001; **8**: 1234–1240.
- 61 Kishida T *et al.* Electrochemo-gene therapy of cancer: intratumoral delivery of interleukin-12 gene and bleomycin synergistically induced therapeutic immunity and suppressed subcutaneous and metastatic melanomas in mice. *Mol Ther* 2003; **8**: 738–745.
- 62 Li S *et al.* Intramuscular electroporation delivery of IFN- α gene therapy for inhibition of tumor growth located at a distant site. *Gene Therapy* 2001; **8**: 400–407.
- 63 Li S, Zhang X, Xia X. Regression of tumor growth and induction of long-term antitumor memory by interleukin 12 electro-gene therapy. *J Natl Cancer Inst* 2002; **94**: 762–768.
- 64 Li S, Xia X, Zhang X, Suen J. Regression of tumors by IFN- α electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array. *Gene Therapy* 2002; **9**: 390–397.
- 65 Zhang GH *et al.* Gene expression and antitumor effect following *in vivo* electroporation delivery of human interferon α 2 gene. *Acta Pharmacol Sin* 2003; **24**: 891–896.
- 66 Lucas ML, Heller R. IL-12 gene therapy using an electrically mediated nonviral approach reduces metastatic growth of melanoma. *DNA Cell Biol* 2003; **22**: 755–763.
- 67 Tamura T *et al.* Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth. *Anticancer Res* 2003; **23**: 1173–1179.
- 68 Chi CH, Wang YS, Lai YS, Chi KH. Anti-tumor effect of *in vivo* IL-2 and GM-CSF electrogene therapy in murine hepatoma model. *Anticancer Res* 2003; **23**: 315–321.
- 69 Heller LC *et al.* Effect of electrically mediated intratumor and intramuscular delivery of a plasmid encoding IFN α on visible B16 mouse melanomas. *Technol Cancer Res Treat* 2002; **1**: 205–209.
- 70 Lee SC *et al.* Inhibition of established subcutaneous and metastatic murine tumors by intramuscular electroporation of the interleukin-12 gene. *J Biomed Sci* 2003; **10**: 73–86.
- 71 Baba M, Iishi H, Tatsuta M. Transfer of bcl-x s plasmid is effective in preventing and inhibiting rat hepatocellular carcinoma induced by *N*-nitrosomorpholine. *Gene Therapy* 2001; **8**: 1149–1156.
- 72 Jiang Y *et al.* Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. *Cancer Res* 2001; **61**: 2365–2370.
- 73 Goto T *et al.* Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 354–359.
- 74 Mikata K *et al.* Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of p53 gene: gene transfer by electroporation. *Mol Cancer Ther* 2002; **1**: 247–252.
- 75 Shibata MA, Morimoto J, Otsuki Y. Suppression of murine mammary carcinoma growth and metastasis by HSVtk/GCV gene therapy using *in vivo* electroporation. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 16–27.
- 76 Hsieh YH *et al.* Electroporation-mediated and EBV LMP1-regulated gene therapy in a syngenic mouse tumor model. *Cancer Gene Ther* 2003; **10**: 626–636.
- 77 Cemazar M *et al.* Effects of electrogenetherapy with p53wt combined with cisplatin on curvival of human tumor cell lines with different p53 status. *DNA Cell Biol* 2003; **22**: 765–775.
- 78 Ivanov MA *et al.* Enhanced antitumor activity of a combination of MBD2-antisense electrotransfer gene therapy and bleomycin electrochemotherapy. *J Gene Med* 2003; **5**: 893–899.
- 79 Slack A *et al.* Antisense MBD2 gene therapy inhibits tumorigenesis. *J Gene Med* 2002; **4**: 381–389.
- 80 Shibata MA, Horiguchi T, Morimoto J, Otsuki Y. Massive apoptotic cell death in chemically induced rat urinary bladder carcinomas following *in situ* HSVtk electrogene transfer. *J Gene Med* 2003; **5**: 219–231.
- 81 Wang F *et al.* Inhibition of tumor angiogenesis, growth and metastasis by blocking VEGF paracrine pathway. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)* 2002; **34**: 165–170.
- 82 Yoshizato K *et al.* Gene delivery with optimized electroporation parameters shows potential for treatment of gliomas. *Int J Oncol* 2000; **16**: 899–905.
- 83 Trochon-Joseph V *et al.* Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res* 2004; **64**: 2062–2069.
- 84 Niu G *et al.* Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*. *Cancer Res* 1999; **59**: 5059–5063.
- 85 Martel-Renoir D *et al.* Coelectrotransfer to skeletal muscle of three plasmids coding for antiangiogenic factors and regulatory factors of the tetracycline-inducible system: tightly regulated expression, inhibition of transplanted tumor growth, and antimetastatic effect. *Mol Ther* 2003; **8**: 425–433.
- 86 Cichon T *et al.* Electrotransfer of gene encoding endostatin into normal and neoplastic mouse tissues: inhibition of primary tumor growth and metastatic spread. *Cancer Gene Ther* 2002; **9**: 771–777.
- 87 Matsubara H *et al.* Combinatory anti-tumor effects of electroporation-mediated chemotherapy and wild-type p53 gene transfer to human esophageal cancer cells. *Int J Oncol* 2001; **18**: 825–829.
- 88 Mallat Z *et al.* Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res* 2001; **89**: E41–E45.
- 89 Hase M, Tanaka M, Yokota M, Yamada Y. Reduction in the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice induced by electroporation-mediated transfer of the human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene into skeletal muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediators* 2002; **70**: 107–118.
- 90 Silvestre JS *et al.* Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res* 2000; **87**: 448–452.
- 91 Tanaka S, Uehara T, Nomura Y. Up-regulation of protein-disulfide isomerase in response to hypoxia/brain ischemia and its protective effect against apoptotic cell death. *J Biol Chem* 2000; **275**: 10388–10393.

- 92 Mallat Z *et al.* Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates ischemia-induced neovascularization in mice hindlimb. *Circ Res* 2002; **91**: 441–448.
- 93 Silvestre JS *et al.* Vascular endothelial growth factor-B promotes *in vivo* angiogenesis. *Circ Res* 2003; **93**: 114–123.
- 94 Adachi O *et al.* Gene transfer of Fc-fusion cytokine by *in vivo* electroporation: application to gene therapy for viral myocarditis. *Gene Therapy* 2002; **9**: 577–583.
- 95 Deleuze V, Scherman D, Bureau MF. Interleukin-10 expression after intramuscular DNA electrotransfer: kinetic studies. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; **299**: 29–34.
- 96 Nakano A *et al.* Cytokine gene therapy for myocarditis by *in vivo* electroporation. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 1289–1297.
- 97 Watanabe K *et al.* Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. *Circulation* 2001; **104**: 1098–1100.
- 98 Babiuk S *et al.* Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals. *Vaccine* 2002; **20**: 3399–3408.
- 99 Bachy M *et al.* Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse. *Vaccine* 2001; **19**: 1688–1693.
- 100 Nomura M *et al.* *In vivo* induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a single epitope introduced into an unrelated molecule. *J Immunol Methods* 1996; **193**: 41–49.
- 101 Paster W *et al.* *In vivo* plasmid DNA electroporation generates exceptionally high levels of epitope-specific CD8+ T-cell responses. *Gene Therapy* 2003; **10**: 717–724.
- 102 Peretz Y, Zhou ZF, Halwani F, Prud'homme GJ. *In vivo* generation of dendritic cells by intramuscular codelivery of FLT3 ligand and GM-CSF plasmids. *Mol Ther* 2002; **6**: 407–414.
- 103 Selby M *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by electroporation *in vivo*. *J Biotechnol* 2000; **83**: 147–152.
- 104 Tjelle TE *et al.* Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation. *Mol Ther* 2004; **9**: 328–336.
- 105 Tollefsen S *et al.* DNA injection in combination with electroporation: a novel method for vaccination of farmed ruminants. *Scand J Immunol* 2003; **57**: 229–238.
- 106 Widera G *et al.* Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation *in vivo*. *J Immunol* 2000; **164**: 4635–4640.
- 107 Zucchelli S *et al.* Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. *J Virol* 2000; **74**: 11598–11607.
- 108 Yang L *et al.* Generation of monoclonal antibodies against Blo t3 using DNA immunization with *in vivo* electroporation. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**: 663–668.
- 109 Wu CJ, Lee SC, Huang HW, Tao MH. *In vivo* electroporation of skeletal muscles increases the efficacy of Japanese encephalitis virus DNA vaccine. *Vaccine* 2004; **22**: 1457–1464.
- 110 Aurisicchio L *et al.* Tamarin alpha-interferon is active in mouse liver upon intramuscular gene delivery. *J Gene Med* 2001; **3**: 394–402.
- 111 Perez N *et al.* Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by *in vivo* muscle electroporation. *Genet Vaccines Ther* 2004; **2**: 2.
- 112 Deleuze V *et al.* LPS-induced bronchial hyperreactivity: interference by mIL-10 differs according to site of delivery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; **286**: L98–L105.
- 113 Maruyama H *et al.* Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats. *Gene Therapy* 2001; **8**: 461–468.
- 114 Maruyama H *et al.* Skin-targeted gene transfer using *in vivo* electroporation. *Gene Therapy* 2001; **8**: 1808–1812.
- 115 Nordstrom JL. The antiprogesterone-dependent GeneSwitch system for regulated gene therapy. *Steroids* 2003; **68**: 1085–1094.
- 116 Ataka K *et al.* Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. *Am J Nephrol* 2003; **23**: 315–323.
- 117 Kreiss P, Bettan M, Crouzet J, Scherman D. Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *J Gene Med* 1999; **1**: 245–250.
- 118 Rizzuto G *et al.* Gene electrotransfer results in a high-level transduction of rat skeletal muscle and corrects anemia of renal failure. *Hum Gene Ther* 2000; **11**: 1891–1900.
- 119 Terada Y *et al.* Efficient and ligand-dependent regulated erythropoietin production by naked DNA injection and *in vivo* electroporation. *Am J Kidney Dis* 2001; **38**: S50–53.
- 120 Rizzuto G *et al.* Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 6417–6422.
- 121 Dalle B *et al.* Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity *in vitro* and *in vivo*. *Blood* 2001; **97**: 3776–3782.
- 122 Lamartina S *et al.* Stringent control of gene expression *in vivo* by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 199–210.
- 123 Horiki M *et al.* High-level expression of interleukin-4 following electroporation-mediated gene transfer accelerates Type 1 diabetes in NOD mice. *J Autoimmun* 2003; **20**: 111–117.
- 124 Martinenghi S *et al.* Human insulin production and amelioration of diabetes in mice by electrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to the skeletal muscle. *Gene Therapy* 2002; **9**: 1429–1437.
- 125 Prud'homme GJ, Chang Y, Li X. Immunoinhibitory DNA vaccine protects against autoimmune diabetes through cDNA encoding a selective CTLA-4 (CD152) ligand. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 395–406.
- 126 Yin D, Tang JG. Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporation transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle *in vivo*. *FEBS Lett* 2001; **495**: 16–20.
- 127 Wang LY, Sun W, Chen MZ, Wang X. Intramuscular injection of naked plasmid DNA encoding human preproinsulin gene in streptozotocin-diabetes mice results in a significant reduction of blood glucose level. *Sheng Li Xue Bao* 2003; **55**: 641–647.
- 128 Rabinovsky ED, Draghia-Akli R. Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes *in vivo* angiogenesis. *Mol Ther* 2004; **9**: 46–55.
- 129 Pradat PF *et al.* Partial prevention of cisplatin-induced neuropathy by electroporation-mediated nonviral gene transfer. *Hum Gene Ther* 2001; **12**: 367–375.
- 130 Zang WP *et al.* Transfer and expression of recombinant human thrombopoietin gene in COS-7 Cells and mice *in vivo*. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 2001; **9**: 14–17.
- 131 Zang WP, Wei XD, Wang SW, Wang DB. Thrombopoietic effect of recombinant human thrombopoietin gene transferred to mice mediated by electric pulse on normal and experimental thrombocytopenia mice. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2001; **22**: 128–131.
- 132 Payen E *et al.* Improvement of mouse beta-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA. *Exp Hematol* 2001; **29**: 295–300.
- 133 Samakoglu S *et al.* betaMinor-globin messenger RNA accumulation in reticulocytes governs improved erythropoiesis in beta thalassemic mice after erythropoietin complementary DNA electrotransfer in muscles. *Blood* 2001; **97**: 2213–2220.
- 134 Fewell JG *et al.* Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol Ther* 2001; **3**: 574–583.
- 135 Tomanin R *et al.* Non-viral transfer approaches for the gene therapy of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Acta Paediatr Suppl* 2002; **91**: 100–104.
- 136 Gollins H, McMahon J, Wells KE, Wells DJ. High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. *Gene Therapy* 2003; **10**: 504–512.

