



UNIVERSITÉ D'ORLÉANS



ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Centre de Biophysique Moléculaire

THÈSE présentée par :
Anthony DELALANDE

soutenue le : **22 juin 2011**

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

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

**Méthodes de transfert de gènes non virales:
application aux pathologies tendineuses**

THÈSE dirigée par :

Chantal PICHON

Professeure de l'Université d'Orléans

THÈSE codirigée par :

Ayache BOUAKAZ

Directeur de recherche, INSERM Tours

RAPPORTEURS :

Elias FATTAL

Professeur de l'Université de Paris sud 11

Delphine DUPREZ

Directrice de recherche, CNRS Paris

JURY:

Mme. Claudine KIEDA

Directrice de recherche CNRS, Orléans – Présidente du jury

Mme. Chantal PICHON

Professeure de l'Université d'Orléans – Directrice de thèse

Mme. Delphine DUPREZ

Directrice de recherche CNRS, Paris – Rapporteur

M. Elias FATTAL

Professeur de l'Université de Châtenay-Malabry – Rapporteur

M. Michiel POSTEMA

Professeur de l'Université de Bergen, Norvège – Examineur

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le docteur Delphine Duprez et le professeur Elias Fattal d'avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Je remercie également le professeur Michiel Postema et le docteur Claudine Kieda pour avoir accepté d'examiner mes travaux de thèse.

Je remercie le docteur Jean-Claude Beloeil, directeur du CBM pour m'avoir accueilli dans son laboratoire durant ces 3 années de thèse.

Je remercie le professeur Chantal Pichon, ma directrice de thèse pour m'avoir guidé durant ces années de thèse. Je remercie le docteur Patrick Midoux, directeur de l'équipe transfert de gène par vecteurs synthétiques, pour ses conseils avisés.

Je remercie l'ensemble de l'équipe transfert de gène par vecteurs synthétiques avec une mention spéciale pour Loïc, Arnaud et Lucie.

Je remercie également les organismes financeurs de ma thèse, la région centre, le CNRS ainsi que l'Association Française des Syndromes d'Ehlers-Danlos.

Parmi nos collaborateurs,

Je remercie Ayache Bouakaz, Anthony, Kadija et Tran de l'équipe 5 de l'INSERM U930 à Tours pour leur aide durant cette thèse.

Je remercie Gilles Renault, Didier Fradelizi, Michel Bureau du PIPA à l'institut Cochin de Paris.

Un grand merci à Spiros Kotopoulis et Michiel Postema pour ces longues discussions sur la physique des ultrasons mais aussi pour votre bonne humeur.

Merci à Brigitte Arbeille et à Rustem Uzbekov du département des microscopies de l'Université de Tours pour l'analyse en microscopie électronique.

Merci à Alain Boucaud et Matthias Lebertre de Transderma pour votre aide dans l'utilisation des appareillages de mesure, nos discussions et votre sympathie.

Au CBM,

Merci à Justo Torres et Marcial Bruneau de l'équipe technique pour leur aide dans la réalisation des différents dispositifs expérimentaux.

Merci à David Gosset de la plateforme cytométrie pour l'aide apportée dans l'utilisation des appareils.

Merci aux membres actifs de l'ADSO et de l'ADOC pour les quelques soirées passées ensemble.

Merci à celle qui a dû me supporter durant cette période difficile qu'est la rédaction de la thèse. Flore je te dois beaucoup, merci.

Merci à ma famille, ma belle-famille et mes amis pour leur soutien.

SOMMAIRE

Remerciements	1
Liste des abréviations.....	12
Avant-Propos	13
PARTIE I : LE TENDON, LES TENDINOPATHIES	15
I) Le tendon	15
1) Anatomie descriptive et fonctionnelle.....	15
1. Organisation	15
2) Histologie et biologie cellulaire	16
1. Structure, Composition cellulaire et moléculaire	16
a. Les composantes cellulaires	16
b. Les collagènes.....	17
c. Les protéoglycanes.....	21
d. Structure et fonction des principales protéoglycanes du tendon	22
e. Glycosaminoglycanes et glycoprotéines.....	25
2. Vascularisation et hypoxie.....	25
3. Embryogenèse et développement du tendon	25
4) Biomécanique et charge mécanique du tendon	26
5) Mécano transduction et tendon	27
II) La réparation d'une lésion du tendon d'Achille	28
1) Les étapes de la réparation du tendon	28
2) Facteurs moléculaires impliqués durant la réparation tendineuse	29
3) Thérapies actuelles des tendinopathies.....	30
1. Les anti-inflammatoires	30
2. La physiothérapie	30
3. Les méthodes chirurgicales.	31
4) Les thérapies innovantes	31
1. Les facteurs de croissance	31

2. La thérapie génique	33
3. Les cellules souches et ingénierie tissulaire	33
III) Modèles d'étude de la réparation tendineuse	34
1) La surutilisation/surchage mécanique	34
2) La collagénase	35
3) La lésion chirurgicale du tendon d'Achille	35
4) Le syndrome d'Ehlers-Danlos.....	35
IV) Références	37
PARTIE II : LES MÉTHODES DE TRANSFERT DE GÈNES	47
I) La thérapie génique	47
II) Le transfert de gène.....	47
1) Les barrières cellulaires.....	47
2) L'endocytose	49
3) Stratégies d'échappement des endosomes et importation nucléaire	50
III) Les différentes méthodes de transfert de gènes	51
1) Injection d'acides nucléiques nus	51
2) Les vecteurs viraux.....	52
2) Les vecteurs synthétiques	53
1. Les liposomes	53
2. Les polymères.....	54
3. Les nanoparticules et nanomatériaux	55
4) Les méthodes physiques	56
1. L'électroporation ou électropéabilisation.....	56
2. La sonoporation.....	57
3. Autres méthodes physiques.	58
IV) Références	59
PARTIE III : UTILISATION DE LA SONOPORATION COMME MÉTHODE DE TRANSFERT DE GÈNE	65
I) Généralités sur les ultrasons et l'échographie.....	65

1) Effets thermiques	67
2) Effets non thermiques.....	67
3) Les méthodes thérapeutiques utilisant les ultrasons.....	68
Ultrasons de haute intensité	68
Ultrasons de faible intensité.....	69
1) Présentation	70
2) Composition	71
3) Influence de la composition des microbulles sur leurs propriétés acoustiques	73
1. Influence de la taille des microbulles de gaz.	73
2. Influence de l'enveloppe.	73
3. Influence de la composition en gaz.	74
4) les régimes oscillatoires	74
5) Les méthodes d'encapsulation possibles	74
IV) La sonoporation	75
1) Historique.....	75
2) Méthode.....	75
1. Transfert de petites molécules	76
2. Transfert de grosses molécules	76
3) Interaction cellules-microbulles et ultrasons	78
4) Le potentiel thérapeutique de la sonoporation	79
V) Effets cellulaires des ultrasons.....	79
1) Prolifération cellulaire.....	80
2) MAPK et FAK	80
3) H ₂ O ₂ et stress oxydant.....	80
4) La signalisation calcique et les canaux ioniques	81
VI) Références	84

RÉSULTATS. PARTIE 1 – TRANSFERT DE GÈNE PAR DES VECTEURS SYNTHÉTIQUES DANS LE TENDON D'ACHILLE89

PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles accelerates Achilles tendon healing. 90

Abstract.....	91
Key words:.....	91
1. Introduction	92
2. Experimental Procedures	93
2.1. Materials	93
2.2. Plasmids	93
2.3. Surface Modification of Mesoporous Silica Nanoparticles	93
2.4. FTIR experiment	93
2.5. Zeta potential measurement.....	93
2.6. pDNA/MSN formulations	94
2.7. Transmission Electron Microscopy analysis	94
2.8. Atomic force microscopy (AFM).....	94
2.9. Agarose gel electrophoresis	94
2.10. Primary culture of tenocytes.....	94
2.11. <i>In vitro</i> transfection.....	94
2.12. <i>In vivo</i> transfection.....	95
2.13. <i>In vivo</i> toxicity assessment.....	95
2.14 Biomechanical tests.....	95
2.15. Histological analysis	96
2.16. Statistical analysis.....	96
3. Results.....	96
3.1. MSN surface modifications	96
3.2. Interactions between DNA and silica nanoparticles.....	97
3.3. <i>In vitro</i> transfection efficiency of tenocytes.....	98
3.4. Achilles tendons transfection	99
3.5. MSN toxicity	100
3.6. Healing activity of PDGF gene transfer.....	100
4. Discussion	102
Conclusions	103

Acknowledgments.....	103
References	104
RÉSULTATS. PARTIE 2 – TRANSFERT DE GÈNE PAR SONOPORATION <i>IN VIVO</i>, APPLICATION AU TENDON D'ACHILLE	107
I) Mise au point de la sonoporation <i>in vivo</i> dans le tendon d'Achille	108
1) Introduction	108
2) Article	108
Ultrasound assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy	109
Abstract	109
1. Introduction	110
2. Experimental methods	110
2.1. Microbubbles and ultrasound set-up	110
2.2. Animal studies	111
2.3. In vivo bioluminescence imaging and quantification	111
3. Results	111
4. Discussion	113
5. Conclusion	114
Acknowledgements.....	114
References.....	115
II) Application de la sonoporation à un modèle de souris KO.....	117
1) Introduction	117
2) Publication	117
Ultrasound assisted-microbubbles gene delivery in Achilles tendons: long lasting gene expression and restoration of fibromodulin null phenotype.....	118
Abstract	119
1. Introduction	120
2. Results	121
2.1. Optimal acoustic parameters for efficient gene transfer in Achilles tendons.....	121
2.2. Kinetic of transgene expression	122

2.3. Assessment of intact Plasmid rescue assay	122
2.4. Restoration of Fibromodulin gene expression in Fmod KO mice	122
3. Discussion	123
4. Materials and Methods	125
4.1. Reagents	125
4.2. Plasmids	125
4.3. Microbubbles and ultrasound set-up	125
4.4. Animal studies	125
4.5. Luciferase assay	126
4.6. Histological analysis	126
4.7. In vivo bioluminescence imaging and quantification	126
4.8. DNA extraction, plasmid rescue assay and quantification	126
4.9. RNA extraction of Fmod KO mice and qPCR	126
4.10. Electron Microscopy	127
4.11. Statistical Analysis	127
Funding	127
Acknowledgements	128
5. Figures	129
6. References	138

RÉSULTATS. PARTIE 3 – ETUDES DU MÉCANISME DE TRANSFERT DE GÈNE PAR SONOPORATION.....141

I) Interaction entre microbulles de gaz et cellules sous ultrasons	141
1) Introduction	141
2) Publication	141
Sonoporation at a low mechanical index	142
Abstract	142
Introduction	143
Mechanical index	143
Sonoporation	144

Materials and methods	144
Sonoporation configuration	144
Fluorescence configuration	145
Results and discussion.....	146
Conclusions	146
Acknowledgements.....	147
List of figures	147
References.....	156
II) Détermination du mécanisme de transfert de gène par sonoporation.....	158
1. Introduction	158
2. Matériels et Méthodes.....	158
2.1. Réactifs	158
2.2. Culture cellulaire	158
2.3. Plasmides.....	159
2.4. Sonoporation in vitro pour le transfert de gène.....	159
2.5. Ultrasons	160
2.6. Microbulles.....	160
2.6. Marquage fluorescent des microbulles	160
2.7. Imagerie ultra rapide.....	161
2.8. Mesure de l'activité de la Luciférase	162
2.9. Mesure de la cytoviabilité	162
2.10. Inhibition de l'endocytose	162
2.11. Marquage fluorescent de l'ADN	163
3. Résultats et discussion	163
3.1. Détermination des paramètres optimaux pour la sonoporation <i>in vitro</i>	163
3.2. Interaction microbulles-cellules	164
3.3. Cinétique de localisation du plasmide après sonoporation	167
3.4. Devenir du plasmide et implication de l'endocytose	168
4. Conclusion et perspectives	170

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES	173
--	------------

LISTE DES ABREVIATIONS

ACU : Agent de Contraste Ultrasonore

ADAMT : A Disintegrin And Matrix Metalloproteinase with Thrombospondin Motif

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine DiPhosphate

AINS : Anti-Inflammatoire Non Stéroïdien

AN : Acide Nucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine TriPhosphate

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

bHLH : basic Helix Loop Helix

BMP : Bone Morphogenetic Protein

CS : Chondroïtine Sulfate

DC : Duty Cycle

eGFP : enhanced Green Fluorescent Protein

ERK : Extracellular signal-regulated Kinase

FAK : Focal Adhesion Kinase

FITC : fluorescein isothiocyanate

GAG : Glycosaminoglycane

GDF : Growth/Differentiation Factor

HES : Hematoxiline-Eosine-Safran

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIFU : High Intensity Focused Ultrasound

IGF : Insulin Growth Factor

JMT :Jonction Myo-Tendineuse

JOT : Jonctionthe Ostéo-Tendineuse

KS : Keratan Sulfate

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MB : microbulle

MEC : Matrice Extra Cellulaire

MI : index mécanique

MMP : Matrix Metalloproteinase Protein

MSN : Mesoporous Silica Nanoparticles

NLS : nuclear localization signal

NM : nanoparticule magnétique

NTC : nanotube de carbone

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

PEI : Polyethylenimine

PFC : Perfluorocarbone

PRF : Pulse Rate Frequency , fréquence de répétition du pulse

PRP : Plasma Riche en Plaquettes

SAC : Stretch Activated Channel

SED : Syndrome d'Ehlers-Danslos

SLRP : Small Leucin Rich Protein

SLRP : Small Leucin Rich Proteoglycan

TGF- β : Transforming Growth Factor β

TIMP : Tissue Inhibitor of MMP

TMS : troubles musculo squelettiques

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

AVANT-PROPOS

Avec 30000 cas en 2006 les troubles musculo-squelettiques (TMS) occupent le premier rang des maladies professionnelles. Les TMS sont des affections qui touchent les muscles, les tendons, les nerfs, les vaisseaux sanguins ou les cartilages. Ils se traduisent en général par des douleurs au niveau des muscles, des articulations et des tendons provoquant une gêne dans les mouvements. Bien que l'intensité de la douleur et de la gêne puisse varier selon les personnes et dans le temps, les TMS sont chroniques, et entraînent fréquemment une inaptitude au poste de travail. Leur coût social s'élèverait même à 1,5 milliards d'euros dans certains pays européens. Nous sommes donc face à un problème de santé publique. Parmi les TMS les tendinopathies représentent au moins 20%.

Dans le cas de tendinopathies chroniques ou aiguës, il a été démontré que la réparation endogène du tissu pouvait se montrer très longue et incomplète. Cela peut ainsi être problématique notamment pour les sportifs, qui d'ailleurs n'hésitent pas à faire appel à des interventions chirurgicales afin d'accélérer la réparation tendineuse et ainsi reprendre plus rapidement leur activité. Pour les personnes atteintes de maladies chroniques ou génétiques touchant les tendons, la problématique se situe plus au niveau de la douleur et surtout de l'incapacité dans les cas les plus sévères à administrer un traitement efficace. Les connaissances sur l'organisation du tendon tant au plan cellulaire que matriciel ainsi que sur les mécanismes de réparation de lésions tendineuses tendent à montrer que le tendon ne synthétise pas le collagène adéquat dans les premières heures suivant l'inflammation. En effet, l'hypocellularité du tissu lui confère la particularité de réagir assez tardivement à la lésion. On assiste alors à une prolifération cellulaire fibroblastique puis à un comblement de la lésion par du collagène de type III moins performant que le collagène de type I qui compose en grande majorité un tendon sain. Ce phénomène nécessite un remodelage de la matrice extracellulaire tendineuse pouvant durer jusqu'à un an afin de remplacer de façon non-exhaustive le collagène de type III en collagène de type I ce qui a pour effet de consolider le tendon. Les molécules impliquées dans les processus de réparation sont relativement bien connues. Parmi ces molécules on retrouve les facteurs de croissance mais également les protéoglycanes. Ainsi au laboratoire, nous avons choisi d'exploiter ces molécules apporter pour améliorer la régénération tendineuse par transfert de gène. Si cette technique a d'ores et déjà apporté des résultats significatifs dans le cadre des maladies génétiques et un nouvel espoir pour les patients son exploitation dans le cadre des maladies chroniques reste à développer. Afin de mener à bien ce projet, nous avons utilisé deux méthodes de transfert de gène, la vectorisation chimique à base de nanoparticules de silice ainsi qu'une méthode physique, la sonoporation basée sur l'utilisation de microbulles de gaz activées par ultrasons. Nous avons ainsi étudié l'efficacité de transfection des méthodes sélectionnées, *in vitro* sur cellules de tendon d'Achille de rat et de souris et *in vivo* sur des modèles de lésion chirurgicale du tendon d'Achille de rat et un modèle murin du syndrome d'Ehlers-Danlos. Dans le cadre de la sonoporation, des études mécanistiques ont été entreprises pour mieux comprendre le mécanisme d'interaction entre microbulles de gaz, cellules et ultrasons.

Ce manuscrit se décompose en trois parties. La première partie concerne les généralités sur le projet de thèse. Les tendons et les tendinopathies sont abordés dans un premier temps, suivi des méthodes de transfert de gène et enfin les ultrasons et la méthode de sonoporation sont détaillés. La seconde partie correspond aux résultats obtenus qui seront présentés sous forme d'article en

Introduction

anglais précédé d'une introduction et suivi d'une discussion en français. La dernière partie est consacrée aux conclusions générales ainsi qu'aux perspectives de ce travail.