- 137 Vilquin JT *et al.* Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Therapy* 2001; **8**: 1097–1107.
- 138 Murakami T *et al.* Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation. *Muscle Nerve* 2003; **27**: 237–241.
- 139 Briguet A *et al.* Transcriptional activation of the utrophin promoter B by a constitutively active Ets-transcription factor. *Neuromuscul Disord* 2003; **13**: 143–150.
- 140 Ferrer A *et al.* Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins. *Gene Therapy* 2004; **11**: 884–893.
- 141 Chuang IC *et al.* Intramuscular electroporation with the pro-opiomelanocortin gene in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Res Ther* 2004; **6**: R7–R14.
- 142 Kim JM *et al.* Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein. *Gene Therapy* 2003; **10**: 1216–1224.
- 143 Perez N *et al.* Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after *in vivo* intramuscular electrotransfer: application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis. *Hum Gene Ther* 2002; **13**: 2161–2172.
- 144 Saidenberg-Kermanac'h N *et al.* Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis. *J Gene Med* 2003; **5**: 164–171.
- 145 Bloquel C, Fabre E, Bureau MF, Scherman D. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. *J Gene Med* 2004; **6** (Suppl 1): S11–S23.
- 146 Kishimoto KN, Watanabe Y, Nakamura H, Kokubun S. Ectopic bone formation by electroporatic transfer of bone morphogenetic protein-4 gene. *Bone* 2002; **31**: 340–347.
- 147 Magee TR *et al.* Gene therapy of erectile dysfunction in the rat with penile neuronal nitric oxide synthase. *Biol Reprod* 2002; **67**: 1033–1041.
- 148 Yasui A *et al.* Elevated gastrin secretion by *in vivo* gene electroporation in skeletal muscle. *Int J Mol Med* 2001; **8**: 489–494.
- 149 Tanaka T *et al.* *In vivo* gene transfer of hepatocyte growth factor to skeletal muscle prevents changes in rat kidneys after 5/6 nephrectomy. *Am J Transplant* 2002; **2**: 828–836.
- 150 Xue F *et al.* Attenuated acute liver injury in mice by naked hepatocyte growth factor gene transfer into skeletal muscle with electroporation. *Gut* 2002; **50**: 558–562.
- 151 Riera M *et al.* Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J Gene Med* 2004; **6**: 111–118.
- 152 Takahashi T *et al.* IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model. *Gene Therapy* 2003; **10**: 612–620.
- 153 Sakamoto T *et al.* Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum Gene Ther* 1999; **10**: 2551–2557.
- 154 Yomogida K, Yagura Y, Nishimune Y. Electroporated transgene-rescued spermatogenesis in infertile mutant mice with a sertoli cell defect. *Biol Reprod* 2002; **67**: 712–717.
- 155 Ochiai H *et al.* Synthesis of human erythropoietin *in vivo* in the oviduct of laying hens by localized *in vivo* gene transfer using electroporation. *Poult Sci* 1998; **77**: 299–302.
- 156 Draghia-Akli R *et al.* High-efficiency growth hormone-releasing hormone plasmid vector administration into skeletal muscle mediated by electroporation in pigs. *FASEB J* 2003; **17**: 526–528.
- 157 Khan AS *et al.* Maternal GHRH plasmid administration changes pituitary cell lineage and improves progeny growth of pigs. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; **285**: E224–E231.
- 158 Draghia-Akli R *et al.* Effects of plasmid-mediated growth hormone releasing hormone supplementation in young, healthy Beagle dogs. *J Anim Sci* 2003; **81**: 2301–2310.
- 159 <http://www.cliniporator.com>.

Revue 2

Electric Pulse-Mediated Gene Delivery to Various Animal Tissues

Lluís M. Mir,^{*} Pernille H. Møller,[†] Franck André,^{*} and Julie Gehl[†]

^{*}Laboratory of Vectorology and Gene Transfer, UMR 8121 CNRS
Institut Gustave-Roussy, F-94805 Villejuif Cédex, France

[†]Department of Oncology 54B1, Herlev University Hospital
University of Copenhagen, DK-2730 Herlev, Denmark

- I. Introduction
- II. Basic Principles of Electro Gene Transfer
 - A. Electroporation/electropermeabilization principles
 - B. Cell electroporation and DNA electrophoresis *in vivo*
 - C. Tissue reactions to *in vivo* electric pulse delivery:
vascular effects
- III. Electrodes for *In Vivo* Gene Delivery
 - A. Plate electrodes
 - B. Needle electrodes
 - C. Electrode type and various tissues
- IV. Preclinical Studies
 - A. Preclinical studies using reporter genes
 - B. Preclinical studies with therapeutic genes
- V. Perspectives for Clinical Use of Electro Gene Transfer
- VI. Conclusion
 - Acknowledgments
 - References

ABSTRACT

Electroporation designates the use of electric pulses to transiently permeabilize the cell membrane. It has been shown that DNA can be transferred to cells through a combined effect of electric pulses causing (1) permeabilization of the cell membrane and (2) an electrophoretic effect on DNA, leading the polyanionic molecule to move toward or across the destabilized membrane. This process is now referred to as DNA electrotransfer or electro gene transfer (EGT). Several studies have shown that EGT can be highly efficient, with low variability both *in vitro* and *in vivo*. Furthermore, the area transfected is restricted by the placement of the electrodes, and is thus highly controllable. This has led to an increasing use of the technology to transfer reporter or therapeutic genes to various tissues, as evidenced from the large amount of data accumulated on this new approach for non-viral gene therapy, termed electrogenetherapy (EGT as well). By transfecting cells with a long life-time, such as muscle fibers, a very long-term expression of genes can be obtained. A great variety of tissues have been transfected successfully, from muscle as the most extensively used, to both soft (e.g., spleen) and hard tissue (e.g., cartilage). It has been shown that therapeutic levels of systemically circulating proteins can be obtained, opening possibilities for using EGT therapeutically. This chapter describes the various aspects of *in vivo* gene delivery by means of electric pulses, from important issues in methodology to updated results concerning the electrotransfer of reporter and therapeutic genes to different tissues. © 2005, Elsevier Inc.

I. INTRODUCTION

Electro gene transfer (EGT) opens some interesting possibilities. Indeed the use of naked DNA for gene transfer eliminates the limitations and risks associated with the use of viruses (e.g., limited coding sequence length in the case of adeno-associated virus, insertional mutagenesis with retrovirus, and immunological responses to the adenoviruses). EGT can be performed in both *in vitro* and *in vivo* systems, as well as in the clinical setting. Furthermore, the tissue to be transfected can be selected by placement of the electrodes. Gene expression can be transient (e.g., when skin is transfected) or long term (e.g., when muscle is transfected). This offers a different scope of possibilities, as compared to other non-viral gene transfer techniques.

II. BASIC PRINCIPLES OF ELECTRO GENE TRANSFER

Neumann *et al.* (1982) published the first pioneering study showing that DNA could be introduced into living cells by means of electric pulses using a custom-made chamber. It took 2 years before a second paper describing successful DNA

transfer to eukaryotic cells (Potter *et al.*, 1984) could follow up the results. Potter *et al.* (1984) used a classical generator for protein and DNA gel electrophoresis, creating a short circuit through the cell and DNA suspension, which caused the delivery of an exponentially decaying electric pulse to the cells. Use of the classical electrophoresis generator opened up the possibility so many other groups could try this approach. In 1985 Teissié developed the first square wave pulse generator, where both pulse length and pulse amplitude can be controlled independently (Zerbib *et al.*, 1985).

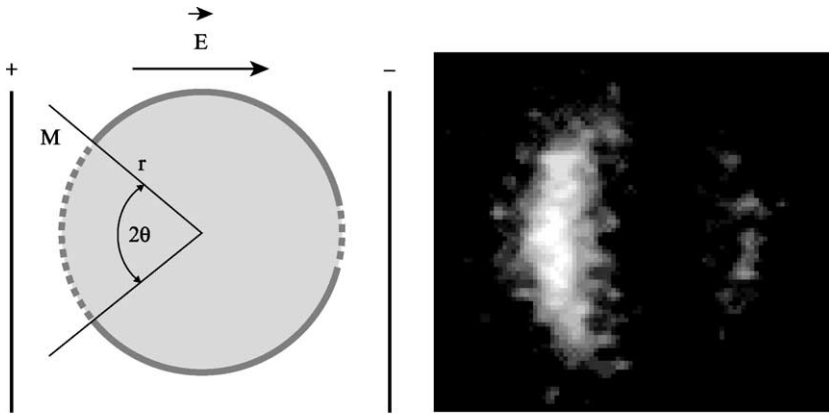
A. Electroporation/electropermeabilization principles

The exposure of living cells to short and intense electric pulses induces position-dependent changes in the transmembrane potential difference. These changes are well described by the equation of Schwann, indicating that the value of the induced change is proportional to the cell radius and the scalar value of the external electric field (Fig. 5.1). The induced change will superimpose on the resting transmembrane potential. When the transmembrane potential difference net value (the sum of the vectorial values of the induced and resting potential differences) is greater than 0.2 to 0.4 V, transient permeation structures are generated at the cell membrane level because the membrane structure cannot resist the electrocompressive forces caused by this potential difference. Electropermeabilization is thus a threshold phenomenon, imposed by the need to overpass a threshold value of the transmembrane potential difference.

The structure of the transient permeation structures is not yet elucidated. Some models have proposed the generation of “electropores” (described as “holes” in the membranes), but cell electropermeabilization can be totally reversible and the theory hardly explains the resealing of these “electropores.” Recent modelization by molecular dynamics (Tieleman *et al.*, 2003) has suggested that under transmembrane potential differences much larger than those necessary to obtain “physiological” reversible cell electropermeabilization, pores could indeed be generated. Still, the reversible structure remains undefined. The most interesting property of cell electropermeabilization is that cell permeabilization allows direct delivery of nonpermeant molecules inside the cell, bypassing the normal internalization routes.

B. Cell electroporation and DNA electrophoresis *in vivo*

Experiments have shown that tissues remain permeabilized for several minutes after electric pulses delivery (Gehl *et al.*, 2002; Mir *et al.*, 1999; Satkauskas *et al.*, 2002). However, for efficient transfer, DNA must be injected before the electric pulse delivery. Thus permeabilization of cells is not sufficient for efficient EGT even though intense electric fields are required to overpass the cell



$$\Delta V_M = f g(\lambda) r E \cos\theta$$

Figure 5.1. Effect of an external electric field applied on a living cell. (Left) The external electric field induces a change (ΔV_M) in the resting transmembrane voltage of the cell. The value of the induced change depends on the shape of the cell (f) and the conductivity of the media $g(\lambda)$. At point **M** on the cell surface, it is also proportional to the cell radius (r), the scalar value of the external electric field (E), and the cosinus of the angle θ (polar coordinate of point **M**). As the resting transmembrane potential is negative on the inside respective to the outside, the first part of the membrane that will be permeabilized is the pole facing the positive electrode. The higher the pulse amplitude, the larger the area of the membrane permeabilized, whereas longer pulses will cause greater perturbation of the area permeabilized. (Right) The positive electrode should be imagined in the left of the picture and the negative electrode on the right. One 20-ms pulse of 1 kV/cm was delivered to a CHO cell suspended in medium containing propidium iodide. The image was recorded less than 40ms after the pulses using a rapid ultralow-light camera, as described by [Gabriel and Teissie \(1997\)](#). This experiment was performed by B. Gabriel, who kindly permitted reproduction.

permeabilization threshold ([Gehl and Mir, 1999](#); [Gehl *et al.*, 1999](#)). Moreover, efficient EGT requires sufficiently long pulses. Hence, the mechanism of EGT cannot be explained just by cell electroporation and DNA diffusion through the permeabilized cell membrane.

One of the earliest and most exhaustive series of experiments explaining the mechanism of EGT were performed in muscle using trains of identical pulses ([Mir *et al.*, 1999](#)). The authors found a 200-fold increase in expression compared to naked DNA injection and a large decrease in the variability of expression, as well as a long-term, high level of expression, which remained stable for 9 months ([Mir *et al.*, 1998](#)). Subsequently, most studies have used trains of identical pulses for the transfer of therapeutic genes into muscles ([Table 5.2](#)) or for EGT in other tissues ([Tables 5.3 and 5.4](#)). However, the role of electric pulses in EGT can be studied by combining different pulses. Instead of

delivering trains of identical pulses, exposing the cells to combinations of high-voltage and low-voltage pulses would elucidate the role of the pulses in EGT. Experiments were set up exposing muscles to combinations of one short high-voltage (HV) pulse followed by one or several long low-voltage (LV) pulses. The HV pulse usually consists of 100 μ s at 800 V/cm as the field strength has been adapted to skeletal muscle permeabilization. Indeed, using eight such pulses at 1-Hz repetition frequency, [Gehl et al. \(1999\)](#) showed that this field strength was the highest one could deliver to muscle fibers without provoking irreversible electroporation. The LV pulses were nonpermeabilizing pulses of 100 ms at 80 V/cm, with a field intensity below the threshold for reversible permeabilization in mice skeletal muscle ([Bureau et al., 2000](#)).

The efficacy of several combinations of pulses (1 HV alone, 1 HV followed by 1 LV, or 1 HV followed by 4 LV) was compared ([Satkauskas et al., 2002](#)). It was shown that the duration of the permeabilized state of the muscle fibers was the same for the three combinations tested. However, the authors found that transfection was only achieved if at least one LV was delivered after the HV. They also reported that the efficacy of a single LV could be observed even if this LV was delivered up to 100 s after the HV, while the gap between the HV and the LV could be extended to at least 3000 s when 4 LV were delivered. The authors drew the conclusion that the permeabilizing HV pulse was mandatory but that the efficacy of the procedure was brought by the LV pulses. Other arguments have contributed to point out that the long LV pulses act on DNA, provoking its electrophoretic displacement ([Zaharoff et al., 2002](#)).

Thus the electric pulses have two roles: “electroporation” of the target cells and electrophoretic transport of the DNA “toward and/or across” the cell membrane. Target cell electroporation is mandatory, but the electrophoretic component of the electric pulses is actually instrumental in DNA electrotransfer efficacy.

A new pulse generator (Cliniporator, IGEA s.r.l., Carpi, Italy) ([Fig. 5.2A](#)), able to deliver these combinations of pulses, has been developed within the Cliniporator project (QLK3-1999-00484) of the 5th Framework Program of the European Union. In the skeletal muscle, tumor, and skin, the high-voltage plus low-voltage pulse combination has led to a further increase of the expression of the luciferase coding plasmid with almost no histological modification.

C. Tissue reactions to *in vivo* electric pulse delivery: vascular effects

One particular issue about electroporation *in vivo* is that the electric pulses have been shown to cause vascular effects. These effects appear as a transient hypoperfusion of not only the area defined by the electrodes, but also distally

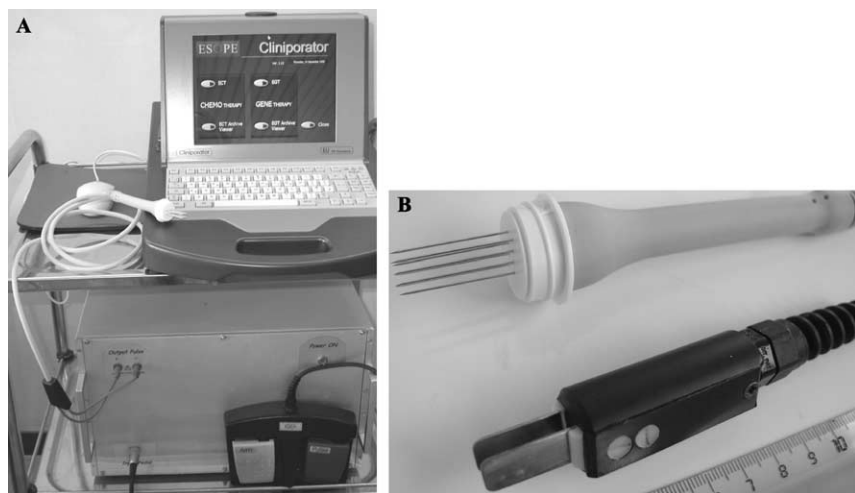


Figure 5.2. The Cliniporator and electrodes. (A) This new pulse generator (Cliniporator, IGEA s.r.l. Carpi, Italy) has been developed within the Cliniporator project (QLK3-1999-00484) of the 5th Framework Program of the European Union. It delivers combinations of HV and LV pulses. (B) Examples of plate and needle electrodes.

thereof (Gehl *et al.*, 2002). The mechanism behind this has been proposed to be a reflexory vasoconstriction of afferent arterioles mediated by the sympathetic nervous system. The effect is most pronounced when high voltage pulses are used (Gehl *et al.*, 2002). In the case of high-voltage pulses applied to deliver chemotherapy to tumors, this is used advantageously. The vascular effect implies that just at the time when the cell is permeabilized, the drug is withheld within the electroporated area by the so-called “vascular lock.”

For the pulses used standardly for EGT, the vascular effects are either absent or minimal and should not affect gene transfer and/or expression (Gehl *et al.*, 2002). In fact, it has been shown that a brief ischemia might actually promote the expression of transferred genes (Takeshita *et al.*, 1996; Tsurumi *et al.*, 1996). Actually, the vascular effects of electric pulses may be used to define the optimal conditions for gene transfer to the skeletal muscle, as the expression of transferred genes is abolished when the tissue starts to be irreversibly permeabilized. Indeed this is also the time when vascular effects become more prominent (Gehl *et al.*, 2002). Therefore, a quick examination of blood flow in the muscle after the delivery of electric pulses may reveal what the upper limit for pulse strength for gene transfer is.

III. ELECTRODES FOR *IN VIVO* GENE DELIVERY

Electrodes for *in vivo* gene delivery are a problem to be solved, but at the same time are an option for making choices that benefit the particular aim of the study. In some cases, a great advantage of EGT is that the transfer will take place only in the volume where the local electric field intensity is larger than the threshold value. This volume is delineated by the electrode geometry and the ratio of the applied voltage to the electrode distance. Then, one can choose to transfer DNA to a particular area, leaving a similar area untreated as a control. Field distribution has been calculated for various electrode types (Gehl *et al.*, 1999; Miklavcic *et al.*, 2000). However, there are essentially two types of electrodes (see Fig. 5.2B).

A. Plate electrodes

These electrodes can be either purchased or simply constructed. The corners of the plates should be rounded to avoid “hot spots” on the corners of the electrodes. The material can be, for example, stainless steel. One very important feature is that the plates must be absolutely parallel to avoid inhomogeneities in the field distribution. Plate electrodes can be used either directly in the tissue, as described for liver lobe (Liu and Huang, 2002; Suzuki *et al.*, 1998) or muscle (Ostapenko *et al.*, 2004), or, after depilation and application of conductive gel, directly over the skin of a limb where the muscle underneath is to be transfected (Mir *et al.*, 1999).

B. Needle electrodes

There are many options when it comes to needle electrodes. The most simple is just two opposing needles. In this system, the electric field will be quite heterogeneous. In one study by Mathiesen (1999), this can be seen as an area without gene transfer (field too low), an area with gene transfer (field adequate), and an area with damaged, nonexpressing tissue (field too high). More complex needle arrays include the parallel array, where opposing rows of four needles are used to try and achieve a more even field distribution, as seen with plate electrodes (Gehl *et al.*, 1999). In another system, needles are used in opposing pairs in a hexagonal array where the field is rotating. This also evens the field distribution somewhat (Gilbert *et al.*, 1997). A more complex electrode type with a center needle surrounded by a ring of six needles allows one to submit large tissue volumes by letting all the needles pulse in pairs (Ramirez *et al.*, 1998). Moreover, Liu and Huang (2002a) have used needles of the syringes used to inject DNA as electrodes, ensuring that the high-intensity electric field is confined to the site of injection.

C. Electrode type and various tissues

For muscle tissue, the most extensively used technique is plate electrodes applied on depilated skin (with conducting gel) over the muscle to be transfected. This technique is extremely simple; in fact, gene transfer is performed in the order of seconds. Even when only a small muscle, such as the tibialis cranialis of mice weighing some 50–80 mg is transfected, systemic levels of protein can be detected (Martel-Renoir *et al.*, 2003; Trochon-Joseph *et al.*, 2004). In tumor tissue, plate electrodes have been used most frequently (Cemazar *et al.*, 2003; Trochon-Joseph *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2004). It needs to be emphasized that the distance between the plates must be compatible with good contact of the tumor to both plates so that an adequate field is obtained. For big tumors, needle electrodes are preferable to plate electrodes. In liver, both needle (Ramirez *et al.*, 1998) and plate (tweezers) (Liu and Huang, 2002; Suzuki *et al.*, 1998) electrodes have been used. For the latter, the liver lobe is just placed between two plates during a laparotomy.

IV. PRECLINICAL STUDIES

Several non-viral gene transfer methods have been developed (see Table 5.1). However, the one very big advantage of electric pulse-mediated gene delivery is that it is well suited for *in vivo* gene delivery to very different tissues—both for use in animal research and, in principle, for use in clinical trials. In addition, EGT has also been used to transfect fungal (Robinson and Sharon, 1999) and plant tissues (Dekeyser *et al.*, 1990). An increasing amount of literature is accumulating on the use of EGT for various animal tissues, as listed in Tables 5.2–5.4. Many studies have focused on EGT to muscle as this particular tissue type has the distinct advantages of being (1) easily accessible, (2) with long term, and high-level, expression of transferred genes, and (3) a large cell factory for the production of secreted factors. Table 5.2 lists published studies on transfection with reporter genes and therapeutic genes to muscle tissue. Another tissue of particular interest is tumor tissue. Gene transfer to tumor tissue is interesting for the development of an anticancer gene therapy treatment modality. Table 5.3 lists publications concerning EGT of reporter genes or therapeutic genes in tumor tissue. The therapeutic genes mainly involve immuno-modulatory molecules or cytokines (Andre and Mir, 2004). Tumors are difficult to transfect mainly due to the high heterogeneity in the tissue. This is reflected in the many different parameters used (Table 5.3).

One particular feature of electroporation is its applicability to a wide variety of tissues. Indeed various tissues (listed in Table 5.4) have been electro-transferred successfully. Because the transfection procedure itself is so short,

intraoperative transfection can be foreseen, expanding the range of potential targets. One particular tissue or part of a tissue can be targeted by placement of the electrodes, and thus placing the electrodes around, for example, one testis will leave the untreated testis as an internal control.

A. Preclinical studies using reporter genes

Reporter genes, e.g., firefly luciferase (luc), green fluorescent protein (GFP), or β -galactosidase (β -gal), have been used to elucidate the potential of different tissues to be transfected, to find the optimal parameters for the individual tissue, and to characterize the level and duration of expression. Levels of expression are best evaluated with quantitative reporter genes such as luc or β -gal; of these genes, studies have shown a two to three log increase in gene expression with respect to naked DNA injection alone (Mir *et al.*, 1999). The highest levels of expression are obtained in tissues with an innate ability to produce high levels of proteins, e.g., liver and muscle. Heller and colleagues (1996) were the first to electrotransfer reporter gene DNA *in vivo* using a train of short pulses (100 μ s) to the liver. In 1998, four groups consistently demonstrated very good transfection levels using trains of long pulses (5 to 50 ms): Rols *et al.* (1998) in tumors, Suzuki *et al.* (1998) in the liver, and Aihara and Miyazaki (1998) and Mir *et al.* (1999) in the skeletal muscle. Since then, a variety of tissues have been electrotransfected successfully, among them skin (Babiuk *et al.*, 2003), kidney (Tsuje *et al.*, 2004), bladder (Iwashita *et al.*, 2004), spleen (Tupin *et al.*, 2003), testis (Widlak *et al.*, 2003), ovaries (Sato *et al.*, 2003), lung (Dean *et al.*, 2003), brain (Kondoh *et al.*, 2000), spinal cord (Lin *et al.*, 2002a), cornea (Blair-Parks *et al.*, 2004), retina (Dezawa *et al.*, 2002; Matsuda and Cepko, 2004), vessels (Martin *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2001), cartilage (Grossin *et al.*, 2003), synovium (Ohashi *et al.*, 2002), and tendon (Jayankura *et al.*, 2003) (see Table 5.4 for a complete list of tissues and the appended references). The majority of studies used a train of several (3 to 10) pulses of millisecond to tens of millisecond duration, resulting in a highly significant increase in the level of reporter gene expression compared to naked DNA injection in the target tissue. Short pulses were used by Heller *et al.* (1996). Since then, they have almost never been used, as this group itself compared short and long pulses and demonstrated that the level of expression was higher, and duration longer, when long pulses were delivered to the tissues (Lucas and Heller, 2001).

The duration of gene expression seems to be closely related to the turnover rate of the cells. In cells with a long lifetime, long-term expression of a gene can be obtained as, for example, in muscles (Mir *et al.*, 1998) where gene expression has been detected 9 months after transfection, or tendon (Jayankura *et al.*, 2003) and cartilage (Grossin *et al.*, 2003) where gene expression was detected for several months. In fast-dividing tissues, e.g., skin (Dujardin *et al.*,

Table 5.1. Non-viral Transfection Methods

	Injection of naked DNA (Wolff <i>et al.</i> , 1990)	Hydrodynamic injection (Liu <i>et al.</i> , 1999; Zhang <i>et al.</i> , 2004)	Biolistic (ballistic) methods (Furth <i>et al.</i> , 1992; Godon <i>et al.</i> , 1993; Walther <i>et al.</i> , 2002)	Sonoporation (Wang <i>et al.</i> , 1998)	Lipofection	DNA electrotransfer
Mechanism	Simple injection with naked DNA	Very rapid intravenous/ intraarterial injection of a large volume of DNA solution	Jet injection of DNA at high speed creating an ultrafine stream of high-pressure fluid that penetrates the skin or gene gun injection using DNA-coated gold particles	Focused ultrasounds to permeate cells	Lipids w/wo lipoprotein to form DNA carrying liposomes that will fuse with cell membranes	Short electric pulses that permeabilize cells and electrophoretically drive DNA into the cells
Advantages	Very simple	Very efficient transfection of liver cells after tail vein or intraportal injection, or in clamped muscles after intraarterial delivery	Good transfection in cutaneous/ subcutaneous layers	Still in early stages of development	Good transfection <i>in vitro</i> , can be cell type specific through receptor- mediated uptake	High efficiency, performed in both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> systems, delineation of the transfected volume by placement of the electrodes

Disadvantages	Very low efficiency, high variability	With tail injection the method is dangerous for the animal as it results in transient heart failure, blocks fluid distribution in the body, and provokes overpressure in the liver	No effect in deeper lying tissues	Still in early stages of development	Poor transfection efficiency <i>in vivo</i> ; introduction of foreign molecules into the cell membranes	At least local anesthesia required
Perspectives for clinical use	Possible in humans	Possible in humans in clamped organs	Possible in humans but only for cutaneous/subcutaneous targets	Still in early stages of development	Not foreseen in humans	Possible in humans, in various tissues

Table 5.2. *In Vivo* Delivery of Genes into Skeletal Muscle by Means of DNA Electrotransfer

Gene	Disease	Animal	Ref.
Green fluorescent protein	Reporter gene	Mouse	Faurie <i>et al.</i> (2004)
Firefly luciferase	Reporter gene	Mouse, rat, rabbit	Bureau <i>et al.</i> (2000); Hoover and Kalhovde (2000); Mennuni <i>et al.</i> (2004); Mir <i>et al.</i> (1999); Selby <i>et al.</i> (2000); Vicat <i>et al.</i> (2000)
β -Galactosidase	Reporter gene	Mouse, rat	Aihara and Miyazaki (1998); Mathiesen (1999); Selby <i>et al.</i> (2000)
Secreted alkaline phosphatase	Reporter gene	Mouse, rabbit	Bettan <i>et al.</i> (2000a); Mennuni <i>et al.</i> (2004)
Interleukin (IL)-4	Diabetes	Mouse	Horiki <i>et al.</i> (2003)
IL-10	Ischemia, myocarditis, arthritis, bronchopulmonary hyperreactivity	Mouse	Deleuze <i>et al.</i> (2002, 2004); Nakano <i>et al.</i> (2001); Perez <i>et al.</i> (2002); Saidenberg-Kermanach <i>et al.</i> (2003); Silvestre <i>et al.</i> (2000); Watanabe <i>et al.</i> (2001)
IL-12	Cancer, immunotherapy	Mouse	Lee <i>et al.</i> (2003a); Lucas and Heller (2001); Lucas <i>et al.</i> (2002)
IL-18	Atherosclerosis, ischemia	Mouse, rat	Mallat <i>et al.</i> (2001, 2002)
Interferon- α	Cancer, vaccination	Mouse	Aurisicchio <i>et al.</i> (2001) Li <i>et al.</i> (2001); Zhang <i>et al.</i> (2003)
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Cancer, <i>in vivo</i> generation of dendritic cells	Mouse	Perez <i>et al.</i> (2002); Peretz <i>et al.</i> (2002); Tanaka <i>et al.</i> (2004)
B7.1	Cancer, immunotherapy	Mouse	Isaka <i>et al.</i> (2004)

Tissue inhibitor of metalloproteinase	Cancer	Mouse	Jiang <i>et al.</i> (2001)
Metargidine	Cancer	Mouse	Trochon-Joseph <i>et al.</i> (2004)
Endostatin and derivatives (K1-5, K1-3-HAS)	Cancer	Mouse	Cichon <i>et al.</i> (2002); Martel-Renoir <i>et al.</i> (2003)
Platelet-activating factor (PAF-AH)	Atherosclerosis	Mouse	Hase <i>et al.</i> (2002)
Vascular endothelium growth factor A and B	Ischemia	Mouse	Silvestre <i>et al.</i> (2003)
Erythropoietin (EPO), and dimeric EPO fusion proteins	Anemia, β -thalassemia	Mouse, rat, rabbit	Ataka <i>et al.</i> (2003); Dalle <i>et al.</i> (2001); Kreiss <i>et al.</i> (1999); Maruyama <i>et al.</i> (2000, 2001a); Mennuni <i>et al.</i> (2004); Nordstrom (2003); Payen <i>et al.</i> (2001); Rizzuto <i>et al.</i> (1999, 2000); Samakoglu <i>et al.</i> (2001); Terada <i>et al.</i> (2001)
Insulin precursors	Diabetes	Mouse	Croze and Prud'homme (2003); Martinenghi <i>et al.</i> (2002); Wang <i>et al.</i> (2003); Yin and Tang (2001)
Insulin growth factor-1	Diabetes, muscle regeneration	Mouse	Rabinovsky and Draghia-Akli (2004); Takahashi <i>et al.</i> (2003)
CD152	Diabetes	Mouse	Prud'homme <i>et al.</i> (2002)
Carcinogenic embryonic antigen	Diabetes	Mouse	Prud'homme <i>et al.</i> (2002)
Hepatocyte growth factor	Kidney regeneration, liver regeneration, dilated cardiomyopathy, lung fibrosis	Mouse, rat, hamster	Komamura <i>et al.</i> (2004); Riera <i>et al.</i> (2004); Tanaka <i>et al.</i> (2002); Umeda <i>et al.</i> (2004); Xue <i>et al.</i> (2002)
Gastrin	Gastric disorder	Mouse, rat	Yasui <i>et al.</i> (2001)
Neurothrophin 3	Neuropathy	Mouse	Pradat <i>et al.</i> (2001)