PARTIE I : LE TENDON, LES TENDINOPATHIES

Ce chapitre présente des données anatomiques, histologiques et moléculaires nécessaires à la compréhension des mécanismes mis en jeu dans la physiopathologie du tendon et dans la réparation tendineuse. Les différentes méthodes de thérapie des tendinopathies ainsi que les techniques innovantes seront également présentées. Enfin, les modèles d'étude des tendinopathies existant et utilisés durant ma thèse seront détaillés.

I) LE TENDON

Le tendon est un tissu conjonctif dont la structure anatomique relie le muscle à l'os. Il joue un rôle important dans la transmission de la force générée par les muscles vers les os et les articulations afin de permettre la locomotion. Il est à distinguer du ligament qui fait la jonction entre deux os. Cependant, la composition cellulaire et matricielle de ces deux tissus est similaire, leur distinction est donc purement anatomique.

1) ANATOMIE DESCRIPTIVE ET FONCTIONNELLE

Dans l'organisme différents types de tendons sont observés, ils se différencient par leur taille et leur forme. Les tendons cylindriques existent au niveau muscles des membres, ils peuvent être très courts (*i.e.* tendons des muscles de la racine de la cuisse) ou très longs (*i.e.* les tendons des muscles extenseurs et fléchisseurs des doigts et le tendon d'Achille). Les tendons plats et larges sont visualisés au niveau de la paroi abdominale : ce sont les tendons aponévrotiques.

1. ORGANISATION

Les tendons sont organisés en différents faisceaux composés de fibres de collagène. L'unité principale du tendon est la fibrille de collagène qui est elle-même composée de molécules de collagène de type I (figure 1-1). Chaque faisceau est entouré d'endoténon dont la fonction principale est d'apporter la vascularisation et l'innervation de l'organe. Toutes les fibrilles sont organisées de façon parallèle et orientées dans le sens de la contrainte mécanique (os-muscle). Cette division des tendons en fibrilles permet d'éviter que la totalité du tendon ne soit touché en cas de lésion, mais cela confère également au tendon une plus grande résistance. Enfin, autour des faisceaux formant le tendon à proprement parler, est retrouvé la gaine synoviale (ou paraténon pour le tendon d'Achille). Cette membrane synthétise la synovie, substance ayant un rôle lubrifiant, elle permet de diminuer les forces de frottements du tendon lorsqu'il est en traction. De plus, la synovie permet un apport en oxygène et en nutriments du tendon. Le tendon d'Achille est un tendon de type extrasynovial, il ne possède pas de gaine synoviale mais un paraténon. La fonction du paraténon est la même que celle de la gaine synoviale cependant sa composition, plus riche en collagène, lui confère une plus grande résistance.

Trois parties sont distinguées dans le tendon:

- La jonction musculo-tendineuse permet de solidifier la connexion entre le muscle et le tendon en augmentant la surface de contact entre les deux entités. Cette région est riche en glycoprotéines qui interagissent avec des protéines du muscle (actine) permettant l'attachement entre le tendon et le muscle.
- La partie médiane est composée principalement de fibre de collagène et de ténocytes.
- La jonction ostéo-tendineuse correspond à l'interface entre le tendon et l'os. Elle est caractérisée par un gradient de glycosaminoglycanes (GAG) croissant à l'approche de l'os, calcifiant peu à peu le tendon afin de faire fusionner le tendon à l'os.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes focalisés uniquement sur le tendon d'Achille. En effet, en raison de sa taille importante et de son accessibilité, ce tendon est un candidat idéal pour mettre en place un modèle d'étude thérapeutique de tendinopathies.

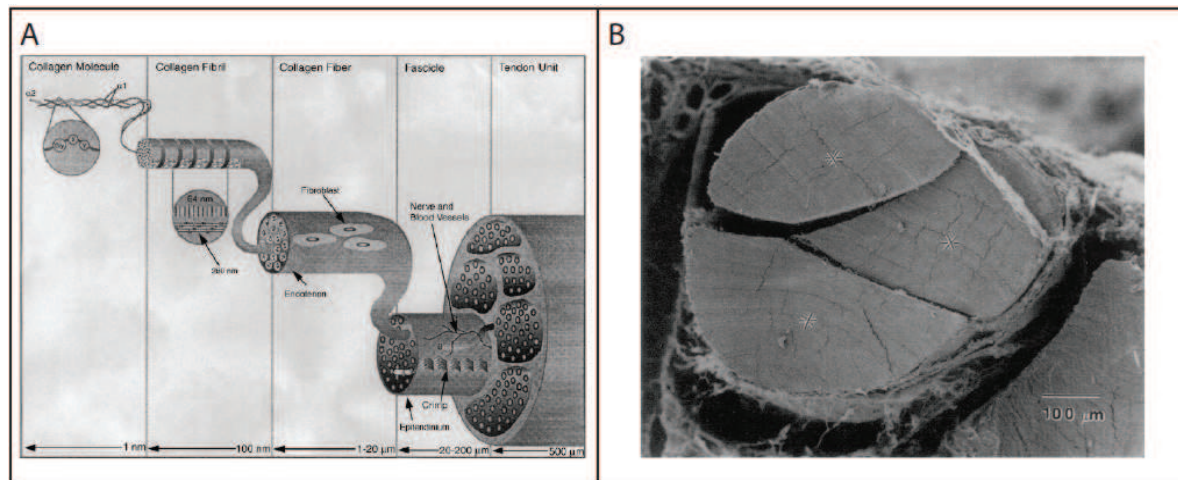


Figure 1-1. Hiérarchie structurale du tendon. (A) Schéma de l'organisation du tendon, (B) microscopie électronique d'un tendon d'Achille observé en coupe transversale (Silver et al., 2003).

2) HISTOLOGIE ET BIOLOGIE CELLULAIRE

1. STRUCTURE, COMPOSITION CELLULAIRE ET MOLECULAIRE

Les tendons sont principalement composés de matrice extracellulaire. La composition et la structure de la matrice extracellulaire varient considérablement parmi les différents types de tissus conjonctifs. La fonction principale de la matrice extracellulaire est de conférer au tissu des propriétés biomécaniques spécifiques. Les cellules résidentes dénommées ténocytes sont responsables de la synthèse de la matrice extracellulaire mais celle-ci a aussi un impact sur les fonctions cellulaires. Les interactions matrice-cellule ne jouent pas seulement un rôle prédominant dans l'adhésion et la migration cellulaire mais permettent également la régulation de la différenciation cellulaire et l'expression de nombreux gènes.

Le tendon est composé entre 55 et 70% d'eau. Il est principalement composé de fibres de collagène parallèles très proches. Le collagène de type I représente entre 60 et 80% (en fonction des tendons) de la masse sèche du tendon tandis que l'élastine ne représente qu'approximativement 2% (O'Brien, 1997). Les autres molécules retrouvées au sein de la matrice extracellulaire entourant les fibres de collagène et les ténocytes sont les protéoglycanes, les glycosaminoglycanes (GAG) et les glycoprotéines. Nous nous sommes focalisés sur les collagènes et les protéoglycanes.

a. LES COMPOSANTES CELLULAIRES

LES TENOCYTES, LES TENOBLASTES

Comme indiqué précédemment, le tendon est une structure très riche en matrice extracellulaire, en conséquence le tendon est une structure hypocellulaire. 90-95% des cellules du tendon sont des ténocytes et ténoblastes, les 5-10% restant sont des chondrocytes. En effet, ces chondrocytes sont présents dans certaines zones sujettes à de fortes forces de compression (Crevier-Denoix *et al.*, 1998). Les ténoblastes sont les progéniteurs des ténocytes. Ces deux types cellulaires reposent le long des fibres de collagène. Les ténocytes assurent la synthèse de la matrice extracellulaire du tendon lors du développement *in utero* et lors du processus de cicatrisation mais ils participent aussi

dans la production énergétique (O'Brien, 1997). Les ténocytes représentent un plus faible pourcentage des cellules tendineuses par rapport aux ténoblastes et leur nombre augmenterait avec l'âge. Les ténoblastes ont une forme arrondie et possèdent un appareil de Golgi volumineux du fait d'une forte activité métabolique, tandis que les ténocytes ont une forme plus allongée, ils ressemblent à des fibroblastes en tête d'épingle et ont un ratio noyau/cytoplasme plus faible ainsi qu'une activité métabolique diminuée (Kannus, 2000). Les ténocytes et ténoblastes sont liés entre eux par des jonctions gap (McNeilly *et al.*, 1996b) et forment un réseau tridimensionnel sensible aux pressions mécaniques (Banes *et al.*, 1999). Les ténocytes et les ténoblastes sont des cellules d'origine mésenchymateuse, elles dérivent de cellules mésoblastiques pluripotentes.

LES MARQUEURS MOLECULAIRES DES TENOCYTES

Le facteur de transcription *scleraxis* découvert en 1995 par Cserjesi *et al.* (Cserjesi *et al.*, 1995) est défini aujourd'hui comme le meilleur marqueur moléculaire spécifique des ténocytes (Schweitzer *et al.*, 2001). Ce facteur de transcription est principalement exprimé dans les précurseurs mésodermiques des tissus conjonctifs tandis que plus tard dans le développement *scleraxis* devient spécifique des tendons ainsi que de leurs progéniteurs (Brown *et al.*, 1999; Schweitzer *et al.*, 2001). Une étude de l'expression de *scleraxis* dans les systèmes de cultures en 3D de haute densité de ténocytes et de chondrocytes montre tout de même une faible expression de *scleraxis* dans les chondrocytes par rapport aux ténocytes (100 fois plus faible) (Schulze-Tanzil *et al.*, 2004). *Scleraxis* est un facteur de transcription de la famille des basic Helix-Loop-Helix (bHLH), qui s'hétérodimérise avec le produit du gène E2A et se fixe sur les E-boxes SCX/E12 et SCX/E47 (Carlberg *et al.*, 2000; Cserjesi *et al.*, 1995). L'utilisation de souris invalidées pour le gène *scleraxis* a permis de démontrer l'importance de ce facteur de transcription (Murchison *et al.*, 2007). Lejard *et al.* ont montré que *scleraxis* pourrait réguler l'expression du collagène de type I (Lejard *et al.*, 2007).

La ténomoduline est présentée également comme un bon marqueur phénotypique des ténocytes. C'est une protéine transmembranaire de type II (Shukunami *et al.*, 2001) exprimée dans les conjonctifs denses comme le tendon, les ligaments, l'épimysium des muscles ainsi que la cornée et la sclérotique dans l'œil ayant un rôle anti-angiogénique (Brandau *et al.*, 2001; Oshima *et al.*, 2003). Il est à noter qu'une surexpression de *scleraxis* augmente l'expression de la ténomoduline (Shukunami *et al.*, 2006).

b. LES COLLAGENES

Les collagènes représentent en masse le type de protéine le plus abondant dans le corps, ils sont le plus retrouvés dans les tissus conjonctifs. Le nom de collagène dérive des mots grecs qui signifient « colle » et « naissance » reflétant les propriétés d'adhérence de cette molécule. Le collagène est également connu pour ces propriétés biomécaniques exceptionnelles puisque à poids égal les collagènes fibrillaires sont aussi résistants que l'acier. Collagène est le terme générique pour des protéines sous forme de triple hélice composée de trois chaînes polypeptidiques. A l'heure actuelle, 28 gènes distincts codant pour une hélice de collagène ont été décrits (Boot-Handford *et al.*, 2003; Sato *et al.*, 2002; Veit *et al.*, 2006). Tous les membres de la famille des collagènes forment ces structures supramoléculaires dans la matrice extracellulaire, cependant leur taille, leur fonction et leur distribution tissulaire varient considérablement. En se basant sur la structure et leur organisation supramoléculaire, différentes familles de collagènes ont été identifiées, dont les principales sont les collagènes fibrillaires, les collagènes associés aux fibrilles, les collagènes formant des réseaux et les collagènes formant les membranes basales (voir tableau I).

Tableau 1-1. Classification des principaux types de collagène, localisation tissulaire et gènes impliqués (Gelse *et al.*, 2003).

Type	Composition moléculaire	Gènes génomique)	(localisation	Distribution tissulaire
Collagènes fibrillaires				
I	$\alpha 1(I)_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)		Os, derme, tendon, ligament, cornée
II	$\alpha 1(II)_3$	COL2A1 (12q13.11 – q13.2)		Cartilage, corps vitré
III	$\alpha 1(III)_3$	COL3A1 (2q31)		Peau, paroi vasculaire, fibre réticulaire de la majorité des tissus (poumon, foie, rate, etc.)
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2– q34.3) COL5A2 (2q31) COL5A3 (19p13.2)		Poumon, cornée, os, membranes fœtales; associées au collagène de type I
XI	$\alpha 1(XI)\alpha 2(XI)\alpha 3(XI)$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1		Cartilage, corps vitré
Collagènes des membranes basales				
IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36– q37) COL4A4 (2q36– q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)		Membranes basales

Les principaux collagènes observés dans le tendon sont les collagènes de type I et III. Ils appartiennent à la famille des collagènes fibrillaires. Le collagène de type I représente 60% de la masse sèche du tendon et 95% du collagène total (Evans & Barbenel, 1975; Riley *et al.*, 1994; von der Mark, 1981). Le collagène de type III est le deuxième collagène le plus abondant, il représente jusqu'à 5% du collagène total dans le tendon supra-épineux et le tendon brachial du biceps (Riley *et al.*, 1994). Dans les conditions physiologiques, le collagène de type III est retrouvé principalement dans l'endoténon et l'épiténon (Duance *et al.*, 1977). Cependant, des fibres de collagène de type III sont visualisées intercalées dans des fibres de collagène de type I en particulier dans les tendons de sujets âgés et sont localisées dans des zones fortement stressées comme le tendon supra-épineux (Fan *et al.*, 1997). Les fibres de collagène de type III sont plus petites et moins organisées (Lapiere *et al.*, 1977), ce qui entraîne une diminution de la force mécanique du tendon. Dans le cadre d'une lésion du tendon le collagène de type III est le plus retrouvé, il permet de combler le site lésionnel afin de restaurer une continuité des tissus.

B1. FIBRILLOGENESE DU COLLAGENE

Malgré leur grande diversité structurale, les différents collagènes possèdent une caractéristique commune : ils sont formés d'une triple hélice droite composée par trois chaînes α . Les collagènes peuvent être constitués de trois chaînes identiques, en homotrimères comme dans les types II, III, VII, VIII et X ou en hétéotrimères comme dans les collagènes de type I, IV, V, VI, IX et XI. Les types I

et V sont principalement retrouvés dans les tendons et les os et les types II et XI dans les cartilages. Le collagène de type I est un hétérotrimère composé de 2 chaînes $\alpha 1$ et d'une chaîne $\alpha 2$. Un pré requis structural pour l'assemblage en triple hélice est le résidu glycine (Gly), le plus petit des acides aminés. Celui-ci est retrouvé tous les 3 acides aminés de la chaîne polypeptidique dans une séquence du type $(\text{Gly-X-Y})_n$ répétée, caractérisant le domaine « collagénique » de tous les collagènes. Les chaînes α s'assemblent autour d'un axe central de façon à ce que tous les résidus glycine soient positionnés au centre de la triple hélice (figure 1-2). La position X et Y est quant à elle souvent occupée par une proline ou une hydroxyproline. En fonction du type de collagène, des résidus proline et lysine spécifiques vont subir des modifications post-transcriptionnelles de type hydroxylation conduisant à la formation d'hydroxyproline. Le contenu en 4-hydroxyproline est essentiel dans la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaire contribuant ainsi à la stabilisation de la conformation en triple hélice.

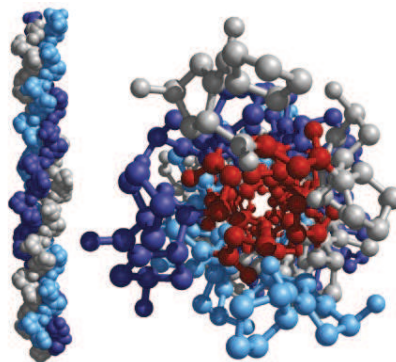


Figure 1-2. Modélisation de la structure du collagène. Triple hélice de collagène, chaque monomère est représenté par une couleur différente (gauche), visualisation du centre de la triple hélice, les résidus glycine sont en rouge (droite). (Nelson & Cox, 2004)

L'assemblage des molécules des monomères de collagène fibrillaire entre eux se fait de façon spontanée (Prockop & Fertala, 1998). Les interactions hydrophobes et électrostatiques sont impliquées dans cet assemblage, les molécules de collagène s'assemblent dans une structure en cinq brins puis les fibres s'allongent par dépôt successif de monomères de collagène (Silver *et al.*, 1992).

En microscopie optique après une coloration HES (Hématexiline-Eosine-Safran) du tendon, on observe des fibres de collagène safranophile (donnant la couleur rose-orangée) regroupées en faisceaux longitudinaux parallèles serrés (figure 1-3). On trouve entre ces faisceaux, des fibroblastes spécialisés appelés ténocytes. Ces derniers se disposent en file parallèle et émettent des prolongements cytoplasmiques qui entourent plus ou moins complètement chaque faisceau élémentaire. Seul leur noyau allongé et chromatique (basophile, dense et homogène) est visible en microscopie optique entre les faisceaux de collagène. Il est à noter que les fibres de collagène au repos sont légèrement ondulées.