(Continues)

Table 5.2. (Continued)

Gene	Disease	Animal	Ref.
Recombinant human thrombopoietin	Thrombocytopenia	Mouse	Zang <i>et al.</i> (2001a,b)
Factor IX	Haemophilia	Mouse, dog	Fewell <i>et al.</i> (2001)
Flt-3 ligand	<i>In vivo</i> generation of dendritic cells	Mouse	Peretz <i>et al.</i> (2002)
Iduronate-2-sulphatase	Mucopolysaccharidosis	Mouse	Tomanin <i>et al.</i> (2002)
Dystrophin, minidystrophin	Myodystrophy	Mouse	Ferrer <i>et al.</i> (2004); Gollins <i>et al.</i> (2003); Murakami <i>et al.</i> (2003); Vilquin <i>et al.</i> (2001)
Cardiostrophin	Neuron degeneration	Mouse	Lesbordes <i>et al.</i> (2002)
Proopiomelanocortin	Arthritis	Mouse, rat	Chuang <i>et al.</i> (2004)
Bone morphogenetic protein (BMP-4)	Bone formation	Mouse	Kishimoto <i>et al.</i> (2002)
Basic fibroblast growth factor	Ischemia	Rabbit	Nishikage <i>et al.</i> (2004)
VEGF receptor (Flt-1)	Peritoneal fibrosis	Mouse	Motomura <i>et al.</i> (2004)
PDGF receptor	Glomerulonephritis	Rat	Nakamura <i>et al.</i> (2001)
Recombinant mAb	Vaccination, arthritis	Mouse, rat	Adachi <i>et al.</i> (2002); Kim <i>et al.</i> (2003); Perez <i>et al.</i> (2004); Tjelle <i>et al.</i> (2004); Yang <i>et al.</i> (2003)
Virus capsid antigens	Vaccination	Mouse, rat, sheep, goat, cattle, rabbit, guinea pig	Babiuk <i>et al.</i> (2002); Bachy <i>et al.</i> (2001); Kadowaki <i>et al.</i> (2000); Nomura <i>et al.</i> (1996); Selby <i>et al.</i> (2000); Tollefsen <i>et al.</i> (2003); Widera <i>et al.</i> (2000); Wu <i>et al.</i> (2004); Zucchelli <i>et al.</i> (2000)

2001), lung epithelia (Dean *et al.*, 2003), or ovaries (Sato *et al.*, 2003), gene expression was lost within a few weeks.

B. Preclinical studies with therapeutic genes

Tables 5.2, 5.3, and 5.4 also summarize results of an extensive search for publications reporting the *in vivo* delivery of genes of therapeutic interest by means of DNA electrotransfer. Most of the experiments deal with gene transfer to the skeletal muscle in mice (Table 5.2). Experiments have been classified according to the gene used, and the main applications foreseen by their authors have been quoted. However, gene transfer of therapeutic genes to tumors (Table 5.3) and other tissues, e.g., spinal cord, skin, penile corpora cavernosa, cornea, and liver, have also been reported (Table 5.4). About 80% of the publications report experiments performed in mice; however, experiments have also been performed in rats, pigs, rabbits, hamster, guinea pigs, sheep, goats, dogs, and cattle. The experiments demonstrate the safety of the procedure and the possibility of repeating the treatment (Rizzuto *et al.*, 1999), as well as the possibility of coelectrotransferring up to three plasmids into the same skeletal muscle fibers (Martel-Renoir *et al.*, 2003).

The main application is immunotherapy, especially in tumors. Cancer treatment, correction of metabolic disorders, and correction of organ- or site-specific diseases are the three other frequent applications. Furthermore, correction of monogenetic diseases, treatment of cardiovascular diseases, and induction of analgesia are other applications found in the literature. It must be noted that each of these applications includes the use of a large variety of genes. The most frequently used genes are the ones involved in the immune system, e.g., genes encoding the interleukins (IL) 2, 10, 12, and so on. In many cases these genes have been transferred to the skeletal muscle, which has been used as a cell factory for the production of factors that will act systemically on distant targets.

For systemic proteins, therapeutic levels have been achieved after EGT into the muscle. The principal example is erythropoietin (EPO), where increases in the hematocrit level have been achieved in many cases (Ataka *et al.*, 2003; Dalle *et al.*, 2001; Kreiss *et al.*, 1999; Lamartina *et al.*, 2002; Maruyama *et al.*, 2001a; Nordstrom, 2003; Rizzuto *et al.*, 1999, 2000; Terada *et al.*, 2001). Another example is antiangiogenic factors, which, after gene transfer to the muscle, have demonstrated distant antitumor effects as well as antimetastatic effects in a murine model of B16F10 melanomas (Martel-Renoir *et al.*, 2003; Trochon-Joseph *et al.*, 2004). Moreover, noticeable elevated concentrations of the cytokines IL-2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor have been measured in tumors transfected with the corresponding genes (Heller *et al.*, 2000b). An example of correction of monogenetic diseases is the EGT of

Table 5.3. *In Vivo* Delivery of Genes to Tumors by Means of DNA Electrotransfer

Gene	Tumor ^a	Parameters	Ref.
Green fluorescent protein, luciferase, β -galactosidase	Murine melanoma, hepatocellular carcinoma, mammary tumors	6–10 $\times$ 5–50 ms, 400–800 V/cm	Bettan <i>et al.</i> (2000b); Cemazar <i>et al.</i> (2002); Heller <i>et al.</i> (2000a); Kishida <i>et al.</i> (2001); Lohr <i>et al.</i> (2001); Rols <i>et al.</i> (1998); Wells <i>et al.</i> (2000)
Interleukin-2	Murine melanoma, murine hepatoma	6 $\times$ 100 μ s, 1500 V/cm 6 $\times$ 100 μ s, 1500 V/cm	Heller and Coppola (2002) Chi <i>et al.</i> (2003); Heller <i>et al.</i> (2000b); Lohr <i>et al.</i> (2001)
Interleukin-12	Bladder, colon, and renal cancer, hepatocellular carcinoma, murine melanoma	6–10 $\times$ 50 ms, 50–200 V/cm	Heller <i>et al.</i> (2000b); Kishida <i>et al.</i> (2001, 2003); Lee <i>et al.</i> (2004); Li <i>et al.</i> (2002b); Lohr <i>et al.</i> (2001); Lucas and Heller (2003); Lucas <i>et al.</i> (2002); Tamura <i>et al.</i> (2001, 2003); Yamashita <i>et al.</i> (2001); Yu <i>et al.</i> (2004)
		or 6 $\times$ 100 μ s, 1500 V/cm	Lucas <i>et al.</i> (2002)

Interleukin-18	Murine melanoma, adenocarcinoma	6×100 ms, 100 V/cm	Kishida <i>et al.</i> (2001); Tamura <i>et al.</i> (2003)
Interferon- α	Murine melanoma	$2\text{--}6 \times 10$ ms, 400 V/cm	Heller <i>et al.</i> (2002); Li <i>et al.</i> (2002a)
Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	Human esophageal tumors, murine melanoma	n.d.	Chi <i>et al.</i> (2003); Heller <i>et al.</i> (2000b); Matsubara <i>et al.</i> (2001a)
Herpes simplex virus – thymidine kinase	Adenocarcinoma, mammary carcinoma, bladder carcinoma	8×50 ms, 66 V/cm, 8×20 ms, 200 V/cm, 50 ms, 300 V/cm	Goto <i>et al.</i> (2000) Shibata <i>et al.</i> (2002b) Hsieh <i>et al.</i> (2003); Shibata <i>et al.</i> (2002a)
p53	Human prostata cancer, colorectal carcinoma, human esophageal cancer	8×99 μ s, 1 kV/cm 8×5 ms, 600 V/cm 8×20 ms, 500 V/cm	Cemazar <i>et al.</i> (2003); Matsubara <i>et al.</i> (2001b); Mikata <i>et al.</i> (2002)
Antisense methylated-DNA- binding protein-2	Non-small cell lung cancer		Ivanov <i>et al.</i> (2003); Slack <i>et al.</i> (2002)
Endostatin	Murine melanoma	100 ms, 700 V/cm	Cichon <i>et al.</i> (2002)
Stat3	Murine melanoma	14×100 μ s, 1500 V/cm	Niu <i>et al.</i> (1999)
Diphtheria toxin	Gliomas (in rats)	n.d.	Yoshizato <i>et al.</i> (2000)

^aUnless otherwise stated, tumors were transplanted in immunocompetent or immunodeficient mice.

^bn.d. = not described.

Table 5.4. Electro Gene Transfer in Various Tissues Except Muscle and Tumor

Tissue (animal)	Gene	Parameters	Duration of expression	Fold increase in Luc expression ^a	Ref.
Liver (mouse, rat)	GFP, Luc, β -gal, bcl-xs	$8 \times 20\text{--}50$ ms, 250 V/cm, 1 Hz or 6×99 μ s, 1000 V/cm, 1 Hz	3 weeks to 60 days	5-fold to 4 log	Baba <i>et al.</i> (2001); Heller <i>et al.</i> (1996); Liu and Huang (2002b); Suzuki <i>et al.</i> (1998)
Skin (rat)	GFP, Luc, IL-12, EPO	10×5 ms, 560 V/cm or 6×60 ms, 80-V bipolar pulses, 4 Hz	7 days	4-fold to 2 log	Babiuk <i>et al.</i> (2003); Dujardin <i>et al.</i> (2001); Heller <i>et al.</i> (2001); Maruyama <i>et al.</i> (2001b)
Bladder (rat)	GFP, Luc, β -gal	8×50 ms, 225 V/cm, 1 Hz	n.d.	1–2 log	Harimoto <i>et al.</i> (1998); Iwashita <i>et al.</i> (2004)
Kidney (rat)	Luc, β -gal, TGF- β , ^d PDGF ^f	6×50 ms, 100 V, ^b 1 Hz	n.d.	8-fold compared to liposome transfection	Isaka <i>et al.</i> (2004); Nakamura <i>et al.</i> (2001); Tsujie <i>et al.</i> (2004)
Testis (mouse)	GFP, Luc, β -gal	$8 \times 5\text{--}50$ ms, 50 V ^{b,c}	At least 1 month		Muramatsu <i>et al.</i> (1997); Widlak <i>et al.</i> (2003); Yamazaki <i>et al.</i> (1998)
Penile corpus cavernosus (rat)	β -gal, NOS ^e	8×40 ms, 200 V/cm, 1 Hz	56 days		Magee <i>et al.</i> (2002)
Ovary (mouse)	β -gal	8×50 ms, 50 V ^{b,c}	2 weeks		Sato <i>et al.</i> (2003)
Lung (mouse)	Luc, β -gal	8×10 ms, 200 V/cm, 1 Hz	7 days	2–3 log	Dean <i>et al.</i> (2003)
Spleen (mouse)	Luc, SEAP	6×20 ms, 500 V/cm, 1–2 Hz	at least 30 days		Tupin <i>et al.</i> (2003)

Tendon (mouse, rat, rabbit)	β -gal	10 ms, 200 V ^b or 100 μ s, 1200 V, ^b 1 Hz	42 days		Jayankura <i>et al.</i> (2003)
Vessels – mesenteric artery (rat)	GFP, Luc, β -gal	8×10 ms, 200 V/cm ^c	5 days	2 log	Martin <i>et al.</i> (2000); Matsumoto <i>et al.</i> (2001)
Cartilage (rat)	GFP	8×20 ms, 250 V/cm, ^c 1 Hz	at least 2 months		Grossin <i>et al.</i> (2003)
Brain – periventricular region (rat)	GFP	1×50 ms, 500–1000 V/cm	2 weeks		Kondoh <i>et al.</i> (2000)
Spinal cord (rat)	GFP, POMC	5×50 ms, 200 V, ^b 1 Hz	2–3 weeks		Lee <i>et al.</i> (2003b); Lin <i>et al.</i> (2002a,b)
Synovium (rat)	Luc	6×100 ms, 215-V/cm bipolar pulses, 1 Hz	2 weeks	3 log	Ohashi <i>et al.</i> (2002)
Cornea (rat)	GFP, Luc, tPA	8×50 ms, 400 V/cm ^c	7–21 days	3 log	Blair-Parks <i>et al.</i> (2004); Oshima <i>et al.</i> (1998); Sakamoto <i>et al.</i> (1999)
Retinal ganglion cells (rat)	GFP	10×99 ms, 12 V/cm, 1 Hz	At least 21 days		Dezawa <i>et al.</i> (2002)
Retina (mouse, rat)	GFP	5×50 ms, 100 V, ^b 1 Hz	At least 50 days		Matsuda and Cepko (2004)
Nostrils, nasal mucosa (mouse)	Influenza virus HA	3×100 ms, 200 V/cm, 1 Hz	n.d.		Kadowaki <i>et al.</i> (2000)
Adipocytes	GFP	7×20 ms, 50 V, ^b 2 Hz	n.d.		Granneman <i>et al.</i> (2004)
Teeth (dog)	GFP	10×1 ms, 10 V, ^b 1 Hz	n.d.		Nakashima <i>et al.</i> (2002)
Embryonic chick heart	GFP	12 triplets of 10-ms pulses 10 s apart (5 min between triplets), 200 V/cm	n.d.		Harrison <i>et al.</i> (1998)
Embryonic mouse brain	GFP	5×50 ms, 50 V ^{b,c}	n.d.		Saito and Nakatsuji (2001)

(Continues)

Table 5.4. (Continued)

Tissue (animal)	Gene	Parameters	Duration of expression	Fold increase in Luc expression ^a	Ref.
Mononuclear cells (<i>in vivo</i>)	GFP	10 trains (at 1 Hz) of 1000 bipolar pulses of 400 μ s, 150 V/cm	n.d.		Grønevik et al. (2004)
Oviduct (laying hens)	Chloramphenicol acetyltransferase, EPO	5 $\times$ 50 ms, 50 V ^{b,c}	n.d.		Ochiai et al. (1998)

^aFold increase with respect to injection alone is reported only for data concerning luciferase because only this reporter gene allows precise quantitative efficacy determination.

^bV, not V/cm, is reported because tweezer electrodes were used in these experiments, and the authors did not report precisely the distance between the electrodes. To make experiments reproducible and to obtain less variable results, it is recommended to measure the distance between the electrodes or to use a fixed distance between the electrodes. Moreover, it is recalled that the achievement of a homogeneous electric field needs the use of parallel electrodes.

^cThe frequency of pulse delivery was not reported in these studies.

^dTransforming growth factor- β .

^eNitric oxide synthase.

^fPlatelet-derived growth factor.

^gn.d. = not described.

minidystrophin into myodystrophic muscles, followed by the improvement of motor function in the treated muscle (Murakami *et al.*, 2003; Vilquin *et al.*, 2001).

V. PERSPECTIVES FOR CLINICAL USE OF ELECTRO GENE TRANSFER

Already at this time, extensive knowledge on the use of electroporation in the treatment of cancer patients has been accumulated (Gothelf *et al.*, 2003; Sersa *et al.*, 2003). Certain cytostatic drugs have a poor penetrance of the cell membrane, and electroporation can be used to cause increased access to the cell cytosol in an area with tumor tissue. Two drugs have been used: bleomycin [as reviewed by Gothelf *et al.* (2003)] and cisplatinum [as reviewed by Sersa *et al.* (2003)]. The experience is that electroporation can be performed using local anesthesia, with very limited side effects. The treatment can be performed as an out-patient regimen with an electroporator approved for clinical use.

Therefore, the road for electrogenotherapy is already paved. With modification of the pulses to be used, the treatment protocols for electrochemotherapy can essentially be transferred to EGT in the clinical setting.

There are several interesting strategies to pursue.

- Production of missing proteins. EGT offers the possibility to transfect one tissue for use as a protein factory for erythropoietin or coagulation factors. The obvious candidate tissue for this would be the muscle.
- Vaccination. Short-term expression of an antigen can be obtained through EGT to skin.
- Cancer therapy. Gene transfer to tumors can be envisaged for (1) paracrine secretion of cytokines, (2) genes coding for costimulatory molecules, or (3) local secretion of toxic products.

VI. CONCLUSION

In conclusion, DNA electrotransfer or electrogenotherapy constitutes a real alternative to viral approaches for gene transfer *in vivo*. Its efficacy is proven and there is no doubt about its biological safety. Moreover, DNA preparation is easy and secure, the roles of the electric pulses are described, the control of transfer conditions is achievable, and appropriate equipment is available.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of the Danish Medical Research Council, CNRS, IGR, AFM (Association Française contre les Myopathies), and the EU Commission through the projects Cliniporator (QLK3-1999-00484) and Esope (QLK3-2002-02003) coordinated by L.M.M. The authors also acknowledge all their colleagues for fruitful discussions and collaborative work. F.A. is the recipient of an "aide aux études" from the AFM.

References

- Adachi, O., Nakano, A., Sato, O., Kawamoto, S., Tahara, H., Toyoda, N., Yamato, E., Matsumori, A., Tabayashi, K., and Miyazaki, J. (2002). Gene transfer of Fc-fusion cytokine by *in vivo* electroporation: Application to gene therapy for viral myocarditis. *Gene Ther.* **9**, 577–583.
- Aihara, H., and Miyazaki, J. (1998). Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nature Biotechnol.* **16**, 867–870.
- Andre, F., and Mir, L. M. (2004). DNA electrotransfer: Its principles and an updated review of its therapeutic applications. *Gene Ther.* **11**(1), S33–S42.
- Ataka, K., Maruyama, H., Neichi, T., Miyazaki, J., and Gejko, F. (2003). Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure. *Am. J. Nephrol.* **23**, 315–323.
- Aurisicchio, L., Ceccacci, A., La Monica, N., Palombo, F., and Traboni, C. (2001). Tamarin alpha-interferon is active in mouse liver upon intramuscular gene delivery. *J. Gene Med.* **3**, 394–402.
- Baba, M., Iishi, H., and Tatsuta, M. (2001). Transfer of bcl-xs plasmid is effective in preventing and inhibiting rat hepatocellular carcinoma induced by N-nitrosomorpholine. *Gene Ther.* **8**, 1149–1156.
- Babiuk, S., Baca-Estrada, M. E., Foldvari, M., Storms, M., Rabussay, D., Widera, G., and Babiuk, L. (2002). Electroporation improves the efficacy of DNA vaccines in large animals. *Vaccine* **20**, 3399–3408.
- Babiuk, S., Baca-Estrada, M. E., Foldvari, M., Baizer, L., Stout, R., Storms, M., Rabussay, D., Widera, G., and Babiuk, L. (2003). Needle-free topical electroporation improves gene expression from plasmids administered in porcine skin. *Mol. Ther.* **8**, 992–998.
- Bachy, M., Boudet, F., Bureau, M., Girerd-Chambaz, Y., Wils, P., Scherman, D., and Meric, C. (2001). Electric pulses increase the immunogenicity of an influenza DNA vaccine injected intramuscularly in the mouse. *Vaccine* **19**, 1688–1693.
- Bettan, M., Emmanuel, F., Darteil, R., Caillaud, J. M., Soubrier, F., Delaère, P., Branelec, D., Mahfoudi, A., Duverger, N., and Scherman, D. (2000a). High-level protein secretion into blood circulation after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *Mol. Ther.* **2**, 204–210.
- Bettan, M., Ivanov, M.-A., Mir, L. M., Boissiere, F., Delaere, P., and Scherman, D. (2000b). Efficient DNA electrotransfer into tumors. *Bioelectrochemistry* **52**, 83–90.
- Blair-Parks, K., Weston, B. C., and Dean, D. A. (2004). High-level gene transfer to the cornea using electroporation. *J. Gene Med.* **4**, 92–100.
- Bureau, M. F., Gehl, J., Deleuze, V., Mir, L. M., and Scherman, D. (2000). Importance of association between permeabilisation and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 353–359.
- Cemazar, M., Grosel, A., Glavac, D., Kotnik, V., Skobrne, M., Kranjc, S., Mir, L. M., Andre, F., Opolon, P., and Sersa, G. (2003). Effects of electrogenetherapy with p53wt combined with cisplatin on curvival of human tumor cell lines with different p53 status. *DNA Cell Biol.* **22**, 765–775.

- Cemazar, M., Sersa, G., Wilson, J., Tozer, G., Hart, S., Grosel, A., and Dachs, G. (2002). Effective gene transfer to solid tumors using different non-viral gene delivery techniques: Electroporation, liposomes, and integrin-targeted vector. *Cancer Gene Ther.* **9**, 399–406.
- Chi, C. H., Wang, Y. S., Lai, Y. S., and Chi, K. H. (2003). Anti-tumor effect of *in vivo* IL-2 and GM-CSF electrogene therapy in murine hepatoma model. *Anticancer Res.* **23**, 315–321.
- Chuang, I. C., Jhao, C. M., Yang, C. H., Chang, H. C., Wang, C. W., Lu, C. Y., Chang, Y. J., Lin, S. H., Huang, P. L., and Yang, L. C. (2004). Intramuscular electroporation with the pro-opiomelanocortin gene in rat adjuvant arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **6**, R7–R14.
- Cichon, T., Jamroz, L., Glogowska, J., Missol-Kolka, E., and Szala, S. (2002). Electrotransfer of gene encoding endostatin into normal and neoplastic mouse tissues: Inhibition of primary tumor growth and metastatic spread. *Cancer Gene Ther.* **9**, 771–777.
- Cröze, F., and Prud'homme, G. J. (2003). Gene therapy of streptozotocin-induced diabetes by intramuscular delivery of modified preproinsulin genes. *J. Gene Med.* **5**, 425–437.
- Dalle, B., Henri, A., Rouyer-Fessard, P., Bettan, M., Scherman, D., Beuzard, Y., and Payen, E. (2001). Dimeric erythropoietin fusion protein with enhanced erythropoietic activity *in vitro* and *in vivo*. *Blood* **97**, 3776–3782.
- Dean, D. A., Machado-Aranda, D., Blair-Parks, K., Yeldandi, A. V., and Young, J. L. (2003). Electroporation as a method for high-level non-viral gene transfer to the lung. *Gene Ther.* **10**, 1608–1615.
- Dekeyser, R. A., Claes, B., De Rycke, R., Habets, M. E., Van Montagne, M. C., and Caplan, H. B. (1990). Transient gene expression in the intact and organized rice tissues. *Plant Cell* **2**, 591–602.
- Deleuze, V., Lefort, J., Bureau, M. F., Scherman, D., and Vargaftig, B. B. (2004). LPS-induced bronchial hyperreactivity: Interference by mIL-10 differs according to site of delivery. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **286**, L98–L105.
- Deleuze, V., Scherman, D., and Bureau, M. F. (2002). Interleukin-10 expression after intramuscular DNA electrotransfer: Kinetic studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 29–34.
- Dezawa, M., Takano, M., Negishi, H., Mo, X., Oshitari, T., and Sawada, H. (2002). Gene transfer into retinal ganglion cells by *in vivo* electroporation: A new approach. *Micron* **33**, 1–6.
- Dujardin, N., Van der Smissen, P., and Preat, V. (2001). Topical gene transfer into rat skin using electroporation. *Pharm. Res.* **18**, 61–66.
- Faurie, C., Golzio, M., Moller, P., Teissie, J., and Rols, M. P. (2004). Cell and animal imaging of electrically mediated gene transfer. *DNA Cell Biol.* **22**, 777–783.
- Ferrer, A., Foster, H., Wells, K. E., Dickson, G., and Wells, D. J. (2004). Long-term expression of full-length human dystrophin in transgenic mdx mice expressing internally deleted human dystrophins. *Gene Ther.* **11**, 884–893.
- Fewell, J. G., MacLaughlin, F., Mehta, V., Gondo, M., Nicol, F., Wilson, E., and Smith, L. C. (2001). Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol. Ther.* **3**, 574–583.
- Furth, P. A., Shamay, A., Wall, R. J., and Hennighausen, L. (1992). Gene transfer into somatic tissues by jet injection. *Anal. Biochem.* **205**, 365–368.
- Gabriel, B., and Teissie, J. (1997). Direct observation in the millisecond time range of fluorescent molecule asymmetrical interaction with the electroporated cell membrane. *Biophys. J.* **73**, 2630–2637.
- Gehl, J., Skovsgaard, T., and Mir, L. M. (2002). Vascular reactions to *in vivo* electroporation: characterization and consequences for drug and gene delivery. *Biochim. Biophys. Acta* **1569**, 51–58.
- Gehl, J., and Mir, L. M. (1999). Determination of optimal parameters for *in vivo* gene transfer by electroporation, using a rapid *in vivo* test for cell permeabilization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 377–380.

- Gehl, J., Sorensen, T. H., Nielsen, K., Raskmark, P., Nielsen, S. L., Skovsgaard, T., and Mir, L. M. (1999). *In vivo* electroporation of skeletal muscle: Threshold, efficacy and relation to electric field distribution. *Biochim. Biophys. Acta* **1428**, 233–240.
- Gilbert, R. A., Jaroszeski, M. J., and Heller, R. (1997). Novel electrode designs for electrochemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1334**, 9–14.
- Godon, C., Caboche, M., and Daniel-Vedele, F. (1993). Transient plant gene expression: A simple and reproducible method based on flowing particle gun. *Biochimie* **75**, 591–595.
- Gollins, H., McMahon, J., Wells, K. E., and Wells, D. J. (2003). High-efficiency plasmid gene transfer into dystrophic muscle. *Gene Ther.* **10**, 504–512.
- Gothelf, A., Mir, L. M., and Gehl, J. (2003). Electrochemotherapy: Results of cancer treatment using enhanced delivery of bleomycin by electroporation. *Cancer Treat. Rev.* **29**, 371–387.
- Goto, T., Nishi, T., Tamura, T., Dev, S. B., Takeshima, H., Kochi, M., Yoshizato, K., Kuratsu, J., Sakata, T., Hofmann, G. A., and Ushio, Y. (2000). Highly efficient electro-gene therapy of solid tumor by using an expression plasmid for the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 354–359.
- Granneman, J. G., Li, P., Lu, Y., and Tilak, J. (2004). Seeing the trees in the forest: Selective electroporation of adipocytes within adipose tissue. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **287**(3), E574–E582.
- Grønnevik, E., Tollefsen, S., Sikkeland, L., Haug, T., Tjelle, T. E., and Mathiesen, I. (2004). DNA transfection of mononuclear cells in muscle tissue. *J. Gene Med.* **5**, 909–917.
- Grossin, L., Gaborit, N., Mir, L. M., Netter, P., and Gillet, P. (2003). Gene therapy in cartilage using electroporation. *Joint Bone Spine* **70**, 480–482.
- Harimoto, K., Sugimura, K., Lee, C. R., Kuratsukuri, K., and Kishimoto, T. (1998). *In vivo* gene transfer methods in the bladder without viral vectors. *Br. J. Urol.* **81**, 870–874.
- Harrison, R. L., Byrne, B. J., and Tung, L. (1998). Electroporation-mediated gene transfer in cardiac tissue. *FEBS Lett.* **435**, 1–5.
- Hase, M., Tanaka, M., Yokota, M., and Yamada, Y. (2002). Reduction in the extent of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice induced by electroporation-mediated transfer of the human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase gene into skeletal muscle. *Prostagland. Other Lipid Mediat.* **70**, 107–118.
- Heller, L., and Coppola, D. (2002). Electrically mediated delivery of vector plasmid DNA elicits an antitumour effect. *Gene Ther.* **9**, 1321–1325.
- Heller, L., Jaroszeski, M. J., Coppola, D., Pottinger, C., Gilbert, R., and Heller, R. (2000a). Electrically mediated plasmid DNA delivery to hepatocellular carcinomas. *in vivo. Gene Ther.* **7**, 826–829.
- Heller, L., Pottinger, C., Jaroszeski, M. J., Gilbert, R., and Heller, R. (2000b). *In vivo* electroporation of plasmids encoding GM-CSF or interleukin-2 into existing B16 melanomas combined with electrochemotherapy induces long-term antitumour immunity. *Melanoma Res.* **10**, 577–583.
- Heller, L. C., Ingram, S. F., Lucas, M. L., Gilbert, R. A., and Heller, R. (2002). Effect of electrically mediated intratumor and intramuscular delivery of a plasmid encoding IFN alpha on visible B16 mouse melanomas. *Technol. Cancer Res. Treat.* **1**, 205–209.
- Heller, R., Jaroszeski, M. J., Atkin, A., Moradpour, D., Gilbert, R. A., Wands, J., and Nicolau, C. (1996). *In vivo* gene electroinjection and expression in rat liver. *FEBS Lett.* **389**, 225–228.
- Heller, R., Schultz, J., Lucas, M. L., Jaroszeski, M. J., Heller, L. C., Gilbert, R. A., Moelling, K., and Nicolau, C. (2001). Intradermal delivery of interleukin-12 plasmid DNA by *in vivo* electroporation. *DNA Cell Biol.* **20**, 21–26.
- Hoover, F., and Kalhovde, J. M. (2000). A double-injection DNA electroporation protocol to enhance *in vivo* gene delivery in skeletal muscle. *Anal. Biochem.* **285**, 175–178.
- Horiki, M., Yamato, E., Noso, S., Ikegami, H., Ogihara, T., and Miyazaki, J. (2003). High-level expression of interleukin-4 following electroporation-mediated gene transfer accelerates type 1 diabetes in NOD mice. *J. Autoimmun.* **20**, 111–117.