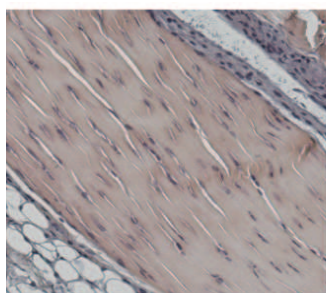


Figure 1-3. Microscopie optique d'un tendon d'Achille de souris après coloration HES.

Sur une coupe longitudinale de tendon observée en microscopie électronique, on distingue bien l'alternance de bandes sombres et claires correspondant à l'architecture particulière des fibres de collagène ; une bande claire correspond à la zone de chevauchement (overlap) des molécules de collagène tandis qu'une bande sombre correspond à une zone de trou (gap) (figure 1-4).

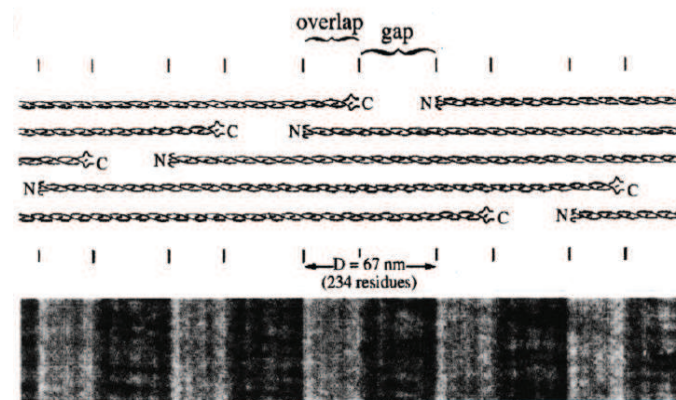


Figure 1-4. Présentation d'une fibre de collagène de type I d'un tendon de poulet en microscopie électronique. Le diagramme montre l'arrangement des molécules de collagène dans une fibre aligné avec l'image de microscopie électronique afin de mettre en évidence la structure « overlap-gap ». Les monomères de collagène mesurent 300nm et les zones gap 40nm. La période D correspond à une structure « overlap-gap » et mesure 67nm. Tiré de (Starborg et al., 2008).

La figure 1-5 présente la structure des fibres de collagène dans le tendon durant le développement et la croissance de l'organisme, le diamètre des fibres de collagène augmente progressivement jusqu'à atteindre un profil de fibres adulte (vers l'âge de trois mois chez la souris). L'augmentation de ce diamètre peut se faire par dépôt de nouveau collagène ou par fusion latérale de fibres lorsque le tendon vieillit (Scott & Parry, 1992). Le phénomène de fusion est rare dans un tendon jeune. L'analyse du diamètre moyen des fibres de collagène dans un tendon est réalisée à partir de clichés de microscopie électronique en coupe transversale. Il est ensuite possible de calculer à l'aide d'outils informatiques la distribution de la taille des fibres (Ezura et al., 2000; Jepsen et al., 2002).

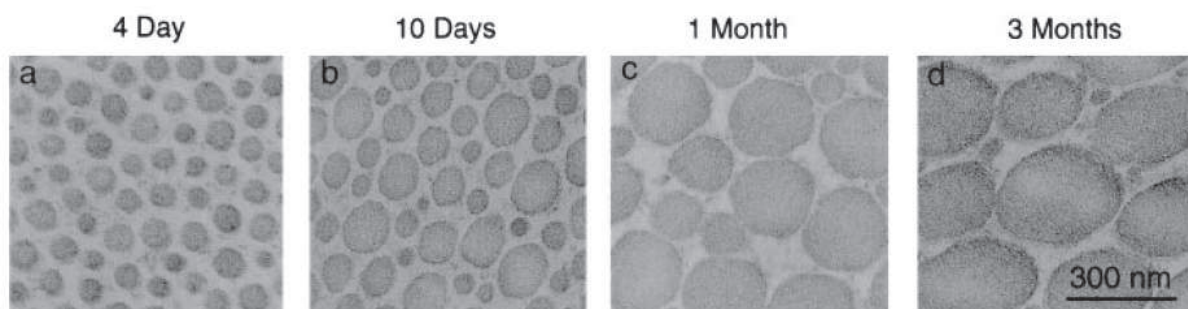


Figure 1-5. Structure des fibres de collagène durant le développement du tendon de souris analysée en microscopie électronique à transmission (Ezura et al., 2000).

B2. DEGRADATION DU COLLAGÈNE

La matrice extracellulaire du tendon se renouvelle lentement. Ce renouvellement est assuré par les ténoblastes et ténocytes qui maintiennent un équilibre entre synthèse et dégradation de la matrice extracellulaire. La dégradation de la matrice extracellulaire et plus particulièrement celle du collagène est assurée par des collagénases (Murphy & Nagase, 2008). Les collagénases sont des protéines de la famille des métalloprotéinases matricielles (matrix metalloproteinase ; MMP). Les MMP sont des endopeptidases dont l'activité dépend des ions zinc (Zn^{2+}) et calcium (Ca^{2+}). Elles sont

synthétisées sous la forme d'une pro-enzyme inactive. À l'état basal, les MMP ne sont pas exprimées de façon significative dans un tissu sain. L'activation des MMP se fait par le clivage du pro-domaine masquant le site catalytique. De plus, la présence de radicaux libres d'oxygène libérés par les cellules du système immunitaire en situation inflammatoire peut activer les MMP. Le niveau d'expression des MMP est maintenu à un état basal dans des conditions physiologiques mais augmente considérablement durant les phases d'inflammation, de réparation et de remodelage du tendon. Il existe une vingtaine de MMP connues, chaque MMP possède un ou plusieurs substrats spécifiques. Les MMP-1, -8 et -13 sont particulièrement importantes pour le tendon puisqu'elles dégradent le collagène de type I, II et III (Nagase *et al.*, 2006). Ces produits de dégradation du collagène sont également les substrats des enzymes telles que les MMP-2 et -9. Ces dernières sont des gélatinases qui s'attaquent de la même manière à des protéines de la MEC comme la fibronectine ou l'aggrécane (Riley, 2005a). Certaines MMP telles que la MMP-3 et la MMP-7 peuvent dégrader certains collagènes ainsi que des protéoglycanes (Imai *et al.*, 1997). Bien que ces MMP agissent sur les protéoglycanes, *in vivo* cette activité protéolytique est davantage associée aux protéases de type ADAMT (A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) également appelées aggrecanases (Melching *et al.*, 2006). L'activité de ces enzymes est régulée par une classe de molécules, les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP). TIMP-1 à -4 sont issus d'une famille 4 inhibiteurs des MMP qui permettent de réguler l'action des MMP en se liant sur leur site catalytique avec une forte affinité (Gomis-Ruth *et al.*, 1997). L'expression des MMP et TIMP sont modulées en conditions pathologiques.

C. LES PROTEOGLYCANES

Les protéoglycanes jouent un rôle clé dans la conformation de la matrice extracellulaire de nombreux tissus. Elles permettent de maintenir la minéralisation des os et des dents, la transparence de la cornée, la force de la peau et des tendons et la viscoélasticité des vaisseaux sanguins (Iozzo, 1999).

Les protéoglycanes les plus abondantes dans les tendons sont la décorine, la biglycan, la fibromoduline, la lumican, l'aggrécane et la versican dont les propriétés sont résumées dans le tableau 1-2. Les protéoglycanes et plus particulièrement les petites protéoglycanes riches en leucine (Small Leucine Rich Protein : SLRP) sont, après les collagènes, les protéines les plus abondantes dans la matrice extracellulaire (4,5%) (Derwin *et al.*, 2001). Les SLRP sont une famille de protéines ayant pour motifs structuraux une répétition de 6 à 10 séquences répétées riches en leucines adjacentes possédant de nombreuses modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations ou des substitutions avec des chaînes de GAG de différentes sortes.

Les SLRPs sont des protéines sécrétées ayant un rôle majeur dans la fibrillogenèse du collagène (Ezura *et al.*, 2000; Kuc & Scott, 1997; Scott, 1990). L'étude d'animaux invalidés pour différents SLRPs a permis de mieux comprendre l'impact des SLRPs sur la fibrillogenèse du collagène. Ameye *et al.* ont montré l'influence des SLRPs sur la taille des fibres de collagène en comparant le diamètre moyen des fibres de collagène I dans les tendons entre les animaux sauvages et mutants pour un ou deux SLRPs (Ameye & Young, 2002).

En plus des propriétés structurales de la matrice extracellulaire, les protéoglycanes ont également un rôle dans la signalisation cellulaire et sont capables d'influencer des fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation, la survie, l'adhésion, la migration et la réponse inflammatoire. Toutes ces fonctions sont la conséquence de la capacité des protéoglycanes à interagir avec des cytokines et des ligands ainsi que des récepteurs de surface (Schaefer & Schaefer, 2009). Des études ont montré qu'elles pouvaient avoir un rôle clé dans la signalisation cellulaire en modulant la synthèse de facteurs de croissance comme le Transforming Growth Factor beta (TGF- β) (Wei & Messner, 1998), en modulant de façon directe la croissance cellulaire (Kresse &

Schönherr, 2001) ou bien plus récemment comme agent anti proliférateur des cellules tumorales (Hu *et al.*, 2009).

d. STRUCTURE ET FONCTION DES PRINCIPALES PROTEOGLYCANES DU TENDON

Les huit protéoglycanes les plus abondantes dans le tendon sont présentées dans le tableau 1-2. On distingue 3 classes de protéoglycanes : les SLRPs de classe I (décorine et biglycan), les SLRPs de classe II (fibromoduline et lumican) et les protéoglycanes modulaires (aggrecan et versican).

Tableau 1-2. Présentation des protéoglycanes les plus abondantes dans le tendon. CS : chondroïtine sulfate, KS : keratane sulfate, SLRP : small leucine rich protein. Adapté de (Yoon et Halper, 2005).

Désignation	Classe	Taille (kDa)	Chaînes GAG (n)	Propriétés et rôle dans le tendon
Décorine	SLRP I	36	CS/DS (1) ou CS/DS (1)+KS (1)	Liaison au collagène fibrillaire, inhibe la fibrillogenèse, liaison au TGF- β et EGF
Biglycan	SLRP I	38	CS/DS (1-2)	Liaison au collagène fibrillaire
Fibromoduline	SLRP II	42	KS (4)	Liaison au collagène de type I, facilite la formation des fibres mature, module la force tendineuse
Lumican	SLRP II	38	KS (2-3)	Liaison au collagène de type I, inhibe le diamètre des fibres, module la force tendineuse
Aggrecan	Modulaire	220	CS (~100) KS (~60)	Liaison à l'acide hyaluronique, exprimé dans les zones de compression, faiblement exprimé dans les zones de tension
Versican	Modulaire	265-370	CS/DS (10-30)	Liaison à l'acide hyaluronique, exprimé dans les zones de compression, faiblement exprimé dans les zones de tension

Une classification des SLRPs a été réalisée en fonction de leur structure, suivant les motifs de répétition de résidus cystéines. Au sein de chaque classe, les protéoglycanes possèdent la même structure exonique suggérant une évolution par duplication de répétition en tandem de supermotifs (Matsushima *et al.*, 2000). Dans les tendons quatre SLRPs ont été retrouvés, il s'agit de la décorine, du biglycan, de la fibromoduline et du lumican. La décorine et le biglycan appartiennent à la classe I des SLRPs, ils partagent environ 57% d'homologie de séquence et leur motif consensuel est C_{x3}C_xC_{x6}C. Les SLRPs de classe I sont substitués d'une ou deux chaînes de chondroïtine/dermatane sulfate au niveau du dipeptide Ser-Gly. La fibromoduline et le lumican appartiennent à la classe II dont le motif consensuel est C_{x3}C_xC_{x9}C, ces protéines sont substituées de kératane sulfate et de polylactosamine (une forme non sulfatée du kératane sulfate). La figure 1-6 présente la structure des SLRPs les plus représentés dans le tendon (Kalamajski & Oldberg, 2010).

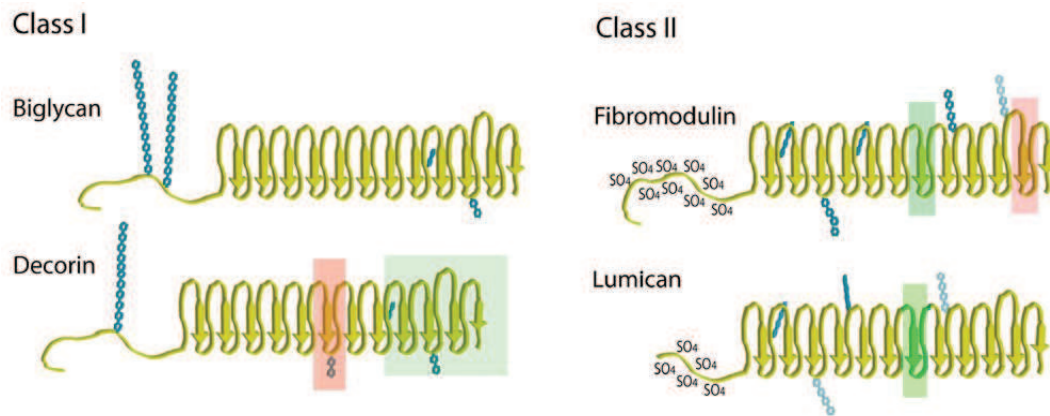


Figure 1-6. Schéma de la structure des principales SLRP du tendon. Les sites de liaisons avec le collagène sont matérialisés par des rectangles rouges pour les sites de haute affinité et vert pour les sites de faible affinité. Les modifications post traductionnelles sont notées, les glycosylations (chaîne bleue) et les sites de sulfatation possibles (SO_4). Adapté de (Kalamajski & Oldberg, 2010).

L'implication des protéoglycanes dans la résistance des fibres de collagène aux stress mécaniques est démontrée par la figure 1-7. Elle présente l'organisation des protéoglycanes visualisées au bleu Cupromeronic sur les fibres de collagène de tendon avant et après stress mécanique. Les protéoglycanes sont arrangées de façon perpendiculaire à travers les fibres de collagène dans les zones « gap » sur la bande D (Cribb & Scott, 1995). Les auteurs montrent que ces molécules sont complètement désorganisées après un fort stress mécanique (figure 1-6b).

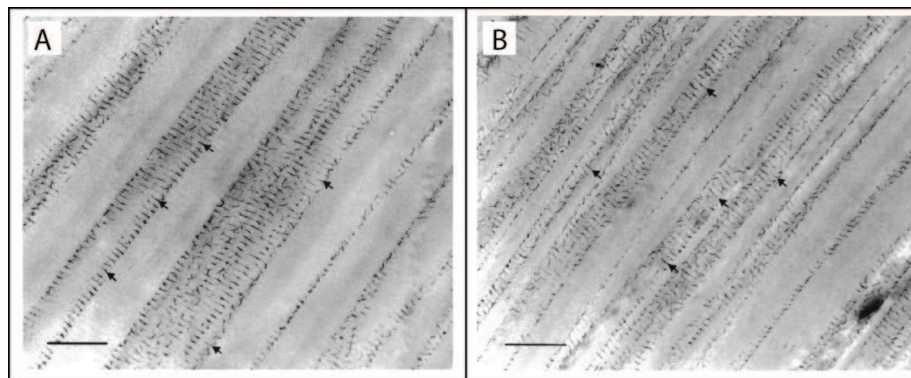


Figure 1-6. Coupes longitudinales dans le tendon de la queue de rat avant (A) et après (B) stress mécanique de 34.3 N/mm^2 montrant l'interaction entre protéoglycanes et collagène. Les protéoglycanes sont visualisées par une coloration au bleu Cupromeronic. Echelle : 500nm (Cribb & Scott, 1995).

D1. DECORINE ET BIGLYCAN

La décorine est composée de 3 domaines : une région N-terminale qui possède une chaîne latérale unique de type chondroïtine/dermatane sulfate, un motif distinct de résidus cystéine (CX_3CXCX_6C) et une région centrale composée de 10 répétitions riches en leucine, ces motifs sont les sites d'interaction protéine-protéine. La décorine peut se fixer sur de nombreux types de collagènes, incluant le type I (Scott & Orford, 1981), II (Vogel *et al.*, 1984), III (Thiesen & Rosenquist, 1995) et IV (Bidanset *et al.*, 1992) ainsi qu'au TGF- β (Hildebrand *et al.*, 1994; Yamaguchi *et al.*, 1990). La modélisation de la décorine humaine montre le positionnement de la décorine sur le collagène en arc de cercle, il est à noter qu'une seule triple hélice de collagène peut entrer dans la zone en d'arc de cercle formée par la décorine (Weber *et al.*, 1996). Le positionnement de la décorine sur la fibrille de collagène est controversé, cependant il semblerait que la décorine se fixe à proximité de la région

C-terminale du collagène de type I au niveau de la bande D (Scott & Orford, 1981) (Keene *et al.*, 2000). L'absence de décorine n'affecterait pas seulement la fibrillogenèse du collagène mais aussi la stabilité des fibres dans les tissus. En effet, il a également été montré que la décorine induit une inhibition de la prolifération cellulaire de lignées cellulaires de cancer de l'ovaire (SKOV3 et 2774) et de cellules de carcinome mammaire (Nash *et al.*, 1999; Santra *et al.*, 2000). Les souris invalidées pour la décorine possèdent des fibres de collagène trois fois plus grosses que les fibres sauvages et la distribution de celles-ci est irrégulière avec l'apparition d'une population de très petites fibres (40-60nm) absente chez les fibres sauvages (Danielson *et al.*, 1997). Ces anomalies structurales entraînent une altération des paramètres biomécaniques du tendon (Zhang *et al.*, 2006). L'apparition des grosses fibres montre que la décorine favorise les liaisons inter-fibre de collagène et empêche de cette façon la fusion latérale des fibres (Douglas *et al.*, 2006).

La biglycan est une SLRP de classe I. Elle se fixe au collagène de type I dans la zone "gap" des fibrilles. La biglycan inhibe la fibrillogenèse du collagène *in vitro* sans diminuer le diamètre final des fibres de collagène (Douglas *et al.*, 2006). Le diamètre des fibres de collagène de tendon des souris déficientes en biglycan n'est pas différent de celui observé chez la souris sauvage (Corsi *et al.*, 2002). La biglycan et la décorine semblent se fixer sur la même zone des fibrilles de collagène (Schonherr *et al.*, 1995). Cependant, d'autres études montrent que la biglycan ne se fixerait pas au collagène (Svensson *et al.*, 1995). La fixation potentielle de la biglycan sur le collagène n'est donc pas clairement établie.

D2. LUMICAN ET FIBROMODULINE

La lumican et la fibromoduline possèdent une structure similaire. *In vitro*, ces deux molécules se lient au même endroit sur le collagène de type I et affectent la fibrillogenèse du collagène (Svensson *et al.*, 2000; Vogel *et al.*, 1984). De plus, ces molécules possèdent les mêmes sites de fixation au TGF- β ce qui implique le « chevauchement fonctionnel » de ces deux protéines observé *in vivo* (Chakravarti, 2002). L'étude des animaux invalidés pour le gène codant pour la fibromoduline, la lumican ou les deux a permis de mieux comprendre l'impact de ces protéines sur la matrice extracellulaire. Le diamètre moyen des fibres de collagène des souris invalidées pour la lumican (Lum^{-/-}) est supérieur à celui des souris sauvages, tandis que celui des souris invalidées pour la fibromoduline (Fmod^{-/-}) est plus petit (Jepsen *et al.*, 2002). De façon étonnante, les animaux invalidés pour les deux gènes fibromoduline et lumican présentent un profil de taille de fibres de collagène comparable au contrôle sauvage, on observe cependant une forte irrégularité dans les fibres avec des structures dites en « chou-fleur » caractéristiques du syndrome d'Ehlers-Danlos (Pierard *et al.*, 1988). La différence se situe également au niveau fonctionnel puisque les tendons d'Achille des souris Fmod^{-/-} Lum^{-/-} ont des paramètres biomécaniques fortement altérés, l'élasticité du tendon (module de Young) est diminuée de 49% par rapport au contrôle sauvage (Jepsen *et al.*, 2002). La fibromoduline aurait donc un rôle dans la stabilisation des fibres de collagène permettant ainsi la croissance en diamètre tandis que la lumican interviendrait plus tard dans le développement et aurait un rôle dans la limitation du diamètre des fibres de collagène ainsi que dans leur allongement (Chakravarti, 2002). De plus, la fixation de la fibromoduline sur le collagène inhibe la fixation de la lumican sur celui-ci (Kalamajski & Oldberg, 2009).

D3. AGGREGAN ET VERSICAN

L'aggrecan et le versican sont des protéoglycanes de haut poids moléculaire de 220 et 265kDa respectivement. Ces molécules appelées également lecticans sont très riches en chaînes chondroïtine sulfate et kératane sulfate. Elles possèdent des sites d'interaction avec l'acide hyaluronique. Les lecticans sont des molécules hautement hydrophiles capables de retenir de l'eau jusqu'à 50 fois leur poids (Yamaguchi, 2000). Les lecticans sont localisées entre les fibres de collagène et ont un rôle dans les propriétés biomécaniques du tendon (Yoon & Halper, 2005).

e. GLYCOSAMINOGLYCANES ET GLYCOPROTEINES

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont des polymères linéaires composés d'une répétition de disaccharides. La présence de groupements sulfates ou carboxyles leur confère une charge négative importante. Les GAG qui sont retrouvés principalement sur les protéoglycanes se divisent en quatre groupes : 1) le chondroïtine sulfate et le dermatane sulfate, 2) le kératane sulfate, 3) l'acide hyaluronique ainsi que 4) l'héparane sulfate et l'héparine (Yoon & Halper, 2005).

Des glycoprotéines adhésives sont également retrouvées dans le tendon. Les principales glycoprotéines sont la fibronectine, la thrombospondine et la télescine-C. La fibronectine et la thrombospondine participent dans les processus de réparation et la régénération du tendon (Jozsa *et al.*, 1991). La télescine-C est un composant important de la matrice extracellulaire tendineuse capable de se lier à des récepteurs de surface tels que les intégrines et des composants de la matrice extracellulaire tels que les collagènes ou les protéoglycanes. La télescine-C est donc impliquée dans les interactions cellules-matrice extracellulaire (Jones & Jones, 2000). L'expression de la télescine-C est régulée par les contraintes mécaniques et est surexprimée dans les tendinopathies (Mehr *et al.*, 2000).

2. VASCULARISATION ET HYPOXIE

Le réseau vasculaire des tendons présente un haut degré de complexité. Les tendons sont majoritairement vascularisés au niveau des jonctions myo-tendineuses et des jonctions ostéo-tendineuses (Carr & Norris, 1989). Dans le cas du tendon d'Achille, un apport sanguin important provient également de son paratendon et de son mésotendon. Le mésotendon est un amas de tissu conjonctif lâche riche en vaisseaux sanguins situé à sa face antérieure du tendon d'Achille. Les quelques vaisseaux sanguins qui proviennent du paratendon et du mésotendon perforent transversalement le tendon d'Achille et se faufilent entre les faisceaux par l'endotendon (Naito & Ogata, 1983). L'hypovascularisation du tendon est en accord avec sa faible concentration cellulaire et son métabolisme lent. Cette description générale de la structure des tendons explique la difficulté à régénérer ces tissus.

3. EMBRYOGENESE ET DEVELOPPEMENT DU TENDON

Durant l'embryogenèse, la majorité des tissus conjonctifs sont issus du mésoderme. Les tendons, les os et les vaisseaux proviennent du mésoderme de la lame latérale tandis que les muscles proviennent du mésoderme somitique. La découverte du facteur de transcription spécifique des tendons, *scleraxis*, a permis d'étudier le développement du tendon. Il s'avère que durant l'embryogenèse l'expression de *scleraxis* est induite par des interactions de différentes parties de l'embryon (Schweitzer *et al.*, 2010), les tissus squelettiques (cartilage et os) dérivent du sclérotome tandis que les tissus musculaires dérivent du myotome. Les cellules progénitrices des tendons sont retrouvées dans le syndetome, une bande de cellules du sclérotome à la jonction de deux myotomes adjacents. L'expression de *scleraxis* dans les cellules du syndetome est induite par la production de Fibroblast Growth Factor (FGF) des myotomes adjacents (Brent *et al.*, 2003) (figure 1-8A). Au stade embryonnaire E12.5 de la souris, le tendon se trouve dans la phase d'organisation, les cellules progénitrices du tendon organisent des interactions cellulaires lâches entre le muscle en différenciation et les tissus squelettiques. Cette transition à la phase d'organisation dépend de la production de TGF- β . Le TGF- β permet le recrutement de nouvelles cellules progénitrices du tendon au niveau des futures jonctions entre tendon et muscle et tissu squelettique mais il permet également de maintenir une identité ténoblastique chez ces cellules progénitrices (Pryce *et al.*, 2009) (figure 1-8B). Pour la plupart des tendons leur formation dépend de la production du facteur FGF-4 par le muscle (Eloy-Trinquet *et al.*, 2009). Au stade embryonnaire E13.5 les cellules progénitrices du tendon se condensent et s'organisent distinctement en tendons connectant les

muscles aux cartilages ou aux os (figure 1-8C). Cette phase dépend pour certains tendons de la synthèse de sclérotine.

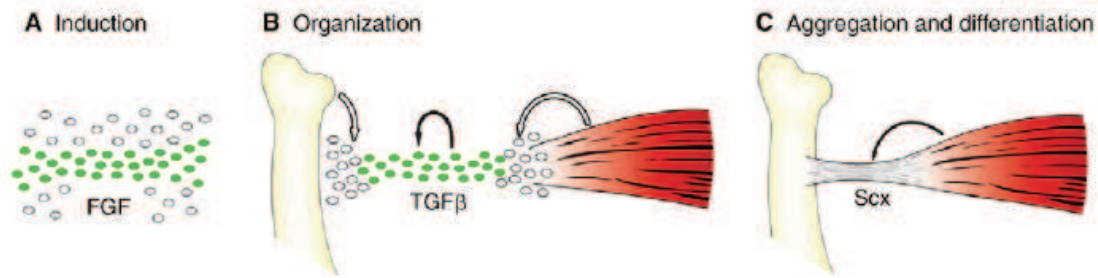


Figure 1-8. Les différentes phases et régulateurs de l'induction et la différenciation du tendon au stade embryonnaire chez les vertébrés. (A) Phase d'induction, (B) phase d'organisation, (C) phase d'aggrégation et de différenciation. Tiré de (Schweitzer et al., 2010).

4) BIOMÉCANIQUE ET CHARGE MÉCANIQUE DU TENDON

Les tendons ont longtemps été considérés comme de simples liens pour connecter les muscles aux os permettant la transmission de la force musculaire. Depuis, de nombreuses recherches ont clairement démontré leurs propriétés élastiques expliquant leur fonctionnement tels des « ressorts ». Les tendons ont en effet la capacité d'emmagasiner de l'énergie élastique lors d'un étirement, cette énergie est ensuite libérée lorsque la force de traction diminue. Cette propriété élastique permet au muscle de subir des allongements plus faibles lors d'un effort, lui permettant de générer une force supérieure (Freeman & Silver, 2004).

Les propriétés mécaniques du tendon d'Achille sont directement liées à sa constitution. Le diamètre et l'orientation des fibres de collagène sont des paramètres essentiels dans la biomécanique du tendon. Auparavant il a été rapporté que les fibres de collagène de type I (fibres parallèles les unes par rapport aux autres et extrêmement denses) sont peu flexibles avec une très forte force mécanique (Silver et al., 1979). Cependant, des études menées plus tard ont montré que la molécule de collagène de type I possède de nombreux sites de courbure donnant à la molécule une flexibilité (Silver & Birk, 1984). Cette flexibilité du collagène de type I est notamment due à l'absence de proline et d'hydroxyproline sur certaines séquences. Ces séquences correspondent aux sites de courbure sur la triple hélice de collagène (figure 1-9). Des études de modélisation ont montré que ces sites dépourvus de proline et d'hydroxyproline sont capable de former des boucles internes responsables de cette flexibilité. A l'inverse, les régions composées des motifs Gly-Pro-Hyp apparaissent comme les zones les plus rigides.

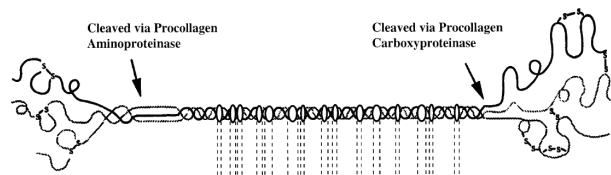


Figure 1-9. Diagramme d'une molécule de procollagène de type I, les zones entourées correspondent aux zones d'élasticité du collagène. Tiré de (Silver et al., 2003).

La composition en protéoglycanes du tendon va également jouer un rôle important sur ses propriétés biomécaniques (Chakravarti, 2002). Tandis que les fibres de collagène permettent au tendon de résister aux forces de tension, les protéoglycanes permettent aux fibres de collagène de mieux résister aux forces de compression (Williamson et al., 2001).

Afin d'évaluer la réparation du tendon d'Achille, il est nécessaire de calculer les paramètres biomécaniques du tendon. Pour ce faire, des tests de traction peuvent être réalisés, ceux-ci sont

effectués *ex vivo*, le tendon est alors placé dans un appareillage permettant un allongement de l'échantillon à une vitesse déterminée, la force de résistance de l'échantillon est mesurée en temps réel (figure 1-10b). La figure 1-10a présente une courbe tension-déformation typique avec trois régions distinctes pouvant être corrélées à différents niveaux de déformations. Dans la première région (appelée « toe region »), correspondant à de faibles contraintes, une très faible pression est suffisante pour allonger le tendon. Biologiquement, cette phase correspond à la suppression de l'ondulation macroscopique des fibres de collagène (Fratzl *et al.*, 1998) qui peuvent être visualisée au microscope optique (figure 1-3). Dans la deuxième région (appelée « heel region »), correspondant à des contraintes plus élevées, la pression augmente considérablement avec l'extension du tendon. Des études de diffraction de rayons X ont montré que les changements structuraux du tendon observés durant cette phase étaient liés à une diminution de la courbure des molécules de collagène (Misof *et al.*, 1997). La troisième région, qui correspond à la partie linéaire de la courbe, est atteinte lorsque les molécules de collagène sont totalement étirées. Cependant d'autres mécanismes sont mis en jeu tels que l'étirement des triples hélices de collagène ainsi que des liaisons transversales entre triple hélice entraînant un glissement des molécules de collagène les unes par rapport aux autres (Folkhard *et al.*, 1987; Sasaki & Odajima, 1996). Cet allongement linéaire du tendon continue jusqu'à atteindre un plateau plus ou moins grand, phase pour laquelle des micro-ruptures dans les fibres de collagène sont observées. Lorsque l'allongement du tendon devient trop élevé, une chute brutale de la contrainte est observée correspondant à la rupture totale du tendon. A partir de cette courbe, plusieurs paramètres peuvent être calculés : l'élasticité du tendon, également appelé module de Young (exprimé en MPa), la force à la rupture (Newton) et la contrainte maximale ($\% (l-l_0)/l_0$). Un tendon lésé possède des paramètres biomécaniques différents d'un tendon sain qui évoluent dans le temps. Sur un modèle de lésion chirurgicale du tendon d'Achille de rat, la force à la rupture et l'élasticité sont diminués de 75% quatre semaines après lésion (Steiner, 1982).

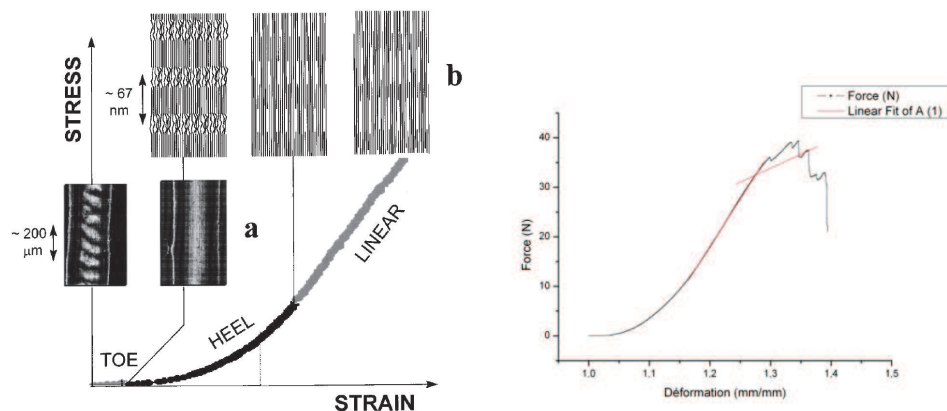


Figure 1-10. Biomécanique du tendon. A) Courbe type tension/déformation présentant les trois parties TOE, HEEL et LINEAR. a) Présentation d'une fibre de collagène au repos et en tension, adapté de (Fratzl *et al.*, 1998). b) représentation schématique des fibres de collagène pour chaque partie de la courbe tension/déformation. B) Courbe tension/déformation type d'un tendon d'Achille de rat.