- Hsieh, Y. H., Wu, C. J., Chow, K. P., Tsai, C. L., and Chang, Y. S. (2003). Electroporation-mediated and EBV LMP1-regulated gene therapy in a syngenic mouse tumor model. *Cancer Gene Ther.* **10**, 626–636.
- Isaka, Y., Nakamura, H., Mizui, M., Takabatake, Y., Horio, M., Kawachi, Shimizu, F., Imai, E., and Hori, M. (2004). DNazyme for TGF-beta suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* **66**, 586–590.
- Ivanov, M. A., Lamrihi, B., Szyf, M., Scherman, D., and Bigey, P. (2003). Enhanced antitumor activity of a combination of MBD2-antisense electrotransfer gene therapy and bleomycin electrochemotherapy. *J. Gene Med.* **5**, 893–899.
- Iwashita, H., Yoshida, M., Nishi, T., Otani, M., and Ueda, S. (2004). *In vivo* transfer of a neuronal nitric oxide synthase expression vector into the rat bladder by electroporation. *BJU Int.* **93**, 1098–1103.
- Jayankura, M., Boggione, C., Frisén, C., Boyer, O., Fouret, P., Saillant, G., and Klatzmann, D. (2003). *In situ* gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J. Gene Med.* **5**, 618–624.
- Jiang, Y., Wang, M., Celiker, M. Y., Liu, Y. E., Sang, Q. X., Goldberg, I. D., and Shi, Y. E. (2001). Stimulation of mammary tumorigenesis by systemic tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 4 gene delivery. *Cancer Res.* **61**, 2365–2370.
- Kadowaki, S., Chen, Z., Asanuma, H., Aizawa, C., Kurata, T., and Tamura, S. (2000). Protection against influenza virus infection in mice immunized by administration of hemagglutinin-expressing DNAs with electroporation. *Vaccine* **18**, 2779–2788.
- Kim, J. M., Ho, S. H., Hahn, W., Jeong, J. G., Park, E. J., Lee, H. J., Yu, S. S., Lee, C. S., Lee, Y. W., and Kim, S. (2003). Electro-gene therapy of collagen-induced arthritis by using an expression plasmid for the soluble p75 tumor necrosis factor receptor-Fc fusion protein. *Gene Ther.* **10**, 1216–1224.
- Kishida, T., Asada, H., Itokawa, Y., Yasutomi, K., Shin-Ya, M., Gojo, S., Cui, F. D., Ueda, Y., Yamagishi, H., Imanishi, J., and Mazda, O. (2003). Electrochemo-gene therapy of cancer: Intratumoral delivery of interleukin-12 gene and bleomycin synergistically induced therapeutic immunity and suppressed subcutaneous and metastatic melanomas in mice. *Mol. Ther.* **8**, 738–745.
- Kishida, T., Asada, H., Satoh, E., Tanaka, S., Shinya, M., Hirai, H., Iwai, M., Tahara, H., Imanishi, J., and Mazda, O. (2001). *In vivo* electroporation-mediated transfer of interleukin-12 and interleukin-18 genes induces significant antitumor effects against melanoma in mice. *Gene Ther.* **8**, 1234–1240.
- Kishimoto, K. N., Watanabe, Y., Nakamura, H., and Kokubun, S. (2002). Ectopic bone formation by electroporatic transfer of bone morphogenetic protein-4 gene. *Bone* **31**, 340–347.
- Komamura, K., Tatsumi, R., Miyazaki, J., Matsumoto, K., Yamato, E., Nakamura, T., Shimizu, Y., Nakatani, T., Kitamura, S., Tomoike, H., Kitakaze, M., Kangawa, K., and Miyatake, K. (2004). Treatment of dilated cardiomyopathy with electroporation of hepatocyte growth factor gene into skeletal muscle. *Hypertension* **44**(3), 365–371.
- Kondoh, T., Motooka, Y., Bhattacharjee, A. K., Kokunai, T., Saito, N., and Tamaki, N. (2000). *In vivo* gene transfer into the periventricular region by electroporation. *Neurol. Med Chir.* **40**, 618–622.
- Kreiss, P., Bettan, M., Crouzet, J., and Scherman, D. (1999). Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *J. Gene Med.* **1**, 245–250.
- Lamartina, S., Roscilli, G., Rinaudo, C. D., Sporeno, E., Silvi, L., Hillen, W., Bujard, H., Cortese, R., Ciliberto, G., and Toniatti, C. (2002). Stringent control of gene expression *in vivo* by using novel doxycycline-dependent trans-activators. *Hum. Gene Ther.* **13**, 199–210.
- Lee, C. F., Chang, S. Y., Hsieh, D. S., and Yu, D. S. (2004). Immunotherapy for bladder cancer using recombinant bacillus Calmette-Guerin DNA vaccines and interleukin-12 DNA vaccine. *J. Urol.* **171**, 1343–1347.

- Lee, S. C., Wu, C. J., Wu, P. Y., Huang, Y. L., Wu, C. W., and Tao, M. H. (2003a). Inhibition of established subcutaneous and metastatic murine tumors by intramuscular electroporation of the interleukin-12 gene. *J. Biomed. Sci.* **10**, 73–86.
- Lee, T. H., Yang, L. C., Chou, A. K., Wu, P. C., Lin, C. R., Wang, C. H., Chen, J. T., and Tang, C. S. (2003b). *In vivo* electroporation of proopiomelanocortin induces analgesia in a formalin-injection pain model in rats. *Pain* **104**, 159–167.
- Lesbordes, J. C., Bordet, T., Haase, G., Castelnau-Ptakhine, L., Rouhani, S., Gilgenkrantz, H., and Kahn, A. (2002). *In vivo* electrotransfer of the cardiotrophin-1 gene into skeletal muscle slows down progression of motor neuron degeneration in pmn mice. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1615–1625.
- Li, S., Xia, X., Zhang, X., and Suen, J. (2002a). Regression of tumors by IFN- α electroporation gene therapy and analysis of the responsible genes by cDNA array. *Gene Ther.* **9**, 390–397.
- Li, S., Zhang, X., and Xia, X. (2002b). Regression of tumor growth and induction of long-term antitumor memory by interleukin 12 electro-gene therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 762–768.
- Li, S., Zhang, X., Xia, X., Zhou, L., Breau, R., Suen, J., and Hanna, E. (2001). Intramuscular electroporation delivery of IFN- α gene therapy for inhibition of tumor growth located at a distant site. *Gene Ther.* **8**, 400–407.
- Lin, C. R., Tai, M. H., Cheng, J. T., Zhou, A. K., Yang, J. J., Tan, P. H., Marsala, M., and Yang, L. C. (2002a). Electroporation for direct spinal gene transfer in rats. *Neurosci. Lett.* **317**, 1–4.
- Lin, C. R., Yang, L. C., Lee, T. H., Lee, C. T., Huang, H. T., Sun, W. Z., and Cheng, J. T. (2002b). Electroporation-mediated pain-killer gene therapy for mononeuropathic rats. *Gene Ther.* **9**, 1247–1253.
- Liu, F., and Huang, L. (2002a). A syringe electrode device for simultaneous injection of DNA and electrotransfer. *Mol. Ther.* **5**, 323–328.
- Liu, F., and Huang, L. (2002b). Electric gene transfer to the liver following systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **9**, 1116–1119.
- Liu, F., Song, Y., and Liu, D. (1999). Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. *Gene Ther.* **6**, 1258–1266.
- Lohr, F., Lo, D. Y., Zaharoff, D. A., Hu, K., Zhang, X., Li, Y., Zhao, Y., Dewhirst, M. W., Yuan, F., and Li, C. Y. (2001). Effective tumor therapy with plasmid-encoded cytokines combined with *in vivo* electroporation. *Cancer Res.* **61**, 3281–3284.
- Lucas, M. L., and Heller, R. (2001). Immunomodulation by electrically enhanced delivery of plasmid DNA encoding IL-12 to murine skeletal muscle. *Mol. Ther.* **3**, 47–53.
- Lucas, M. L., and Heller, R. (2003). IL-12 gene therapy using an electrically mediated non-viral approach reduces metastatic growth of melanoma. *DNA Cell Biol.* **22**, 755–763.
- Lucas, M. L., Heller, L., Coppola, D., and Heller, R. (2002). IL-12 plasmid delivery by *in vivo* electroporation for the successful treatment of established subcutaneous B16.F10 melanoma. *Mol. Ther.* **5**, 668–675.
- Magee, T. R., Ferrini, M., Garban, H.J., Vernet, D., Mitani, K., Rajfer, J., and Gonzalez-Cadavid, N. F. (2002). Gene therapy of erectile dysfunction in the rat with penile neuronal nitric oxide synthase. *Biol. Rep.* **67**, 1032–1041.
- Mallat, Z., Corbaz, A., Scoazec, A., Graber, P., Alouani, S., Esposito, B., Humbert, Y., Chvatchko, Y., and Tedgui, A. (2001). Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ. Res.* **89**, 41–45.
- Mallat, Z., Silvestre, J. S., Le Ricousse-Roussanne, S., Lecomte-Raclet, L., Corbaz, A., Clergue, M., Duriez, M., Barateau, V., Akira, S., Tedgui, A., Tobelem, G., Chvatchko, Y., and Levy, B. I. (2002). Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signaling modulates ischemia-induced neovascularization in mice hindlimb. *Circ. Res.* **91**, 441–448.
- Martel-Renoir, D., Trochon-Joseph, V., Galaup, A., Bouquet, C., Griscelli, F., Opolon, P., Opolon, D., Connault, E., Mir, L. M., and Perricaudet, M. (2003). Coelectrotransfer to skeletal muscle of three plasmids coding for antiangiogenic factors and regulatory factors of the tetracycline-inducible

- system: Tightly regulated expression, inhibition of transplanted tumor growth, and antimetastatic effect. *Mol. Ther.* **8**, 425–433.
- Martin, J. B., Young, J. L., Benoit, J. N., and Dean, D. A. (2000). Gene transfer to intact mesenteric arteries by electroporation. *J. Vasc. Res.* **37**, 372–380.
- Martinenghi, S., Cusella De Angelis, G., Biressi, S., Amadio, S., Bifari, F., Roncarolo, M. G., Bordignon, C., and Falqui, L. (2002). Human insulin production and amelioration of diabetes in mice by electrotransfer-enhanced plasmid DNA gene transfer to the skeletal muscle. *Gene Ther.* **9**, 1429–1437.
- Maruyama, H., Ataka, K., Gejyo, F., Higuchi, N., Ito, Y., Hirahara, H., Imazeki, I., Hirata, M., Ichikawa, F., Neichi, T., Kikuchi, H., Sugawa, M., and Miyazaki, J. (2001a). Long-term production of erythropoietin after electroporation-mediated transfer of plasmid DNA into the muscles of normal and uremic rats. *Gene Ther.* **8**, 461–468.
- Maruyama, H., Ataka, K., Higuchi, N., Sakamoto, F., Gejyo, F., and Miyazaki, J. (2001b). Skin-targeted gene transfer using *in vivo* electroporation. *Gene Ther.* **8**, 1808–1812.
- Maruyama, H., Sugawa, M., Moriguchi, Y., Imazeki, I., Ishikawa, Y., Ataka, K., Hasegawa, S., Ito, Y., Higuchi, N., Kazama, J. J., Gejyo, F., and Miyazaki, J. I. (2000). Continuous erythropoietin delivery by muscle-targeted gene transfer using *in vivo* electroporation. *Hum. Gene Ther.* **11**, 429–437.
- Mathiesen, I. (1999). Electroporomeabilisation of skeletal muscle enhances gene transfer *in vivo*. *Gene Ther.* **6**, 508–514.
- Matsubara, H., Gunji, Y., Maeda, T., Tasaki, K., Koide, Y., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., and Tagawa, M. (2001a). Electroporation-mediated transfer of cytokine genes into human esophageal tumors produces anti-tumor effects in mice. *Anticancer Res.* **21**, 2501–2503.
- Matsubara, H., Maeda, T., Gunji, Y., Koide, Y., Asano, T., Ochiai, T., Sakiyama, S., and Tagawa, M. (2001b). Combinatory anti-tumor effects of electroporation-mediated chemotherapy and wild-type p53 gene transfer to human esophageal cancer cells. *Int. J. Oncol.* **18**, 825–829.
- Matsuda, T., and Cepko, C. L. (2004). Electroporation and RNA interference in the rodent retina *in vivo* and *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16–22.
- Matsumoto, T., Komori, K., Shoji, T., Kuma, S., Kume, M., Yamaoka, T., Mori, E., Furuyama, T., Yonemitsu, Y., and Sugimachi, K. (2001). Successful and optimized *in vivo* gene transfer to rabbit carotid artery mediated by electronic pulse. *Gene Ther.* **8**, 1174–1179.
- Mennuni, C., Calvaruso, F., Zampaglione, I., Rizzuto, G., Rinaudo, C. D., Dammassa, E., Ciliberto, G., Fattori, E., and La Monica, N. (2004). Hyaluronidase increases electrogene transfer efficiency in skeletal muscle. *Hum. Gene Ther.* **13**, 355–365.
- Mikata, K., Uemura, H., Ohuchi, H., Ohta, S., Nagashima, Y., and Kubota, Y. (2002). Inhibition of growth of human prostate cancer xenograft by transfection of p53 gene: Gene transfer by electroporation. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 247–252.
- Miklavcic, D., Semrov, D., Mekid, H., and Mir, L. M. (2000). A validated model of *in vivo* electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1523**, 73–83.
- Mir, L. M., Bureau, M. F., Gehl, J., Rangara, R., Rouy, D., Caillaud, J. M., Delaere, P., Branellec, D., Schwartz, B., and Scherman, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 4262–4267.
- Mir, L. M., Bureau, M. F., Rangara, R., Schwartz, B., and Scherman, D. (1998). Long term, high level *in vivo* gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle. *C. R. Acad. Sci. Paris* **321**, 893–899.
- Motomura, Y., Kanbayashi, H., Khan, W. I., Deng, Y., Blennerhassett, P. A. M. P. J., Gaudie, J., Egashira, K., and Collins, S. M. (2005). The gene transfer of soluble VEGF type 1 receptor (Flt-1) attenuates peritoneal fibrosis formation in mice but not soluble TGF-beta type II receptor gene transfer. *Am. J. Gastrointest. Liver Physiol.* **288**(1), G143–G150.