5) MECANO TRANSDUCTION ET TENDON

La mécano transduction réfère au processus par lequel un organe converti une charge mécanique en une réponse cellulaire. Cette réponse cellulaire induit ensuite un changement structural de l'organe. La mécano transduction se décompose en plusieurs phases: le couplage mécanique, la communication intercellulaire et la réponse effectrice. Par exemple à chaque pas, le tendon d'Achille reçoit des tensions mécaniques provenant des insertions musculaires du complexe gastrocnémien-solaire. Les cellules du tendon vont ainsi percevoir cette tension mécanique et vont se déformer en déclenchant une cascade de réactions qui dépendent du type, de l'amplitude et de la durée du stress

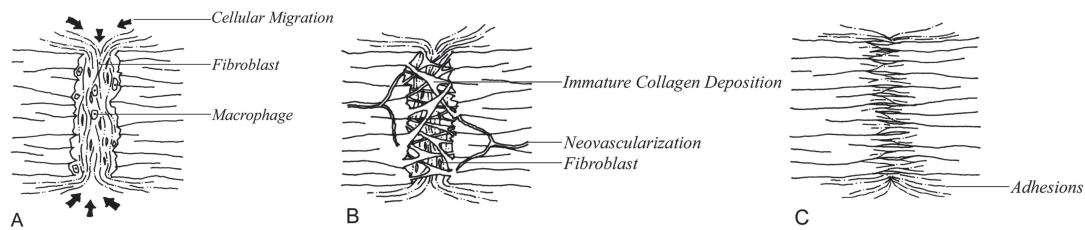
mécanique (Wall & Banes, 2005). Au sein du tendon, les ténocytes sont reliés par des jonctions gap et forment un réseau fonctionnel tridimensionnel permettant une réponse appropriée aux contraintes mécaniques telle que la synthèse de collagène (McNeilly *et al.*, 1996a; Strocchi *et al.*, 1991; Waggett *et al.*, 2006). Les jonctions gap sont de type communicantes, elles permettent le passage de métabolites, ions et petites molécules (< 1 kDa) du cytoplasme d'une cellule vers une autre (Goldberg *et al.*, 1999; Goodenough & Paul, 2003). Une jonction gap est composée de deux connexons annulaires formant des héli-canaux, chaque connexon provient d'une cellule différente et est lui-même composé de 6 connexines (Cx) (Evans & Martin, 2002). Il existe 21 gènes connus à ce jour codant pour les Cx, les jonctions gap les plus abondantes dans le tendon sont celles composées des Cx32 et Cx43. Les connexines ne sont pas retrouvées de façon homogène dans le tendon, Cx32 est retrouvé entre des cellules d'une même rangée (dans le sens de la contrainte mécanique) tandis que Cx43 est retrouvé entre des cellules d'une même rangée ainsi qu'entre les cellules adjacentes (dans tous les sens de contraintes). Les protéines Cx32 et Cx43 ne pouvant former de connexons hétéromériques, cette distribution représente deux réseaux de communication. Il est possible de visualiser les jonctions gap par microscopie électronique en cryofracture, ces jonctions ne sont pas isolées mais sont localisés en amas et forment des plaques sur la membrane plasmique, ces amas peuvent contenir d'une douzaine à plusieurs milliers de jonctions comme dans l'organe de Corti de l'oreille interne (Forge *et al.*, 1999; Segretain & Falk, 2004). Waggett *et al.* ont montré que le réseau formé de Cx32 entraîne, en réponse à un stress mécanique, une stimulation de la synthèse de collagène de type I tandis que le réseau formé de Cx43 aurait un effet inhibiteur sur cette synthèse (Waggett *et al.*, 2006). Stanley *et al.* ont rapporté que le taux de Cx32 et Cx43 diminue en fonction de l'âge du tendon, ils émettent l'hypothèse que ce phénomène soit directement lié à la diminution de la capacité de réparation du tendon avec l'âge (Stanley *et al.*, 2007). En réponse à un stress mécanique, un signal calcique va être généré, celui-ci va ensuite se propager aux autres cellules du réseau *via* les connexines (Bruzzone *et al.*, 1996). Tous les tendons ne seraient pas aussi sensibles aux charges mécaniques ainsi les tendons chargés (comme le tendon d'Achille) seraient plus sensibles que les tendons non chargés (par exemple le *flexor digitalis*). De plus, l'ATP pourrait jouer un rôle dans la mécanotransduction. En effet, il a été montré que les cellules pouvaient relarguer de l'ATP ou de l'UTP en réponse à des compressions cycliques (Lazarowski *et al.*, 1997; Yegutkin *et al.*, 2000).

II) LA REPARATION D'UNE LESION DU TENDON D'ACHILLE

1) LES ETAPES DE LA REPARATION DU TENDON

Les tendons les plus fréquemment touchés par les tendinopathies sont les tendons de la coiffe des rotateurs de l'épaule (particulièrement le tendon supra-épineux), le tendon du biceps brachial, les tendons fléchisseurs et extenseurs de l'avant-bras, le ligament patellaire du genou et le tendon d'Achille. Les lésions du tendon peuvent être aiguës ou chroniques. Elles peuvent être causées par des facteurs intrinsèques tels que l'âge, les prédispositions anatomiques, la laxité articulaire ainsi que des facteurs extrinsèques tels que le travail, le sport, le transport de charges lourdes ou de façon répété. Dans les troubles chroniques, les interactions entre les facteurs intrinsèque et extrinsèque sont fréquentes (Seitz *et al.*, 2011). Par exemple un problème de posture chez les coureurs inexpérimentés peut induire des tendinopathies du tendon d'Achille (Van Ginckel *et al.*, 2009). De plus, des facteurs intrinsèques comme des problèmes d'alignement anatomique ou biomécanique sont à la base des deux tiers des tendinopathies du tendon d'Achille chez les sportifs (Kvist, 1994). A défaut d'une réparation active des dommages dus à la fatigue du tendon, les tendons peuvent se fragiliser jusqu'à l'obtention d'une rupture (Ker, 2002). Le mécanisme de réparation est médié par les ténocytes présents dans le tendon qui permettent le maintien de la balance fine entre production et dégradation de la matrice extracellulaire. Les dommages du tendon peuvent également se produire à partir de contraintes faibles dans limites physiologiques, ainsi de fréquents

microtraumatismes cumulés ne laissent pas suffisamment de temps pour la réparation (Arndt *et al.*, 1998).



La réparation du tendon lors de tendinopathies a principalement été étudiée sur des animaux dont les tendons ont été sectionnés ou sur des tendons humains rompus. La réparation d'une lésion du tendon d'Achille telle qu'une rupture est un mécanisme complexe impliquant de nombreux facteurs. Celle-ci se déroule en trois phases (Sharma & Maffulli, 2006) : i) la phase inflammatoire, ii) la phase de réparation et iii) la phase de remodelage (figure 1-11). Durant la phase inflammatoire, des érythrocytes et des cellules immunitaires (les neutrophiles en particulier) entrent sur le site de la lésion, cette phase dure quelques jours. Durant les 24 premières heures, les monocytes et les macrophages prédominent et les tissus nécrotiques sont phagocytés. Des facteurs chimiotactiques et vasoactifs sont libérés augmentant la perméabilité vasculaire, l'angiogenèse, la prolifération des ténocytes ainsi que le recrutement de plus de cellules inflammatoires (Murphy *et al.*, 1994). Les ténocytes migrent progressivement vers le site de lésion et synthétisent du collagène de type III pour combler la brèche et ponter les berges de la lésion, la production de collagène III est augmentée par rapport à celle du collagène I (Riley, 2005b; Riley *et al.*, 1994). Après plusieurs jours, la phase de réparation commence et la synthèse de collagène III atteint son maximum. Après approximativement 6 semaines débute la phase de remodelage, durant cette phase le tissu réparé est reformé. Une baisse du nombre de cellules dans le tendon intervient ainsi que baisse de la production des collagènes et GAG. La phase de remodelage peut être divisée en deux phases, celle de la consolidation et celle de la maturation. La phase de consolidation commence à 6 semaines et dure jusqu'à 10 semaines approximativement. Dans cette période, le tissu réparé passe d'un état cellulaire à un état fibreux. Le métabolisme des ténocytes reste élevé et les ténocytes ainsi que les fibres de collagène s'alignent dans la direction du stress, c'est-à-dire dans l'axe muscle-os. Durant cette phase une proportion de collagène de type I plus élevée est synthétisée. Après 10 semaines débute la phase de maturation qui peut durer jusqu'à une année. Durant cette phase, le tissu fibreux se transforme progressivement en tendon cicatrisé.

2) FACTEURS MOLECULAIRES IMPLIQUES DURANT LA REPARATION TENDINEUSE

Le processus de réparation du tendon d'Achille est lent et le plus souvent incomplet. Afin d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques, l'étude des facteurs moléculaires impliqués durant la réparation tendineuse est indispensable.

Les études de réparation du tendon d'Achille après rupture chirurgicale ont permis de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans ce phénomène. En effet, les microruptures dues aux surcharges semblent reproduire à l'échelle microscopique la cascade d'événements faisant suite à une macrorupture du tendon. Des études de biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence les facteurs favorisant le processus de réparation, qui est premièrement médié par les MMP, les ADAMT (Riley *et al.*, 2002) et les TIMP leurs inhibiteurs tissulaires (Nagase *et al.*, 2006). L'expression de ces facteurs est modifiée en condition pathologique. L'expression de MMP-9 et MMP-13 augmente entre les jours 7 et 14 post lésion tandis que les niveaux d'expression des MMP-2, MMP-3 et MMP-14 restent élevés jusqu'à 28 post lésion. Ces résultats suggèrent que les MMP-9 et MMP-13

participent uniquement dans la dégradation du collagène tandis que les MMP-2, MMP-3 et MMP-14 participent à la fois dans la dégradation et dans le remodelage du collagène (Riley *et al.*, 2002). L'inflammation provoque également le relargage de facteurs de croissance et de cytokines à partir des plaquettes, des leucocytes polymorphonucléaires et des macrophages. Ces facteurs induisent une néovascularisation et stimulent la prolifération des fibroblastes et des ténocytes favorisant ainsi la synthèse de collagène (Sharma & Maffulli, 2006). Les facteurs les mieux connus sont les facteurs de croissance et de différenciation (GDF/BMP) ainsi que scleraxis. Les GDF sont une sous famille de protéines appartenant à la super famille des TGF- β (Herpin *et al.*, 2004). Les GDF-5, GDF-6 et GDF-7 sont principalement connues pour jouer un rôle dans l'ostéogenèse, cependant ils sont également impliqués dans la morphogenèse du tendon (Aslan *et al.*, 2008). Une étude récente présente d'ailleurs le GDF-5 comme un candidat thérapeutique dans le cadre des lésions du tendon (Hogan *et al.*, 2011). Le bFGF (basic fibroblast growth factor ou FGF-2) ainsi que ses récepteurs sont également connus pour être surexprimés dans le processus de réparation tendineuse (Molloy *et al.*, 2003). Ce facteur de croissance potentialise le recrutement de leucocytes après inflammation en permettant la surexpression de cytokines et de facteurs chimiotactiques (Zittermann & Issekutz, 2006), il permet également de coordonner la croissance et la prolifération des fibroblastes.

3) THERAPIES ACTUELLES DES TENDINOPATHIES

1. LES ANTI-INFLAMMATOIRES

Historiquement, le terme tendinite était utilisé pour décrire une douleur chronique impliquant une inflammation comme processus pathologique central. Cependant, le traitement de ces pathologies par des anti-inflammatoires a un succès limité (Andres & Murrell, 2008). En effet, des études histologiques ont montré la présence de lésions dégénératives avec une absence ou une inflammation minime (Alfredson *et al.*, 2001; Alfredson *et al.*, 2000). Traditionnellement, on parle de tendinite pour toute douleur tendineuse liée à une activité physique. Cette terminologie implique que la douleur résulte d'un processus inflammatoire (suffixe « ite »). Les modalités de traitement ont principalement eu pour but de contrôler cette inflammation (traitement symptomatique). Les principaux traitements incluent donc le repos, l'utilisation d'anti-inflammatoire non stéroïdiens (AINS) ainsi que l'administration de corticostéroïdes (anti-inflammatoires stéroïdiens) *per os* ou par injections. Cependant, deux problèmes subsistent dans cette approche. Tout d'abord, plusieurs études montrent qu'une faible voire aucune inflammation n'est présente dans les tendinopathies chroniques (Alfredson *et al.*, 2001; Alfredson *et al.*, 2000; Soslowky *et al.*, 2000). De plus, les anti-inflammatoires ont un succès limité sur les phénomènes inflammatoires chroniques, une fois la phase aiguë résolue. Récemment, le terme tendinite a été remplacé par tendinopathie, pour ne pas obscurcir le mécanisme physiopathologique responsable de la douleur développée en réponse à une surutilisation des tendons (Maffulli *et al.*, 1998).

2. LA PHYSIOTHERAPIE

D'autres traitements symptomatiques des tendinopathies sont employés tels que l'utilisation des thérapies physiques incluant la iontophorèse, la phonophorèse, les ondes de chocs, les ultrasons ainsi que la stimulation laser à faible intensité. Toutes ces thérapies physiques ont un point en commun : la stimulation physique des cellules du tendon lésé. La plus employée est l'utilisation d'ultrasons. En plus d'être une méthode efficace d'imagerie du tendon et des tissus mous en général (structure anatomique et vascularisation), l'utilisation des ultrasons a un rôle thérapeutique. La Food and Drug Agency (FDA) approuve ces traitements des tendinopathies par l'utilisation d'ultrasons thérapeutiques. Des effets purement mécaniques sont observés dans les tissus, du fait des vibrations cellulaires, des compressions alternées à des expansions causent des variations de pression. Cet effet mécanique provoque de véritables micro-massages tissulaires qui peuvent

aboutir à une dilacération des fibres du tissu conjonctif. Cet effet fibrolytique ou sclérolytique est utilisé dans le traitement des adhérences et des cicatrices douloureuses.

Par ailleurs, de nombreuses études montrent les effets bénéfiques des ultrasons sur la réparation des tendons et de façon générale les tissus mous (Fu *et al.*, 2010; Lu *et al.*, 2009; Ng, 2011; Tsai *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2006; Warden *et al.*, 2008; Wood *et al.*, 2010). Toutes ces études montrent un effet des ultrasons sur la stimulation de la réparation tissulaire (synthèse de collagènes, production de facteurs de croissance et la prolifération cellulaire). Alexander *et al.* ont passé en revue les différentes études sur l'utilisation des ultrasons en physiothérapie des tendons de la coiffe des rotateurs de l'épaule (Alexander *et al.*, 2010). Les auteurs ont comparé les différentes doses ultrasonores administrées et les effets thérapeutiques obtenus. Différents paramètres entrent en jeu dans cette analyse : l'intensité ultrasonore (W/cm^2), le cycle d'utilisation (duty cycle) (%), le temps de stimulation (s), la taille de la sonde (cm^2) et le nombre de stimulations. Ils ont ainsi montré que des effets favorables sur les tendinopathies de l'épaule ont lieu lorsqu'une énergie ultrasonore délivrée d'au moins 2250 J (énergie totale délivrée par les ultrasons) par traitement est appliquée. Lorsque la dose est inférieure à 720 J par administration, les effets bénéfiques ont rarement été observés. Ces observations indiquent que les différents traitements des lésions des tissus mous par ultrasons réalisés jusqu'à maintenant ne l'ont pas été fait avec les paramètres optimaux et qu'il est donc difficile de conclure sur l'efficacité de cette méthode. Il est intéressant de noter dans cette étude que les calculs d'énergie ultrasonore délivrée tiennent compte de la pression acoustique et du milieu dans lequel les ultrasons se propagent, mais ne tiennent pas compte de la fréquence utilisée. Les mécanismes d'action des ultrasons sur l'amélioration du mécanisme de réparation des tendons et des tissus mous sont jusqu'ici peu connus et seront détaillés dans la partie 3 de l'introduction.

3. LES METHODES CHIRURGICALES.

La chirurgie est souvent employée en dernier recours, lorsque les différents traitements symptomatiques ne sont pas efficaces. Différentes méthodes chirurgicales sont utilisées en fonction de la lésion. Pour les ruptures tendineuses, le chirurgien effectue une suture du tendon afin de restituer une continuité dans les tissus. Dans le cas de pathologies chroniques, les méthodes chirurgicales consistent à stimuler le processus de réparation tendineuse en réalisant un peignage ou un débridement du tendon. Le peignage consiste à dissocier les fibres de collagène tandis que le débridement consiste à retirer la partie de la gaine en cause dans la tendinopathie. L'efficacité de ces techniques chirurgicales reste limitée par les phénomènes cicatriciels et notamment la fibrose qui peut mutiler davantage les structures saines avoisinantes et être de nouveau responsable de douleurs chroniques.

4) LES THERAPIES INNOVANTES

1. LES FACTEURS DE CROISSANCE

De nouvelles thérapies des tendinopathies sont en développement. Parmi ces nouvelles thérapies, l'utilisation de facteurs de croissance est très étudiée. Du fait des caractéristiques histologiques des tendons (hypocellularité et faible vascularisation), la réparation est longue et difficile. L'apport de facteurs de croissance pour stimuler la réparation tendineuse est une approche thérapeutique envisagée par de nombreuses équipes. Des niveaux élevés de facteurs de croissance tels que les TGF- β , le VEGF et le PDGF sont naturellement synthétisés après lésion du tendon et l'administration de ces facteurs de croissance de façon exogène peut accélérer le processus de réparation (Hou *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011; Suwalski *et al.*, 2010; Thomopoulos *et al.*, 2009). L'utilisation de plasma riche en plaquettes (PRP) est une technique ayant montré un bénéfice dans la réparation tendineuse (Aspenberg & Virchenko, 2004; Majewski *et al.*, 2009). De nombreux facteurs de croissance ont été retrouvés dans les lysats plaquettaires dont le VEGF, l'IGF et le bFGF dont les

effets sur la prolifération des ténocytes ont été montrés (Aspenberg & Virchenko, 2004). Cette technique facile à mettre en place, permet d'utiliser des agents autologues qui ont les propriétés de stimuler de façon physiologique la différenciation et la prolifération cellulaire. Des études ont également porté sur l'utilisation d'un seul facteur de croissance.

- TGF- β

Le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) appartient à une famille de peptides multifonctionnels qui régulent la prolifération et la migration cellulaire, le développement et le remodelage tissulaire à la suite d'une lésion. Il joue un rôle clé dans la réponse tissulaire à la lésion. L'interaction du TGF- β sur son récepteur induit principalement une signalisation via les voies SMAD (Massague & Wotton, 2000). La superfamille des TGF- β comprend également les Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Ces dernières se fixent sur les récepteurs BMPR pour activer la voie SMAD (Nishimura *et al.*, 2003). Il existe trois isoformes humaines du TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3, codées par trois gènes distincts. Le TGF- β a fait l'objet de nombreuses études depuis sa découverte dans les années 1980. Le TGF- β 1 a un effet antagoniste des TGF- β 2 et TGF- β 3 (Shah *et al.*, 1995). Le TGF- β 1 induit la formation du tissu cicatriciel tandis que TGF- β 3 réduit sa formation (Campbell *et al.*, 2004). Il a un rôle dans la phase précoce suivant la lésion tissulaire en induisant la synthèse de collagène de type III par les fibroblastes. Ce type de collagène est le constituant principal du tissu fibreux cicatriciel. Il a également été montré sur des cultures cellulaires qu'en réponse à une stimulation mécanique, une augmentation de TGF- β 1 est mesurée (Tsai *et al.*, 2006). Une étude récente sur un modèle de lésion du tendon d'Achille montre que la délivrance de TGF- β 3 de façon soutenue sur le site lésionnel accélère le processus de réparation en recrutant des cellules inflammatoires et en favorisant la vascularisation et la prolifération cellulaire (Manning *et al.*, 2011). Une autre étude a montré que l'injection de 100ng d'hepatocyte growth factor (HGF) au site de lésion du tendon d'Achille améliore la réparation tissulaire en inhibant la synthèse de TGF- β 1 et en augmentant la production de MMP-2 (Cui *et al.*, 2010). Dans la famille des BMP, les BMP-2/4 et BMP-7 sont principalement connues pour leur capacité à induire respectivement la formation d'os et de cartilage *in vivo* en influençant la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (Sampath *et al.*, 1992). Le BMP-12 (également appelé GDF-7 chez la souris) est cependant mieux connu pour sa capacité à stimuler la formation du tendon (Wolfman *et al.*, 1997). Le BMP-12 stimule la production de scleraxis et de ténomoduline, deux marqueurs des ténocytes sur des cultures de cellules souches mésenchymateuses de rat (Lee *et al.*, 2011). L'utilisation de la protéine recombinante GDF-5 (100ng/ml) (BMP-14) sur un modèle de lésion de fibroblastes murins a permis d'augmenter la production de collagène I et d'aggrecan. *In vivo* l'utilisation du GDF-5 a également montré sur un modèle de ténotomie partielle une amélioration de l'organisation de matrice extracellulaire, GDF-5 serait donc un candidat thérapeutique potentiel dans le cadre des lésions du tendon (Hogan *et al.*, 2011).

- VEGF

Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est un facteur de croissance très impliqué dans la formation de néo capillaires du tissu de granulation cicatriciel (Molloy *et al.*, 2003). Ce tissu richement vascularisé permet l'arrivée des cellules inflammatoires et fibroblastiques. Il existe 5 isoformes de VEGF (VEGF-A à VEGF-E). Le VEGF se fixe sur les récepteurs VEGFR1 et VEGFR2 qui activent la voie MAPK ERK 1/2. La surexpression du VEGF a montré des effets bénéfiques sur la réparation tendineuse (Hou *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2008). Une étude montre cependant les limites de l'utilisation du VEGF. En transfectant le VEGF dans des cultures de ténocytes, Wang *et al.*, ont montré que les niveaux d'expression du TGF- β était augmenté, cependant l'expression collagènes de type I et III était restée inchangée par rapport au contrôle (Wang *et al.*, 2005).

- PDGF

Le Platelet Derived Growth Factor est un constituant du sérum sanguin produit par les plaquettes. Il existe quatre isoformes (A, B, C et D), le dimère PDGF-BB est celui qui possède la plus grande affinité pour le récepteur PDGFR- β . Le PDGF est également impliqué dans le processus de réparation tissulaire. Il stimule la prolifération cellulaire, la diapédèse, le recrutement de cellules inflammatoires et la synthèse de matrice extracellulaire (Thomopoulos *et al.*, 2005). *In vivo*, des études montrent que l'administration en bolus de PDGF-BB dans les tendons lésés, augmente de façon modérée la synthèse de collagène et la prolifération cellulaire (Hildebrand *et al.*, 1998; Woo *et al.*, 1998). Toutefois l'élimination rapide de ce facteur de croissance sur le site lésionnel limite sa durée d'action et donc son efficacité (Robinson & Talmadge, 2002). Une stratégie de délivrance de ce facteur de croissance doit être développée afin de maîtriser sa cinétique d'action. Une des stratégies étudiée est l'administration de matrices de fibrine contenant le facteur de croissance à délivrer (Sakiyama-Elbert *et al.*, 2008; Thomopoulos *et al.*, 2007).

- bFGF

Le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) est une cytokine ubiquitaire connue également sous le nom de FGF2. Le bFGF a un rôle dans l'angiogenèse, la synthèse de protéoglycanes de la MEC, le chimiotactisme et la prolifération de fibroblastes pour la formation du tissu de granulation cicatriciel, ces effets ont été démontrés *in vitro* et *in vivo* (Chan *et al.*, 2000; Molloy *et al.*, 2003; Thomopoulos *et al.*, 2005).

- IGF-1

L'Insulin Growth Factor-1 (IGF-1) est synthétisée par le foie sous le contrôle de l'hormone de croissance hypophysaire (GH). L'IGF-1 joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la synthèse de collagène dans le tendon (Abrahamsson *et al.*, 1991; Banes *et al.*, 1995). Dans le muscle, après électroporation d'un vecteur contenant le gène codant pour IGF-1, une hypertrophie musculaire est observée (Alzghoul *et al.*, 2004). Dahlgren *et al.* ont montré que l'injection de 2 μ g d'IGF dans le site lésionnel tous les jours durant 10 jours accélère le processus de réparation tendineuse sur un modèle de lésion tendineuse chez le cheval (Dahlgren *et al.*, 2002).

2. LA THÉRAPIE GÉNIQUE

L'utilisation de ces facteurs de croissance a montré un effet bénéfique sur la réparation des tendons lésés, cependant le problème de ce type de thérapie est la délivrance des facteurs de croissance. En effet, le temps de demi-vie des facteurs de croissance après injection est faible et leur production très onéreuse. Une solution possible est de transférer par thérapie génique le gène codant pour un facteur thérapeutique (Hildebrand *et al.*, 2004). Cette alternative permet une délivrance continue de la molécule thérapeutique. C'est la stratégie développée au laboratoire. Plusieurs études ont déjà utilisé la thérapie génique pour la délivrance de facteurs thérapeutiques dans les tendons : le BMP-12 (Kuroda *et al.*, 2010; Lou *et al.*, 2001), le BMP-13 (Gulotta *et al.*, 2011b), le BMP-14 (Bolt *et al.*, 2007), le TGF- β 1 et le VEGF (Hou *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2005), le PDGF (Suwalski *et al.*, 2010) et scleraxis (Gulotta *et al.*, 2011a).

3. LES CELLULES SOUCHES ET INGÉNIERIE TISSULAIRE

La seconde alternative est l'utilisation de cellules souches, quelques études ont montré le potentiel de cette méthode (Chong *et al.*, 2007; Gulotta *et al.*, 2009; Hankemeier *et al.*, 2009; Ouyang *et al.*, 2004). Chong *et al.* ont injecté des cellules souches dérivées de la moelle osseuse couplé à une colle de fibrine dans un modèle de réparation du tendon d'Achille chez le lapin (Chong *et al.*, 2007). Ils rapportent une amélioration du module de Young ainsi qu'une meilleure

organisation du collagène par rapport au contrôle après 3 semaines. Cependant après 6 et 12 semaines aucune différence significative n'est retrouvée. Ce type de thérapie améliore donc les paramètres histologiques et biomécaniques dans les stades précoces de la réparation. Plus récemment, Hankemeier *et al.* ont comparé l'injection de cellules souches mésenchymateuses avec l'injection de fibroblastes sur un modèle de lésion du tendon patellaire chez le rat (Hankemeier *et al.*, 2009). L'injection de cellules souches induit une amélioration significative des paramètres biomécaniques, de la structure du tendon ainsi qu'une stimulation de la production de matrice extracellulaire tandis que l'injection de fibroblastes n'a eu que des effets mineurs sur la stimulation de la réparation. Le but de l'utilisation de ces cellules souches est qu'elles apportent les facteurs de croissance nécessaires à la réparation. Menetrey *et al.* montrent en utilisant des vecteurs adénoviraux transportant un gène rapporteur LacZ la preuve de faisabilité de la technique, ils observent une expression du transgène jusqu'à 42 jours après injection des cellules transfectées dans le ligament croisé antéro-externe du genou chez le lapin (Menetrey *et al.*, 1999). Gulotta *et al.* montrent également que l'injection de cellules souches mésenchymateuses transfectées par des adénovirus contenant la séquence pour scleraxis améliore les paramètres biomécaniques après 4 semaines dans un modèle de tendon lésé de la coiffe des rotateurs (Gulotta *et al.*, 2011a). Cependant, sur le même modèle, l'injection de cellules souches mésenchymateuses surexprimant par transfection le BMP-13 n'améliore pas les paramètres biomécaniques et histologiques du tendon (Gulotta *et al.*, 2011b).

Les cellules souches sont le plus souvent utilisées dans une matrice. De la même façon que pour la délivrance des facteurs de croissance, la matrice permet aux cellules souches injectées de rester sur le site d'injection. Cette matrice permettrait la fabrication de tissus artificiels pour l'auto greffe du tendon. Il s'agit de développer un "échafaud" biodégradable contenant les types cellulaires spécifiques permettant la réparation tissulaire. L'idée est donc de concevoir pour le tendon une matrice proche de la composition de celle du tendon contenant également des cellules qui pourront synthétiser les facteurs moléculaires nécessaires à la réparation tissulaire. Les matrices utilisées sont biodégradables et ont une durée de vie limitée.

III) MODELES D'ETUDE DE LA REPARATION TENDINEUSE

Afin d'étudier la réparation tendineuse il est nécessaire de développer un bon modèle d'étude. Les modèles trouvés dans la littérature tentent de mimer les pathologies humaines.

1) LA SURUTILISATION/SURCHARGE MECANIQUE

Le facteur le plus utilisé pour le développement de tendinopathie dans les modèles animaux est la surcharge mécanique. Cette surcharge mécanique est le plus souvent créée en forçant l'animal à courir sur un tapis de course (Huang *et al.*, 2004; Soslowky *et al.*, 1996), en stimulant artificiellement le muscle (Archambault *et al.*, 2001; Messner *et al.*, 1999) ou l'étirement direct du tendon grâce à une charge externe. Les tapis de course sont les plus employés pour induire une adaptation du système musculo squelettique, cependant il a des succès variables dans la création de tendinopathies dues à la surutilisation. La raison principale réside dans le fait que les études cherchant à créer ces tendinopathies utilisent des animaux habitués à la course comme les rongeurs. Il est à noter que les rongeurs courent 8 km par nuit dans la nature. La capacité d'adaptation de ces animaux pour la course rend donc difficile l'induction de lésions dues à une surutilisation. La plupart des études utilisant des tapis de course, font courir les animaux durant moins de 2 heures par jour à 20 mètre / min correspondant à une distance parcourue de 2,5km par jour. Les tapis de course ont permis de développer des tendinopathies du tendon supra-épaveux (Soslowky *et al.*, 2000) chez le rat mais pas dans le tendon d'Achille (Huang *et al.*, 2004). Cependant selon Glazebrook *et al.*, l'utilisation de tapis de course a permis de développer un modèle de tendinopathie dans le tendon d'Achille de rat (Glazebrook *et al.*, 2008).

2) LA COLLAGENASE

L'un des modèles de lésion du tendon consiste à injecter de la collagénase combinée à la prostaglandine E2 (Warden, 2007). La collagénase est utilisée dans l'étude des tendinopathies chroniques. L'introduction de ces composés génère des modifications histologiques et mécaniques dans les tendons, cependant cela ne semble pas suffisant pour induire le développement d'une pathologie reproduisant celle observée chez l'homme. L'utilisation de collagénase entraîne une dégénération de la matrice tendineuse en augmentant la dégradation du collagène. Toutefois, la collagénase induit une réaction inflammatoire aiguë et intense suivie d'une réparation progressive du tendon. Cette méthode ne reproduit donc pas la pathologie observée chez l'homme. De plus, cette méthode est peu reproductible.

3) LA LESION CHIRURGICALE DU TENDON D'ACHILLE

Un autre modèle d'étude de la réparation tendineuse est l'induction d'une lésion mécanique chirurgicalement. Deux types de lésions sont retrouvés dans la littérature, les lésions longitudinales et les lésions transversales. Les lésions longitudinales (dans le sens des fibres de collagène) sont couramment utilisées chez l'homme pour accélérer la réparation tendineuse (technique de peignage). Les lésions transversales (ou ténotomies) sont le plus souvent utilisées, elles sont partielles ou totales. Au laboratoire, afin d'étudier la réparation tendineuse et de proposer une thérapie efficace, nous avons mis en place un modèle de lésion du tendon d'Achille. Chez le rat, nous avons induit une tendinopathie aiguë en effectuant chirurgicalement une triple lacération mécanique verticale du tendon d'Achille.

4) LE SYNDROME D'EHLERS-DANLOS

Le syndrome d'Ehlers-Danlos (SED) est une maladie génétique autosomale rare dont la fréquence d'apparition de nouveau cas est de 1/5000 à 1/10000 naissances. Décrite au début du XXème siècle par un danois Ehlers et un français Danlos ce syndrome touche la matrice extracellulaire. Ce syndrome regroupe des affections génétiques rares et différentes, actuellement plusieurs types sont répertoriés et les causes en sont variables. Cependant, il est prouvé qu'il peut s'agir, dans certains types, d'un déficit en collagène III ou V. Parmi les signes cliniques on retrouve une hyper-élasticité de la peau, qui est très fragile et se déchire pour des chocs minimes avec plaies béantes, et cicatrisation longue et difficile. Une hyper-laxité articulaire avec instabilité, causant des sub-luxations fréquentes partielles ou totales. Des hématomes nombreux, spontanés, sans troubles de la coagulation. Des douleurs chroniques sont souvent présentes et peuvent parfois s'accompagner d'arthrose précoce des articulations. Des hernies peuvent survenir à tous les âges, souvent récidivantes, même après traitement. Une fatigabilité importante est également observée. La combinaison de ces signes constitue des entités cliniques différentes qui ont été classifiées par des groupes de spécialistes à Berlin puis à Villefranche en 1997 (Beighton *et al.*, 1998) (tableau 1-3). Les types les plus fréquents (80%) sont les types I, II et III. Les types I et II sont principalement induit par une mutation du gène Col5a1 codant pour le collagène de type V (Schwarze *et al.*, 2000). Des complications moins fréquentes peuvent être graves telles que des perforations du colon qui des atteintes cardiaques banales (prolapsus de la valve mitrale) est fréquente. Il peut également exister une rupture de l'utérus lors des grossesses ou de l'accouchement, associée à de possibles naissances prématurées. Ces complications se voient principalement dans le type IV. Au niveau oculaire, il peut exister des risques de lésion de la cornée, des sub-luxations du cristallin ou décollement de la rétine dans le type VI. Le type VIII est plus spécialement associé à une atteinte dentaire. Il existe des formes légères, moyennes ou sévères.

Tableau 1-3. La combinaison des signes cliniques constitue des entités cliniques différentes. Une nouvelle classification simplifiée (classification de Villefranche) permet de repérer 6 types de SED. Tiré de (Abel & Carrasco, 2006)

Villefranche types	Corresponding Berlin types	Collagen defects
Classical	I (gravis) II (mitis)	Type V
Hypermobility	III (hypermobile)	Unknown
Vascular	IV (arterial-ecchymotic)	Type III
Kyphoscoliosis	VI (ocular-scoliotic)	Lysyl hydroxylase
Arthrochalasia	VIIa (arthrochalasia multiplex congenita) VIIb (arthrochalasia multiplex congenita)	Type I
Dermatosparaxis	VIIc (human dermatosparaxis)	Procollagen N-peptidase

Nous disposons au laboratoire d'une lignée de souris génétiquement modifiée pour deux gènes codant pour des protéoglycanes : la fibromoduline et le lumican. Ces deux gènes interviennent dans l'assemblage du collagène durant la fibrillogenèse. Les souris invalidées pour ces deux gènes ont des caractéristiques phénotypiques proches de ceux observés dans le syndrome d'Ehlers-Danlos (Jepsen *et al.*, 2002). Nous nous baserons sur ce modèle afin de valider notre technique thérapeutique de restauration génique. D'autres modèles murins du syndrome d'Ehlers-Danlos ont également été mis en place, Corsi *et al.* ont développé un modèle du type hypermobile en invalidant les gènes codant pour la décorine et la biglycan (Corsi *et al.*, 2002). Cooper *et al.* ont développé un modèle du type vasculaire en invalidant le gène COL3A1 codant pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type III (Cooper *et al.*, 2010).