- Murakami, T., Nishi, T., Kimura, E., Goto, T., Maeda, Y., Ushio, Y., Uchino, M., and Sunada, Y. (2003). Full-length dystrophin cDNA transfer into skeletal muscle of adult mdx mice by electroporation. *Muscle Nerve* **27**, 237–241.
- Muramatsu, T., Shibata, O., Ryoki, S., Ohmori, Y., and Okumura, J. (1997). Foreign gene expression in the mouse testis by localized *in vivo* gene transfer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**, 45–49.
- Nakamura, H., Isaka, Y., Tsujie, M., Akagi, Y., Sudo, T., Ohno, N., Imai, E., and Hori, M. (2001). Electroporation-mediated PDGF receptor-IgG chimera gene transfer ameliorates experimental glomerulonephritis. *Kidney Int.* **59**, 2134–2145.
- Nakano, A., Matsumori, A., Kawamoto, S., Tahara, H., Yamato, E., Sasayama, S., and Miyazaki, J. I. (2001). Cytokine gene therapy for myocarditis by *in vivo* electroporation. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1289–1297.
- Nakashima, M., Mizunuma, K., Murakami, T., and Akamine, A. (2002). Induction of dental pulp stem cell differentiation into odontoblasts by electroporation-mediated gene delivery of growth/differentiation factor 11 (Gdf11). *Gene Ther.* **9**, 814–818.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y., and Hofschneider, H. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* **1**, 841–845.
- Nishikage, S., Koyama, H., Miyata, T., Ishii, S., Hamada, H., and Shigematsu (2004). *In vivo* electroporation enhances plasmid-based gene transfer of basic fibroblast growth factor for the treatment of ischemia. *J. Surg. Res.* **120**, 37–46.
- Niu, G., Heller, R., Catlett-Falcone, R., Coppola, D., Jaroszeski, M., Dalton, W., Jove, R., and Yu, H. (1999). Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor *in vivo*. *Cancer Res.* **59**, 5059–5063.
- Nomura, M., Nakata, Y., Inoue, T., Uzawa, A., Itamura, S., Nerome, K., Akashi, M., and Suzuki, G. (1996). *In vivo* induction of cytotoxic T lymphocytes specific for a single epitope introduced into an unrelated molecule. *J. Immunol. Methods* **193**, 41–49.
- Nordstrom, J. N. (2003). The antiprogesterone-dependent GeneSwitch system for regulated gene therapy. *Steroids* **68**, 1085–1094.
- Ochiai, H., Park, H. M., Nakamura, A., Sasaki, R., Okumura, J. I., and Muramatsu, T. (1998). Synthesis of human erythropoietin *in vivo* in the oviduct of laying hens by localized *in vivo* gene transfer using electroporation. *Poult. Sci.* **77**, 299–302.
- Ohashi, S., Kubo, T., Kishida, T., Ikeda, T., Takahashi, K., Arai, Y., Terauchi, R., Asada, H., Imanishi, J., and Mazda, O. (2002). Successful genetic transduction *in vivo* into synovium by means of electroporation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**, 1530–1535.
- Oshima, Y., Sakamoto, T., Yamanaka, I., Nishi, T., Ishibashi, T., and Inomata, H. (1998). Targeted gene transfer to corneal endothelium *in vivo* by electric pulse. *Gene Ther.* **5**, 1347–1354.
- Ostapenko, O. V., Boitsov, A. S., Baranov, A. N., Lesina, E. A., Mikhailov, V. M., and Baranov, V. S. (2004). Dependence of the efficacy of transfecting muscle fibers *in vivo* on electroporation conditions. *Genetika* **40**, 41–48.
- Payen, E., Bettan, M., Rouyer-Fessard, P., Beuzard, Y., and Scherman, D. (2001). Improvement of mouse [beta]-thalassemia by electrotransfer of erythropoietin cDNA. *Exp. Hematol.* **29**, 295–300.
- Peretz, Y., Zhou, Z. F., Halwani, F., and Prud'homme, G. J. (2002). *In vivo* generation of dendritic cells by intramuscular codelivery of FLT3 ligand and GM-CSF plasmids. *Mol. Ther.* **6**, 407–414.
- Perez, N., Bigey, P., Scherman, D., Danos, O., Piechaczyk, M., and Pelegri, M. (2004). Regulatable systemic production of monoclonal antibodies by *in vivo* muscle electroporation. *Genet. Vaccines Ther.* **2**, 2.
- Perez, N., Plence, P., Millet, V., Greuet, D., Minot, C., Noel, D., Danos, O., Jorgensen, C., and Apparailly, F. (2002). Tetracycline transcriptional silencer tightly controls transgene expression after *in vivo* intramuscular electrotransfer: Application to interleukin 10 therapy in experimental arthritis. *Hum. Gene Ther.* **13**, 2161–2172.

- Potter, H., Weir, L., and Leder, P. (1984). Enhancer-dependent expression of human kappa immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 7161–7165.
- Pradat, P. F., Finiels, F., Kennel, P., Naimi, S., Orsini, C., Delaere, P., Revah, F., and Mallet, J. (2001). Partial prevention of cisplatin-induced neuropathy by electroporation-mediated non-viral gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **12**, 367–375.
- Prud'homme, G. J., Chang, Y., and Li, X. (2002). Immunoinhibitory DNA vaccine protects against autoimmune diabetes through cDNA encoding a selective CTLA-4 (CD152) ligand. *Hum. Gene Ther.* **13**, 395–406.
- Rabinovsky, E. D., and Draghia-Akli, R. (2004). Insulin-like growth factor I plasmid therapy promotes *in vivo* angiogenesis. *Mol. Ther.* **9**, 46–55.
- Ramirez, L. H., Orlowski, S., An, D., Bindoula, G., Dzodic, R., Ardouin, P., Bognel, C., Belehradek, J., Jr., Munck, J. N., and Mir, L. M. (1998). Electrochemotherapy on liver tumours in rabbits. *Br. J. Cancer* **77**, 2104–2111.
- Riera, M., Chillon, M., Aran, J. M., Cruzado, J. M., Torras, J., Grinyo, J. M., and Fillat, C. (2004). Intramuscular SP1017-formulated DNA electrotransfer enhances transgene expression and distributes hHGF to different rat tissues. *J. Gene Med.* **6**, 111–118.
- Rizzuto, G., Cappelletti, M., Maione, D., Savino, R., Lazzaro, D., Costa, P., Mathiesen, I., Cortese, R., Ciliberto, G., Laufer, R., Monica, N., and Fattori, E. (1999). Efficient and regulated erythropoietin production by naked DNA injection and muscle electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6417–6422.
- Rizzuto, G., Cappelletti, M., Mennuni, C., Wiznerowicz, M., DeMartis, A., Maione, D., Ciliberto, G., La Monica, N., and Fattori, E. (2000). Gene electrotransfer results in a high-level transduction of rat skeletal muscle and corrects anemia of renal failure. *Hum. Gene Ther.* **11**, 1891–1900.
- Robinson, M., and Sharon, A. (1999). Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Aschynomene* by electroporation of germinated conidia. *Curr. Genet.* **36**, 98–104.
- Rols, M. P., Delteil, C., Golzio, M., Dumond, P., Cros, S., and Teissie, J. (1998). *In vivo* electrically mediated protein and gene transfer in murine melanoma. *Nature Biotechnol.* **16**, 168–171.
- Saidenberg-Kermanach, N., Bessis, N., Deleuze, V., Bloquel, C., Bureau, M., Scherman, D., and Boissier, M. C. (2003). Efficacy of interleukin-10 gene electrotransfer into skeletal muscle in mice with collagen-induced arthritis. *J. Gene Med.* **5**, 164–171.
- Saito, T., and Nakatsuji, N. (2001). Efficient gene transfer into the embryonic mouse brain using *in vivo* electroporation. *Dev. Biol.* **240**, 237–246.
- Sakamoto, T., Oshima, Y., Nakagawa, K., Ishibashi, T., Inomata, H., and Sueishi, K. (1999). Target gene transfer of tissue plasminogen activator to cornea by electric pulse inhibits intracameral fibrin formation and corneal cloudiness. *Hum. Gene Ther.* **10**, 2551–2557.
- Samakoglu, S., Fattori, E., Lamartina, S., Toniatti, C., Stockholm, D., Heard, J. M., and Bohl, D. (2001). betaMinor-globin messenger RNA accumulation in reticulocytes governs improved erythropoiesis in beta thalassemic mice after erythropoietin complementary DNA electrotransfer in muscles. *Blood* **97**, 2213–2220.
- Satkaukas, S., Bureau, M. F., Puc, M., Mahfoudi, A., Scherman, D., Miklavcic, D., and Mir, L. M. (2002). Mechanisms of *in vivo* DNA electrotransfer: Respective contributions of cell electro-permeabilisation and DNA electrophoresis. *Mol. Ther.* **5**, 133–140.
- Sato, M., Tanigawa, M., Kikuchi, N., Nakamura, S., and Kimura, M. (2003). Efficient gene delivery into murine ovarian cells by intraovarian injection of plasmid DNA and subsequent *in vivo* electroporation. *Genesis* **35**, 169–174.
- Selby, M., Goldbeck, C., Pertile, T., Walsh, R., and Ulmer, J. (2000). Enhancement of DNA vaccine potency by electroporation *in vivo*. *J. Biotechnol.* **83**, 147–152.

- Sersa, G., Cemazar, M., and Rudolf, Z. (2003). Electrochemotherapy: Advantages and drawbacks in treatment of cancer patients. *Cancer Ther.* **1**, 133–142.
- Shibata, M., Horiguchi, T., Morimoto, J., and Otsuki, Y. (2002a). Massive apoptotic cell death in chemically induced rat urinary bladder carcinomas following *in situ* HSVtk electrogene transfer. *J. Gene Med.* **5**, 219–231.
- Shibata, M., Morimoto, J., and Otsuki, Y. (2002b). Suppression of murine mammary carcinoma growth and metastasis by HSVtk/GCV gene therapy using *in vivo* electroporation. *Cancer Gene Ther.* **9**, 16–27.
- Silvestre, J. S., Mallat, Z., Duriez, M., Tamarat, R., Bureau, M. F., Scherman, D., Duverger, N., Branellec, D., Tedgui, A., and Levy, B. I. (2000). Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ. Res.* **87**, 448–452.
- Silvestre, J. S., Tamarat, R., Ebrahimi, T. G., Le-Roux, A., Clergue, M., Emmanuel, F., Duriez, M., Schwartz, B., Branellec, D., and Levy, B. I. (2003). Vascular endothelial growth factor-B promotes *in vivo* angiogenesis. *Circ. Res.* **93**, 114–123.
- Slack, A., Bovenzi, V., Bigey, P., Ivanov, M. A., Ramchandani, S., Bhattacharya, S., Tenever, B., Lamrihi, B., Scherman, D., and Szyf, M. (2002). Antisense MBD2 gene therapy inhibits tumorigenesis. *J. Gene Med.* **4**, 381–389.
- Suzuki, T., Shin, B., Fujikura, K., Matsuaki, T., and Takata, K. (1998). Direct gene transfer into rat liver cells by *in vivo* electroporation. *FEBS Lett.* **425**, 436–440.
- Takahashi, T., Ishida, K., Itoh, K., Konishi, Y., Yagyu, K., Tominaga, A., Miyazaki, J. I., and Yamamoto, H. (2003). IGF-I gene transfer by electroporation promotes regeneration in a muscle injury model. *Genesis* **10**, 612–620.
- Takeshita, S., Isshiki, T., and Sato, T. (1996). Increased expression of direct gene transfer into skeletal muscles observed after acute ischemia injury in rats. *Lab. Invest.* **74**, 1061–1065.
- Tamura, T., Nishi, T., Goto, T., Takeshima, H., Dev, S. B., Ushio, Y., and Sakata, T. (2001). Intratumoral delivery of interleukin 12 expression plasmids with *in vivo* electroporation is effective for colon and renal cancer. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1265–1276.
- Tamura, T., Nishi, T., Goto, T., Takeshima, H., Ushio, Y., and Sakata, T. (2003). Combination of IL-12 and IL-18 of electro-gene therapy synergistically inhibits tumor growth. *Anticancer Res.* **23**, 1173–1179.
- Tanaka, M., Yamada, M., Ono, T., Noguchi, Y., Uenaka, A., Ota, S., Hata, H., Harada, M., Tanimoto, M., and Nakayama, E. (2004). Inhibition of RL male 1 tumor growth in BALB/c mice by introduction of the RLakt gene coding for antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes and the GM-CSF gene by *in vivo* electroporation. *Cancer Sci.* **95**, 154–159.
- Tanaka, T., Ichimaru, N., Takahara, S., Yazawa, K., Hatori, M., Suzuki, K., Isaka, Y., Moriyama, T., Imai, E., Azuma, H., Nakamura, T., Okuyama, A., and Yamanaka, H. (2002). *In vivo* gene transfer of hepatocyte growth factor to skeletal muscle prevents changes in rat kidneys after 5/6 nephrectomy. *Am. J. Transplant.* **2**, 828–836.
- Terada, Y., Tanaka, H., Okado, T., Inoshita, S., Kuwahara, M., Akiba, T., Sasaki, S., and Marumo, F. (2001). Efficient and ligand-dependent regulated erythropoietin production by naked dna injection and *in vivo* electroporation. *Am. J. Kidney Dis.* **38**, S50–S53.
- Tieleman, D. P., Leontiadou, H., Mark, A. E., and Marrink, S. J. (2003). Simulation of pore formation in lipid bilayers by mechanical stress and electric fields. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 6382–6383.
- Tjelle, T. E., Corthay, A., Lunde, E., Sandlie, I., Michaelsen, T. E., Mathiesen, I., and Bogen, B. (2004). Monoclonal antibodies produced by muscle after plasmid injection and electroporation. *Mol. Ther.* **9**, 328–336.
- Tollefsen, S., Vordermeier, M., Olsen, I., Storset, A. K., Reitan, L. J., Clifford, D., Lowrie, D. B., Wiker, H. G., Huygen, K., Hewinson, G., Mathiesen, I., and Tjelle, T. E. (2003). DNA injection in combination with electroporation: A novel method for vaccination of farmed ruminants. *Scand. J. Immunol.* **57**, 229–238.

- Tomanin, R., Friso, A., Alba, S., Piller Puicher, E., Mennuni, C., La Monica, N., Hortelano, G., Zacchello, F., and Scarpa, M. (2002). Non-viral transfer approaches for the gene therapy of mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome). *Acta Paediatr. Suppl.* **91**, 100–104.
- Trochon-Joseph, V., Martel-Renoir, D., Mir, L. M., Thomaidis, A., Opolon, P., Connault, E., Li, H., Grenet, C., Fauvel-Lafeve, F., Soria, J., Legrand, C., Soria, C., Perricaudet, M., and Lu, H. (2004). Evidence of antiangiogenic and antimetastatic activities of the recombinant disintegrin domain of metargidin. *Cancer Res.* **64**, 2062–2069.
- Tsujie, M., Isaka, Y., Nakamura, H., Imai, E., and Hori, M. (2004). Electroporation-mediated gene transfer that targets glomeruli. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 949–954.
- Tsurumi, Y., Takeshita, S., Chen, D., Kearney, M., Rossow, S. T., Passeri, J., Horowitz, J. R., Symes, J. F., and Isner, J. M. (1996). Direct intramuscular gene transfer of naked DNA encoding vascular endothelial growth factor augments collateral development and tissue perfusion. *Circulation* **94**, 3281–3290.
- Tupin, E., Poirier, B., Bureau, M. F., Khallou-Laschet, J., Vranckx, R., Caligiuri, G., Gaston, A. T., Van Huyen, J., Scherman, D., Bariéty, J., Michel, J. B., and Nicoletti, A. (2003). Non-viral gene transfer of murine spleen cells achieved by *in vivo* electroporation. *Gene Ther.* **10**, 569–579.
- Umeda, Y., Marui, T., Matsuno, Y., Shirahashi, K., Iwata, H., Takagi, H., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kosugi, A., Mori, Y., and Takemura, H. (2004). Skeletal muscle targeting *in vivo* electroporation-mediated HGF gene therapy of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Lab. Invest.* **84**, 836–844.
- Vicat, J. M., Boisseau, S., Jourdes, P., Lainé, M., Wion, D., Bouali-Benazzouz, R., Benabid, A. L., and Berger, F. (2000). Muscle transfection by electroporation with high-voltage and short-pulse currents provides high-level and long-lasting gene expression. *Hum. Gene Ther.* **11**, 909–916.
- Vilquin, J. T., Kennel, P. F., Paturneau-Jouas, M., Chapdelaine, P., Boissel, N., Delaère, P., Tremblay, J. P., Scherman, D., Fisman, M. Y., and Schwartz, K. (2001). Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* **8**, 1097–1107.
- Walther, W., Stein, U., Fichtner, I., Voss, C., Schmidt, T., Schleef, M., Nellessen, T., and Schlag, P. M. (2002). Intratumoral low-volume jet-injection for efficient non-viral gene transfer. *Mol. Biotechnol.* **21**, 105–115.
- Wang, G., Williamson, R., Mueller, G., Thomas, P., Davidson, B. L., and McCray, P. B., Jr. (1998). Ultrasound-guided gene transfer to hepatocytes in utero. *Fetal Diagn. Ther.* **13**, 197–205.
- Wang, L. Y., Sun, W., Chen, M. Z., and Wang, X. (2003). Intramuscular injection of naked plasmid DNA encoding human preproinsulin gene in streptozotocin-diabetes mice results in a significant reduction of blood glucose level. *Sheng Li Xue Bao* **55**, 641–647.
- Watanabe, K., Nakazawa, M., Fuse, K., Hanawa, H., Kodama, M., Aizawa, Y., Ohnuki, T., Gejyo, F., Maruyama, H., and Miyazaki, J. (2001). Protection against autoimmune myocarditis by gene transfer of interleukin-10 by electroporation. *Circulation* **104**, 1098–1100.
- Wells, J. M., Li, L. H., Sen, A., Jahreis, G. P., and Hui, S. W. (2000). Electroporation-enhanced gene delivery in mammary tumors. *Gene Ther.* **7**, 541–547.
- Widera, G., Austin, M., Rabussay, D., Goldbeck, C., Barnett, S. W., Chen, M., Leung, L., Otten, G. R., Thudium, K., Selby, M. J., and Ulmer, J. B. (2000). Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation *in vivo*. *J. Immunol.* **164**, 4635–4640.
- Widlak, W., Scieglinska, D., Vydra, N., Malusecka, E., and Krawczyk, Z. (2003). *In vivo* electroporation of the testis versus transgenic mice model in functional studies of spermatocyte-specific hst70 gene promoter: A comparative study. *Mol. Rep. Dev.* **65**, 382–388.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* **247**, 1465–1468.
- Wu, C. J., Lee, S. C., Huang, H. W., and Tao, M. H. (2004). *In vivo* electroporation of skeletal muscles increases the efficacy of Japanese encephalitis virus DNA vaccine. *Vaccine* **22**, 1457–1464.

- Xue, F., Takahara, T., Yata, Y., Minemura, M., Morioka, C. Y., Takahara, S., Yamato, E., Dono, K., and Watanabe, A. (2002). Attenuated acute liver injury in mice by naked hepatocyte growth factor gene transfer into skeletal muscle with electroporation. *Gut* **50**, 558–562.
- Yamashita, Y. I., Shimada, M., Hasegawa, H., Minagawa, R., Rikimaru, T., Hamatsu, T., Tanaka, S., Shirabe, K., Miyazaki, J. I., and Sugimachi, K. (2001). Electroporation-mediated interleukin-12 gene therapy for hepatocellular carcinoma in the mice model. *Cancer Res.* **61**, 1005–1012.
- Yamazaki, Y., Fujimoto, H., Ando, H., Ohyama, T., Hirota, Y., and Noce, T. (1998). *In vivo* gene transfer to mouse spermatogenic cells by deoxyribonucleic acid injection into seminiferous tubules and subsequent electroporation. *Biol. Rep.* **59**, 1439–1444.
- Yang, L., Cheong, N., Wang, D. Y., Lee, B. W., Kuo, I. C., Huang, C. H., and Chua, K. Y. (2003). Generation of monoclonal antibodies against Blo t 3 using DNA immunization with *in vivo* electroporation. *Clin. Exp. Allergy* **33**, 663–668.
- Yasui, A., Oda, K., Usunomiya, H., Kakudo, K., Suzuki, T., Yoshida, T., Park, H. M., Fukazawa, K., and Muramatsu, T. (2001). Elevated gastrin secretion by *in vivo* gene electroporation in skeletal muscle. *Int. J. Mol. Med.* **8**, 489–494.
- Yin, D., and Tang, J. G. (2001). Gene therapy for streptozotocin-induced diabetic mice by electroporational transfer of naked human insulin precursor DNA into skeletal muscle *in vivo*. *FEBS Lett.* **495**, 16–20.
- Yoshizato, K., Nishi, T., Goto, T., Dev, S. B., Takeshima, H., Kino, T., Tada, K., Kimura, T., Shiraishi, S., Kochi, M., Kuratsu, J. I., Hofmann, G. A., and Ushio, Y. (2000). Gene delivery with optimized electroporation parameters shows potential for treatment of gliomas. *Int. J. Oncol.* **16**, 899–905.
- Yu, D. S., Lee, C. F., Hsieh, D. S., and Chang, S. Y. (2004). Antitumor effects of recombinant BCG and interleukin-12 DNA vaccines on xenografted murine bladder cancer. *Urology* **63**, 596–601.
- Zaharoff, D. A., Barr, R. C., Li, C. Y., and Yaun, F. (2002). Electromobility of plasmid DNA in tumor tissues during electric field-mediated gene delivery. *Gene Ther.* **9**, 1286–1290.
- Zang, W. P., Wei, X. D., Fu, S., Wang, S. W., Tang, J., and Wang, D. B. (2001a). Transfer and expression of recombinant human thrombopoietin gene in cos-7 cells and mice *in vivo*. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **9**, 14–17.
- Zang, W. P., Wei, X. D., Wang, S. W., and Wang, D. B. (2001b). Thrombopoietic effect of recombinant human thrombopoietin gene transferred to mice mediated by electric pulse on normal and experimental thrombocytopenia mice. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* **22**, 128–131.
- Zerbib, D., Amalric, F., and Teissie, J. (1985). Electric field mediated transformation: Isolation and characterization of a TK+ subclone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **129**, 611–618.
- Zhang, G., Gao, X., Song, Y. K., Vollmer, R., Stolz, D. B., Gasirowski, J. Z., Dean, D. A., and Liu, D. (2004). Hydroporation as the mechanism of hydrodynamic delivery. *Gene Ther.* **11**, 675–682.
- Zhang, G. H., Tan, X. F., Shen, D., Zhao, S. Y., Shi, Y. L., Jin, C. K., Sun, W. G., Guo, Y. H., Chen, K. H., and Tang, J. (2003). Gene expression and antitumor effect following im electroporation delivery of human interferon alpha 2 gene. *Acta Pharmacol. Sin.* **24**, 891–896.
- Zucchelli, S., Capone, S., Fattori, E., Folgori, A., Di Marco, A., Casimiro, D., Simon, A. J., Laufer, R., La Monica, N., Cortese, R., and Nicosia, A. (2000). Enhancing B- and T-cell immune response to a hepatitis C virus E2 DNA vaccine by intramuscular electrical gene transfer. *J. Virol.* **74**, 11598–11607.

Electrotransfert de gènes *in vivo* : optimisation et mécanismes.

Résumé :

L'électrotransfert est une solution prometteuse aux problèmes posés par les méthodes de transfert virales, aussi bien en termes d'applications thérapeutiques qu'en tant qu'outil de recherche. Cependant des progrès doivent encore être réalisés pour augmenter l'efficacité de transfection dans les divers types cellulaires, pour améliorer la connaissance des mécanismes impliqués ainsi que pour confirmer l'innocuité de l'électrotransfert.

Dans une étude préliminaire, nous avons démontré que l'efficacité de transfert par injection locale d'ADN seule augmentait avec la vitesse d'injection, impliquant probablement de l'endocytose médiée par récepteur, mais aussi une faible perméabilisation membranaire. Nous avons ensuite confirmé *in vivo* le rôle perméabilisant des impulsions courtes de fort voltage (HVs) et le rôle électrophorétique des impulsions longues de bas voltage (LVs), lors de l'électrotransfert. Nous avons aussi montré l'influence d'un délai entre le HV et le LV sur l'efficacité et la toxicité des impulsions électriques appliquées. Notre étude de l'impulsion HV semble montrer également que le tissu n'a pas besoin d'être complètement perméabilisé dans le cadre de l'électrotransfert. Nous avons aussi pu confirmer *in vivo* que plus les cellules du tissu étaient petites, plus le champ électrique à appliquer pour le HV devait être fort, conformément à l'équation de Schwan : $\Delta\Psi_i = F.g(\lambda).r.E.\cos\theta$, où « r » est le rayon de la cellule.

Enfin, nous avons montré l'absence de lésions et de stress cellulaire (Hsp70) induits par les combinaisons optimales de HV+LV utilisées pour l'électrotransfert, surtout lorsque l'impulsion LV est scindée en 8 impulsions.

Mots clés : Electrotransfert de gènes *in vivo*, électroperméabilisation, injection d'ADN, thérapie génique non virale, électroporation, électrotransfert d'ADN *in vivo*.

***In vivo* Gene electrotransfer: optimisation and mechanisms.**

Abstract:

DNA electrotransfer is a promising solution to the problems induced by the use of viral transfer techniques, both in terms of therapeutic applications and as a tool for research. However, improvements have to be made concerning the transfection efficacy in the different cell lines, the knowledge of the underlying mechanisms and also the knowledge of the safety of the electrotransfer.

In a preliminary study we have proved that transfection efficacy for DNA injection alone increased with the speed of injection, mainly due to receptor mediated endocytosis, but also partly to membrane permeabilisation.

Afterward we have confirmed *in vivo* the permeabilising role of the short high voltage pulses (HVs) and the electrophoretic role of the long low voltage pulses (LVs), during the electrotransfer. We have also shown the influence of a delay between the HV and the LV, on the efficacy and the toxicity of the pulses applied. Our study of the HV also tends to indicate that the tissue doesn't have to be entirely permeabilised to obtain a good electrotransfer. We have also confirmed *in vivo* that the smaller the cells are, the higher the voltage applied for the HV has to be. This is in agreement with Schwan's formula: $\Delta\Psi_i = F.g(\lambda).r.E.\cos\theta$, where "r" stands for the cell's radius.

At last, we have shown that there are no lesions or cellular stress induced by the optimal set of HV+LV used, especially when the LV pulse is split in 8 pulses.

Keywords: *In vivo* gene electrotransfer, electropermeabilisation, DNA injection, non viral gene therapy, électroporation, *in vivo* DNA electrotransfer.