IV) REFERENCES

- Abel, M. D., & Carrasco, L. R. (2006). Ehlers-Danlos syndrome: classifications, oral manifestations, and dental considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 102(5), 582-590.
- Abrahamsson, S. O., Lundborg, G., & Lohmander, L. S. (1991). Recombinant human insulin-like growth factor-I stimulates in vitro matrix synthesis and cell proliferation in rabbit flexor tendon. *J Orthop Res*, 9(4), 495-502.
- Alexander, L. D., Gilman, D. R., Brown, D. R., Brown, J. L., & Houghton, P. E. (2010). Exposure to low amounts of ultrasound energy does not improve soft tissue shoulder pathology: a systematic review. *Phys Ther*, 90(1), 14-25.
- Alfredson, H., Forsgren, S., Thorsen, K., & Lorentzon, R. (2001). In vivo microdialysis and immunohistochemical analyses of tendon tissue demonstrated high amounts of free glutamate and glutamate NMDAR1 receptors, but no signs of inflammation, in Jumper's knee. *J Orthop Res*, 19(5), 881-886.
- Alfredson, H., Ljung, B. O., Thorsen, K., & Lorentzon, R. (2000). In vivo investigation of ECRB tendons with microdialysis technique--no signs of inflammation but high amounts of glutamate in tennis elbow. *Acta Orthop Scand*, 71(5), 475-479.
- Alzghoul, M. B., Gerrard, D., Watkins, B. A., & Hannon, K. (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), 221-223.
- Ameye, L., & Young, M. F. (2002). Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology*, 12(9), 107R-116R.
- Andres, B. M., & Murrell, G. A. (2008). Treatment of tendinopathy: what works, what does not, and what is on the horizon. *Clin Orthop Relat Res*, 466(7), 1539-1554.
- Archambault, J. M., Hart, D. A., & Herzog, W. (2001). Response of rabbit Achilles tendon to chronic repetitive loading. *Connect Tissue Res*, 42(1), 13-23.
- Arndt, A. N., Komi, P. V., Bruggemann, G. P., & Lukkariniemi, J. (1998). Individual muscle contributions to the in vivo achilles tendon force. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 13(7), 532-541.
- Aslan, H., Kimelman-Bleich, N., Pelled, G., & Gazit, D. (2008). Molecular targets for tendon neoformation. *J Clin Invest*, 118(2), 439-444.
- Aspenberg, P., & Virchenko, O. (2004). Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand*, 75(1), 93-99.
- Banes, A. J., Tsuzaki, M., Hu, P., Brigman, B., Brown, T., Almekinders, L., et al. (1995). PDGF-BB, IGF-I and mechanical load stimulate DNA synthesis in avian tendon fibroblasts in vitro. *J Biomech*, 28(12), 1505-1513.
- Banes, A. J., Weinhold, P., Yang, X., Tsuzaki, M., Bynum, D., Bottlang, M., et al. (1999). Gap junctions regulate responses of tendon cells ex vivo to mechanical loading. *Clin Orthop Relat Res*(367 Suppl), S356-370.
- Beighton, P., De Paepe, A., Steinmann, B., Tsipouras, P., & Wenstrup, R. J. (1998). Ehlers-Danlos syndromes: revised nosology, Villefranche, 1997. Ehlers-Danlos National Foundation (USA) and Ehlers-Danlos Support Group (UK). *Am J Med Genet*, 77(1), 31-37.
- Beredjikian, P. K. (2003). Biologic aspects of flexor tendon laceration and repair. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A(3), 539-550.
- Bidanset, D. J., Guidry, C., Rosenberg, L. C., Choi, H. U., Timpl, R., & Hook, M. (1992). Binding of the proteoglycan decorin to collagen type VI. *J Biol Chem*, 267(8), 5250-5256.
- Bolt, P., Clerk, A. N., Luu, H. H., Kang, Q., Kummer, J. L., Deng, Z. L., et al. (2007). BMP-14 gene therapy increases tendon tensile strength in a rat model of Achilles tendon injury. *J Bone Joint Surg Am*, 89(6), 1315-1320.

- Boot-Handford, R. P., Tuckwell, D. S., Plumb, D. A., Rock, C. F., & Poulosom, R. (2003). A novel and highly conserved collagen (pro alpha 1(XXVII)) with a unique expression pattern and unusual molecular characteristics establishes a new clade within the vertebrate fibrillar collagen family. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31067-31077.
- Brandau, O., Meindl, A., Fassler, R., & Aszodi, A. (2001). A novel gene, tendin, is strongly expressed in tendons and ligaments and shows high homology with chondromodulin-I. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 221(1), 72-80.
- Brent, A. E., Schweitzer, R., & Tabin, C. J. (2003). A somitic compartment of tendon progenitors. *Cell*, 113(2), 235-248.
- Brown, D., Wagner, D., Li, X., Richardson, J. A., & Olson, E. N. (1999). Dual role of the basic helix-loop-helix transcription factor scleraxis in mesoderm formation and chondrogenesis during mouse embryogenesis. *Development*, 126(19), 4317-4329.
- Bruzzone, R., White, T. W., & Paul, D. L. (1996). Connections with connexins: the molecular basis of direct intercellular signaling. *Eur J Biochem*, 238(1), 1-27.
- Campbell, B. H., Agarwal, C., & Wang, J. H. (2004). TGF-beta1, TGF-beta3, and PGE(2) regulate contraction of human patellar tendon fibroblasts. *Biomech Model Mechanobiol*, 2(4), 239-245.
- Carlberg, A. L., Tuan, R. S., & Hall, D. J. (2000). Regulation of scleraxis function by interaction with the bHLH protein E47. *Mol Cell Biol Res Commun*, 3(2), 82-86.
- Carr, A. J., & Norris, S. H. (1989). The blood supply of the calcaneal tendon. *J Bone Joint Surg Br*, 71(1), 100-101.
- Chakravarti, S. (2002). Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J*, 19(4-5), 287-293.
- Chan, B. P., Fu, S., Qin, L., Lee, K., Rolf, C. G., & Chan, K. (2000). Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF) on early stages of tendon healing: a rat patellar tendon model. *Acta Orthop Scand*, 71(5), 513-518.
- Chong, A. K., Ang, A. D., Goh, J. C., Hui, J. H., Lim, A. Y., Lee, E. H., et al. (2007). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. *J Bone Joint Surg Am*, 89(1), 74-81.
- Cooper, T. K., Zhong, Q., Krawczyk, M., Tae, H. J., Muller, G. A., Schubert, R., et al. (2010). The haploinsufficient Col3a1 mouse as a model for vascular Ehlers-Danlos syndrome. *Vet Pathol*, 47(6), 1028-1039.
- Corsi, A., Xu, T., Chen, X. D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., et al. (2002). Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res*, 17(7), 1180-1189.
- Crevier-Denoix, N., Collobert, C., Sanaa, M., Bernard, N., Joly, C., Pourcelot, P., et al. (1998). Mechanical correlations derived from segmental histologic study of the equine superficial digital flexor tendon, from foal to adult. *Am J Vet Res*, 59(8), 969-977.
- Cribb, A. M., & Scott, J. E. (1995). TENDON RESPONSE TO TENSILE-STRESS - AN ULTRASTRUCTURAL INVESTIGATION OF COLLAGEN - PROTEOGLYCAN INTERACTIONS IN STRESSED TENDON. *Journal of Anatomy*, 187, 423-428.
- Cserjesi, P., Brown, D., Ligon, K. L., Lyons, G. E., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., et al. (1995). Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. *Development*, 121(4), 1099-1110.
- Cui, Q., Wang, Z., Jiang, D., Qu, L., Guo, J., & Li, Z. (2010). HGF inhibits TGF-beta1-induced myofibroblast differentiation and ECM deposition via MMP-2 in Achilles tendon in rat. *European journal of applied physiology*.
- Dahlgren, L. A., van der Meulen, M. C., Bertram, J. E., Starrak, G. S., & Nixon, A. J. (2002). Insulin-like growth factor-I improves cellular and molecular aspects of healing in a collagenase-induced model of flexor tendinitis. *J Orthop Res*, 20(5), 910-919.

- Danielson, K. G., Baribault, H., Holmes, D. F., Graham, H., Kadler, K. E., & Iozzo, R. V. (1997). Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol*, 136(3), 729-743.
- Derwin, K. A., Soslowsky, L. J., Kimura, J. H., & Plaas, A. H. (2001). Proteoglycans and glycosaminoglycan fine structure in the mouse tail tendon fascicle. *J Orthop Res*, 19(2), 269-277.
- Douglas, T., Heinemann, S., Bierbaum, S., Scharnweber, D., & Worch, H. (2006). Fibrillogenesis of collagen types I, II, and III with small leucine-rich proteoglycans decorin and biglycan. *Biomacromolecules*, 7(8), 2388-2393.
- Duance, V. C., Restall, D. J., Beard, H., Bourne, F. J., & Bailey, A. J. (1977). The location of three collagen types in skeletal muscle. *FEBS Lett*, 79(2), 248-252.
- Eloy-Trinquet, S., Wang, H., Edom-Vovard, F., & Duprez, D. (2009). Fgf signaling components are associated with muscles and tendons during limb development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 238(5), 1195-1206.
- Evans, J. H., & Barbenel, J. C. (1975). Structural and mechanical properties of tendon related to function. *Equine Vet J*, 7(1), 1-8.
- Evans, W. H., & Martin, P. E. (2002). Gap junctions: structure and function (Review). *Molecular membrane biology*, 19(2), 121-136.
- Ezura, Y., Chakravarti, S., Oldberg, A., Chervoneva, I., & Birk, D. E. (2000). Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol*, 151(4), 779-788.
- Fan, L., Sarkar, K., Franks, D. J., & Uthoff, H. K. (1997). Estimation of total collagen and types I and III collagen in canine rotator cuff tendons. *Calcif Tissue Int*, 61(3), 223-229.
- Folkhard, W., Mosler, E., Geercken, W., Knorzer, E., Nemetschekgansler, H., Nemetschek, T., et al. (1987). QUANTITATIVE-ANALYSIS OF THE MOLECULAR SLIDING MECHANISM IN NATIVE TENDON COLLAGEN - TIME-RESOLVED DYNAMIC STUDIES USING SYNCHROTRON RADIATION. *International Journal of Biological Macromolecules*, 9(3), 169-175.
- Forge, A., Becker, D., Casalotti, S., Edwards, J., Evans, W. H., Lench, N., et al. (1999). Gap junctions and connexin expression in the inner ear. *Novartis Foundation symposium*, 219, 134-150; discussion 151-136.
- Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H., & Bernstorff, S. (1998). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J Struct Biol*, 122(1-2), 119-122.
- Freeman, J. W., & Silver, F. H. (2004). Elastic energy storage in unmineralized and mineralized extracellular matrices (ECMs): A comparison between molecular modeling and experimental measurements. *Journal of Theoretical Biology*, 229(3), 371-381.
- Fu, S. C., Hung, L. K., Shum, W. T., Lee, Y. W., Chan, L. S., Ho, G., et al. (2010). In vivo low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) following tendon injury promotes repair during granulation but suppresses decorin and biglycan expression during remodeling. *J Orthop Sports Phys Ther*, 40(7), 422-429.
- Gelse, K., Poschl, E., & Aigner, T. (2003). Collagens--structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(12), 1531-1546.
- Glazebrook, M. A., Wright, J. R., Jr., Langman, M., Stanish, W. D., & Lee, J. M. (2008). Histological analysis of achilles tendons in an overuse rat model. *J Orthop Res*, 26(6), 840-846.
- Goldberg, G. S., Lampe, P. D., & Nicholson, B. J. (1999). Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins. *Nature cell biology*, 1(7), 457-459.
- Gomis-Ruth, F. X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., et al. (1997). Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*, 389(6646), 77-81.
- Goodenough, D. A., & Paul, D. L. (2003). Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(4), 285-294.

- Gulotta, L. V., Kovacevic, D., Ehteshami, J. R., Dagher, E., Packer, J. D., & Rodeo, S. A. (2009). Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rotator cuff repair model. *Am J Sports Med*, 37(11), 2126-2133.
- Gulotta, L. V., Kovacevic, D., Packer, J. D., Deng, X. H., & Rodeo, S. A. (2011a). Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Transduced With Scleraxis Improve Rotator Cuff Healing in a Rat Model. *Am J Sports Med*.
- Gulotta, L. V., Kovacevic, D., Packer, J. D., Ehteshami, J. R., & Rodeo, S. A. (2011b). Adenoviral-mediated gene transfer of human bone morphogenetic protein-13 does not improve rotator cuff healing in a rat model. *Am J Sports Med*, 39(1), 180-187.
- Hankemeier, S., Hurschler, C., Zeichen, J., van Griensven, M., Miller, B., Meller, R., et al. (2009). Bone marrow stromal cells in a liquid fibrin matrix improve the healing process of patellar tendon window defects. *Tissue Eng Part A*, 15(5), 1019-1030.
- Herpin, A., Lelong, C., & Favrel, P. (2004). Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. *Dev Comp Immunol*, 28(5), 461-485.
- Hildebrand, A., Romaris, M., Rasmussen, L. M., Heinegard, D., Twardzik, D. R., Border, W. A., et al. (1994). Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J*, 302 (Pt 2), 527-534.
- Hildebrand, K. A., Frank, C. B., & Hart, D. A. (2004). Gene intervention in ligament and tendon: current status, challenges, future directions. *Gene Ther*, 11(4), 368-378.
- Hildebrand, K. A., Woo, S. L., Smith, D. W., Allen, C. R., Deie, M., Taylor, B. J., et al. (1998). The effects of platelet-derived growth factor-BB on healing of the rabbit medial collateral ligament. An in vivo study. *Am J Sports Med*, 26(4), 549-554.
- Hogan, M., Girish, K., James, R., Balian, G., Hurwitz, S., & Chhabra, A. B. (2011). Growth differentiation factor-5 regulation of extracellular matrix gene expression in murine tendon fibroblasts. *J Tissue Eng Regen Med*, 5(3), 191-200.
- Hou, Y., Mao, Z., Wei, X., Lin, L., Chen, L., Wang, H., et al. (2009). Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol*.
- Hu, Y., Sun, H., Owens, R. T., Wu, J., Chen, Y. Q., Berquin, I. M., et al. (2009). Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia*, 11(10), 1042-1053.
- Huang, T. F., Perry, S. M., & Soslowsky, L. J. (2004). The effect of overuse activity on Achilles tendon in an animal model: a biomechanical study. *Ann Biomed Eng*, 32(3), 336-341.
- Imai, K., Hiramatsu, A., Fukushima, D., Pierschbacher, M. D., & Okada, Y. (1997). Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J*, 322 (Pt 3), 809-814.
- Iozzo, R. V. (1999). The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem*, 274(27), 18843-18846.
- Jepsen, K. J., Wu, F., Peragallo, J. H., Paul, J., Roberts, L., Ezura, Y., et al. (2002). A syndrome of joint laxity and impaired tendon integrity in lumican- and fibromodulin-deficient mice. *J Biol Chem*, 277(38), 35532-35540.
- Jones, F. S., & Jones, P. L. (2000). The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 218(2), 235-259.
- Jozsa, L., Kannus, P., Balint, J. B., & Reffy, A. (1991). Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)*, 142(4), 306-312.
- Kalamajski, S., & Oldberg, A. (2009). Homologous sequence in lumican and fibromodulin leucine-rich repeat 5-7 competes for collagen binding. *J Biol Chem*, 284(1), 534-539.

- Kalamajski, S., & Oldberg, A. (2010). The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 29(4), 248-253.
- Kannus, P. (2000). Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*, 10(6), 312-320.
- Keene, D. R., San Antonio, J. D., Mayne, R., McQuillan, D. J., Sarris, G., Santoro, S. A., et al. (2000). Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem*, 275(29), 21801-21804.
- Ker, R. F. (2002). The implications of the adaptable fatigue quality of tendons for their construction, repair and function. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 133(4), 987-1000.
- Kim, H. M., Galatz, L. M., Das, R., Havlioglu, N., Rothermich, S. Y., & Thomopoulos, S. (2011). The role of transforming growth factor beta isoforms in tendon-to-bone healing. *Connect Tissue Res*.
- Kresse, H., & Schonherr, E. (2001). Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. *J Cell Physiol*, 189(3), 266-274.
- Kuc, I. M., & Scott, P. G. (1997). Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect Tissue Res*, 36(4), 287-296.
- Kuroda, S., Goto, N., Suzuki, M., Kaneda, K., Ohya, K., Shimokawa, H., et al. (2010). Regeneration of bone- and tendon/ligament-like tissues induced by gene transfer of bone morphogenetic protein-12 in a rat bone defect. *Journal of tissue engineering*, 2010, 891049.
- Kvist, M. (1994). Achilles tendon injuries in athletes. *Sports Med*, 18(3), 173-201.
- Lapiere, C. M., Nusgens, B., & Pierard, G. E. (1977). Interaction between collagen type I and type III in conditioning bundles organization. *Connect Tissue Res*, 5(1), 21-29.
- Lazarowski, E. R., Homolya, L., Boucher, R. C., & Harden, T. K. (1997). Direct demonstration of mechanically induced release of cellular UTP and its implication for uridine nucleotide receptor activation. *J Biol Chem*, 272(39), 24348-24354.
- Lee, J. Y., Zhou, Z., Taub, P. J., Ramcharan, M., Li, Y., Akinbiyi, T., et al. (2011). BMP-12 treatment of adult mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo. *PLoS one*, 6(3), e17531.
- Lejard, V., Brideau, G., Blais, F., Salingcarnboriboon, R., Wagner, G., Roehrl, M. H., et al. (2007). Scleraxis and NFATc regulate the expression of the pro-alpha1(I) collagen gene in tendon fibroblasts. *J Biol Chem*, 282(24), 17665-17675.
- Lou, J., Tu, Y., Burns, M., Silva, M. J., & Manske, P. (2001). BMP-12 gene transfer augmentation of lacerated tendon repair. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 19(6), 1199-1202.
- Lu, H., Qin, L., Cheung, W., Lee, K., Wong, W., & Leung, K. (2008). Low-intensity pulsed ultrasound accelerated bone-tendon junction healing through regulation of vascular endothelial growth factor expression and cartilage formation. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(8), 1248-1260.
- Lu, M. H., Zheng, Y. P., Huang, Q. H., Lu, H. B., & Qin, L. (2009). Low intensity pulsed ultrasound increases the mechanical properties of the healing tissues at bone-tendon junction. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 2009, 2141-2144.
- Maffulli, N., Khan, K. M., & Puddu, G. (1998). Overuse tendon conditions: time to change a confusing terminology. *Arthroscopy*, 14(8), 840-843.
- Majewski, M., Ochsner, P. E., Liu, F., Fluckiger, R., & Evans, C. H. (2009). Accelerated healing of the rat Achilles tendon in response to autologous conditioned serum. *Am J Sports Med*, 37(11), 2117-2125.
- Manning, C. N., Kim, H. M., Sakiyama-Elbert, S., Galatz, L. M., Havlioglu, N., & Thomopoulos, S. (2011). Sustained delivery of transforming growth factor beta three enhances tendon-to-bone healing in a rat model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*.
- Massague, J., & Wotton, D. (2000). Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J*, 19(8), 1745-1754.

- Matsushima, N., Ohyanagi, T., Tanaka, T., & Kretsinger, R. H. (2000). Super-motifs and evolution of tandem leucine-rich repeats within the small proteoglycans--biglycan, decorin, lumican, fibromodulin, PRELP, keratocan, osteoadherin, epiphykan, and osteoglycin. *Proteins*, 38(2), 210-225.
- McNeilly, C. M., Banes, A. J., Benjamin, M., & Ralphs, J. R. (1996a). Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *Journal of anatomy*, 189 (Pt 3), 593-600.
- McNeilly, C. M., Banes, A. J., Benjamin, M., & Ralphs, J. R. (1996b). Tendon cells in vivo form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J Anat*, 189 (Pt 3), 593-600.
- Mehr, D., Pardubsky, P. D., Martin, J. A., & Buckwalter, J. A. (2000). Tenascin-C in tendon regions subjected to compression. *J Orthop Res*, 18(4), 537-545.
- Melching, L. I., Fisher, W. D., Lee, E. R., Mort, J. S., & Roughley, P. J. (2006). The cleavage of biglycan by aggrecanases. *Osteoarthritis Cartilage*, 14(11), 1147-1154.
- Menetrey, J., Kasemkijwattana, C., Day, C. S., Bosch, P., Fu, F. H., Moreland, M. S., et al. (1999). Direct-, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament. *Tissue Eng*, 5(5), 435-442.
- Messner, K., Wei, Y., Andersson, B., Gillquist, J., & Rasanen, T. (1999). Rat model of Achilles tendon disorder. A pilot study. *Cells Tissues Organs*, 165(1), 30-39.
- Misof, K., Rapp, G., & Fratzl, P. (1997). A new molecular model for collagen elasticity based on synchrotron X-ray scattering evidence. *Biophys J*, 72(3), 1376-1381.
- Molloy, T., Wang, Y., & Murrell, G. (2003). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33(5), 381-394.
- Murchison, N. D., Price, B. A., Conner, D. A., Keene, D. R., Olson, E. N., Tabin, C. J., et al. (2007). Regulation of tendon differentiation by scleraxis distinguishes force-transmitting tendons from muscle-anchoring tendons. *Development*, 134(14), 2697-2708.
- Murphy, G., & Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol Aspects Med*, 29(5), 290-308.
- Murphy, P. G., Loitz, B. J., Frank, C. B., & Hart, D. A. (1994). Influence of exogenous growth factors on the synthesis and secretion of collagen types I and III by explants of normal and healing rabbit ligaments. *Biochem Cell Biol*, 72(9-10), 403-409.
- Nagase, H., Visse, R., & Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res*, 69(3), 562-573.
- Naito, M., & Ogata, K. (1983). The blood supply of the tendon with a paratenon. An experimental study using hydrogen washout technique. *Hand*, 15(1), 9-14.
- Nash, M. A., Loercher, A. E., & Freedman, R. S. (1999). In vitro growth inhibition of ovarian cancer cells by decorin: synergism of action between decorin and carboplatin. *Cancer Res*, 59(24), 6192-6196.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry* (4th Revised edition. Revised. ed.). New York: Freeman W. H.
- Ng, G. Y. (2011). Comparing therapeutic ultrasound with microamperage stimulation therapy for improving the strength of Achilles tendon repair. *Connect Tissue Res*.
- Nishimura, R., Hata, K., Ikeda, F., Matsubara, T., Yamashita, K., Ichida, F., et al. (2003). The role of Smads in BMP signaling. *Front Biosci*, 8, s275-284.
- O'Brien, M. (1997). Structure and metabolism of tendons. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*, 7(2), 55-61.
- Oshima, Y., Shukunami, C., Honda, J., Nishida, K., Tashiro, F., Miyazaki, J., et al. (2003). Expression and localization of tenomodulin, a transmembrane type chondromodulin-I-related angiogenesis inhibitor, in mouse eyes. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(5), 1814-1823.

- Ouyang, H. W., Goh, J. C., & Lee, E. H. (2004). Use of bone marrow stromal cells for tendon graft-to-bone healing: histological and immunohistochemical studies in a rabbit model. *Am J Sports Med*, 32(2), 321-327.
- Pierard, G. E., Le, T., Pierard-Franchimont, C., & Lapiere, C. M. (1988). Morphometric study of cauliflower collagen fibrils in Ehlers-Danlos syndrome type I. *Coll Relat Res*, 8(5), 453-457.
- Prockop, D. J., & Fertala, A. (1998). Inhibition of the self-assembly of collagen I into fibrils with synthetic peptides. Demonstration that assembly is driven by specific binding sites on the monomers. *J Biol Chem*, 273(25), 15598-15604.
- Pryce, B. A., Watson, S. S., Murchison, N. D., Staverosky, J. A., Dunker, N., & Schweitzer, R. (2009). Recruitment and maintenance of tendon progenitors by TGFbeta signaling are essential for tendon formation. *Development*, 136(8), 1351-1361.
- Riley, G. (2005a). Chronic tendon pathology: molecular basis and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med*, 7(5), 1-25.
- Riley, G. P. (2005b). Gene expression and matrix turnover in overused and damaged tendons. *Scand J Med Sci Sports*, 15(4), 241-251.
- Riley, G. P., Curry, V., DeGroot, J., van El, B., Verzijl, N., Hazleman, B. L., et al. (2002). Matrix metalloproteinase activities and their relationship with collagen remodelling in tendon pathology. *Matrix Biol*, 21(2), 185-195.
- Riley, G. P., Harrall, R. L., Constant, C. R., Chard, M. D., Cawston, T. E., & Hazleman, B. L. (1994). Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis*, 53(6), 359-366.
- Robinson, S. N., & Talmadge, J. E. (2002). Sustained release of growth factors. *In Vivo*, 16(6), 535-540.
- Sakiyama-Elbert, S. E., Das, R., Gelberman, R. H., Harwood, F., Amiel, D., & Thomopoulos, S. (2008). Controlled-release kinetics and biologic activity of platelet-derived growth factor-BB for use in flexor tendon repair. *J Hand Surg Am*, 33(9), 1548-1557.
- Sampath, T. K., Maliakal, J. C., Hauschka, P. V., Jones, W. K., Sasak, H., Tucker, R. F., et al. (1992). Recombinant human osteogenic protein-1 (hOP-1) induces new bone formation in vivo with a specific activity comparable with natural bovine osteogenic protein and stimulates osteoblast proliferation and differentiation in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 267(28), 20352-20362.
- Santra, M., Eichstetter, I., & Iozzo, R. V. (2000). An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*, 275(45), 35153-35161.
- Sasaki, N., & Odajima, S. (1996). Elongation mechanism of collagen fibrils and force-strain relations of tendon at each level of structural hierarchy. *J Biomech*, 29(9), 1131-1136.
- Sato, K., Yomogida, K., Wada, T., Yoriuzzi, T., Nishimune, Y., Hosokawa, N., et al. (2002). Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem*, 277(40), 37678-37684.
- Schaefer, L., & Schaefer, R. M. (2009). Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res*.
- Schonherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J., & Kresse, H. (1995). Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem*, 270(6), 2776-2783.
- Schulze-Tanzil, G., Mobasher, A., Clegg, P. D., Sendzik, J., John, T., & Shakibaei, M. (2004). Cultivation of human tenocytes in high-density culture. *Histochem Cell Biol*, 122(3), 219-228.
- Schwarze, U., Atkinson, M., Hoffman, G. G., Greenspan, D. S., & Byers, P. H. (2000). Null alleles of the COL5A1 gene of type V collagen are a cause of the classical forms of Ehlers-Danlos syndrome (types I and II). *Am J Hum Genet*, 66(6), 1757-1765.
- Schweitzer, R., Chyung, J. H., Murtaugh, L. C., Brent, A. E., Rosen, V., Olson, E. N., et al. (2001). Analysis of the tendon cell fate using Scleraxis, a specific marker for tendons and ligaments. *Development*, 128(19), 3855-3866.

- Schweitzer, R., Zelzer, E., & Volk, T. (2010). Connecting muscles to tendons: tendons and musculoskeletal development in flies and vertebrates. *Development*, 137(17), 2807-2817.
- Scott, J. E. (1990). Proteoglycan:collagen interactions and subfibrillar structure in collagen fibrils. Implications in the development and ageing of connective tissues. *J Anat*, 169, 23-35.
- Scott, J. E., & Orford, C. R. (1981). Dermatan sulphate-rich proteoglycan associates with rat tail-tendon collagen at the d band in the gap region. *Biochem J*, 197(1), 213-216.
- Scott, J. E., & Parry, D. A. (1992). Control of collagen fibril diameters in tissues. *Int J Biol Macromol*, 14(5), 292-293.
- Segretain, D., & Falk, M. M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et biophysica acta*, 1662(1-2), 3-21.
- Seitz, A. L., McClure, P. W., Finucane, S., Boardman, N. D., 3rd, & Michener, L. A. (2011). Mechanisms of rotator cuff tendinopathy: intrinsic, extrinsic, or both? *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 26(1), 1-12.
- Shah, M., Foreman, D. M., & Ferguson, M. W. (1995). Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring. *Journal of cell science*, 108 (Pt 3), 985-1002.
- Sharma, P., & Maffulli, N. (2006). Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6(2), 181-190.
- Shukunami, C., Oshima, Y., & Hiraki, Y. (2001). Molecular cloning of tenomodulin, a novel chondromodulin-I related gene. *Biochemical and biophysical research communications*, 280(5), 1323-1327.
- Shukunami, C., Takimoto, A., Oro, M., & Hiraki, Y. (2006). Scleraxis positively regulates the expression of tenomodulin, a differentiation marker of tenocytes. *Dev Biol*, 298(1), 234-247.
- Silver, D., Miller, J., Harrison, R., & Prockop, D. J. (1992). Helical model of nucleation and propagation to account for the growth of type I collagen fibrils from symmetrical pointed tips: a special example of self-assembly of rod-like monomers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(20), 9860-9864.
- Silver, F. H., & Birk, D. E. (1984). MOLECULAR-STRUCTURE OF COLLAGEN IN SOLUTION - COMPARISON OF TYPE-I,TYPE-II,TYPE-III AND TYPE-V. *International Journal of Biological Macromolecules*, 6(3), 125-132.
- Silver, F. H., Freeman, J. W., & Seehra, G. P. (2003). Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *J Biomech*, 36(10), 1529-1553.
- Silver, F. H., Langley, K. H., & Trelstad, R. L. (1979). TYPE-I COLLAGEN FIBRILLOGENESIS - INITIATION VIA REVERSIBLE LINEAR AND LATERAL GROWTH STEPS. *Biopolymers*, 18(10), 2523-2535.
- Soslowsky, L. J., Carpenter, J. E., DeBano, C. M., Banerji, I., & Moalli, M. R. (1996). Development and use of an animal model for investigations on rotator cuff disease. *J Shoulder Elbow Surg*, 5(5), 383-392.
- Soslowsky, L. J., Thomopoulos, S., Tun, S., Flanagan, C. L., Keefer, C. C., Mastaw, J., et al. (2000). Neer Award 1999. Overuse activity injures the supraspinatus tendon in an animal model: a histologic and biomechanical study. *J Shoulder Elbow Surg*, 9(2), 79-84.
- Stanley, R. L., Fleck, R. A., Becker, D. L., Goodship, A. E., Ralphs, J. R., & Patterson-Kane, J. C. (2007). Gap junction protein expression and cellularity: comparison of immature and adult equine digital tendons. *Journal of anatomy*, 211(3), 325-334.
- Starborg, T., Lu, Y., Meadows, R. S., Kadler, K. E., & Holmes, D. F. (2008). Electron microscopy in cell-matrix research. *Methods*, 45(1), 53-64.
- Steiner, M. (1982). Biomechanics of tendon healing. *J Biomech*, 15(12), 951-958.
- Strocchi, R., De Pasquale, V., Guizzardi, S., Govoni, P., Facchini, A., Raspanti, M., et al. (1991). Human Achilles tendon: morphological and morphometric variations as a function of age. *Foot & ankle*, 12(2), 100-104.
- Suwalski, A., Dabboue, H., Delalande, A., Bensamoun, S. F., Canon, F., Midoux, P., et al. (2010). Accelerated Achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials*, 31(19), 5237-5245.

- Svensson, L., Heinegard, D., & Oldberg, A. (1995). Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. *J Biol Chem*, 270(35), 20712-20716.
- Svensson, L., Narlid, I., & Oldberg, A. (2000). Fibromodulin and lumican bind to the same region on collagen type I fibrils. *FEBS Lett*, 470(2), 178-182.
- Thieszen, S. L., & Rosenquist, T. H. (1995). Expression of collagens and decorin during aortic arch artery development: implications for matrix pattern formation. *Matrix Biol*, 14(7), 573-582.
- Thomopoulos, S., Das, R., Silva, M. J., Sakiyama-Elbert, S., Harwood, F. L., Zampiak, E., et al. (2009). Enhanced flexor tendon healing through controlled delivery of PDGF-BB. *J Orthop Res*.
- Thomopoulos, S., Harwood, F. L., Silva, M. J., Amiel, D., & Gelberman, R. H. (2005). Effect of several growth factors on canine flexor tendon fibroblast proliferation and collagen synthesis in vitro. *The Journal of hand surgery*, 30(3), 441-447.
- Thomopoulos, S., Zaegel, M., Das, R., Harwood, F. L., Silva, M. J., Amiel, D., et al. (2007). PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. *J Orthop Res*, 25(10), 1358-1368.
- Tsai, W. C., Hsu, C. C., Tang, F. T., Chou, S. W., Chen, Y. J., & Pang, J. H. (2005). Ultrasound stimulation of tendon cell proliferation and upregulation of proliferating cell nuclear antigen. *J Orthop Res*, 23(4), 970-976.
- Tsai, W. C., Pang, J. H., Hsu, C. C., Chu, N. K., Lin, M. S., & Hu, C. F. (2006). Ultrasound stimulation of types I and III collagen expression of tendon cell and upregulation of transforming growth factor beta. *J Orthop Res*, 24(6), 1310-1316.
- Van Ginckel, A., Thijs, Y., Hesar, N. G., Mahieu, N., De Clercq, D., Roosen, P., et al. (2009). Intrinsic gait-related risk factors for Achilles tendinopathy in novice runners: a prospective study. *Gait Posture*, 29(3), 387-391.
- Veit, G., Kobbe, B., Keene, D. R., Paulsson, M., Koch, M., & Wagener, R. (2006). Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *Journal of Biological Chemistry*, 281(6), 3494-3504.
- Vogel, K. G., Paulsson, M., & Heinegard, D. (1984). Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J*, 223(3), 587-597.
- von der Mark, K. (1981). Localization of collagen types in tissues. *Int Rev Connect Tissue Res*, 9, 265-324.
- Waggett, A. D., Benjamin, M., & Ralphs, J. R. (2006). Connexin 32 and 43 gap junctions differentially modulate tenocyte response to cyclic mechanical load. *European journal of cell biology*, 85(11), 1145-1154.
- Wall, M. E., & Banes, A. J. (2005). Early responses to mechanical load in tendon: role for calcium signaling, gap junctions and intercellular communication. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 5(1), 70-84.
- Wang, X. T., Liu, P. Y., & Tang, J. B. (2005). Tendon healing in vitro: modification of tenocytes with exogenous vascular endothelial growth factor gene increases expression of transforming growth factor beta but minimally affects expression of collagen genes. *J Hand Surg Am*, 30(2), 222-229.
- Warden, S. J. (2007). Animal models for the study of tendinopathy. *British journal of sports medicine*, 41(4), 232-240.
- Warden, S. J., Metcalf, B. R., Kiss, Z. S., Cook, J. L., Purdam, C. R., Bennell, K. L., et al. (2008). Low-intensity pulsed ultrasound for chronic patellar tendinopathy: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Rheumatology (Oxford)*, 47(4), 467-471.
- Weber, I. T., Harrison, R. W., & Iozzo, R. V. (1996). Model structure of decorin and implications for collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem*, 271(50), 31767-31770.
- Wei, X., & Messner, K. (1998). Age- and injury-dependent concentrations of transforming growth factor-beta 1 and proteoglycan fragments in rabbit knee joint fluid. *Osteoarthritis Cartilage*, 6(1), 10-18.

- Williamson, A. K., Chen, A. C., & Sah, R. L. (2001). Compressive properties and function-composition relationships of developing bovine articular cartilage. *J Orthop Res*, 19(6), 1113-1121.
- Wolfman, N. M., Hattersley, G., Cox, K., Celeste, A. J., Nelson, R., Yamaji, N., et al. (1997). Ectopic induction of tendon and ligament in rats by growth and differentiation factors 5, 6, and 7, members of the TGF-beta gene family. *J Clin Invest*, 100(2), 321-330.
- Woo, S. L., Smith, D. W., Hildebrand, K. A., Zeminski, J. A., & Johnson, L. A. (1998). Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament. *Med Biol Eng Comput*, 36(3), 359-364.
- Wood, V. T., Pinfildi, C. E., Neves, M. A., Parizoto, N. A., Hochman, B., & Ferreira, L. M. (2010). Collagen changes and realignment induced by low-level laser therapy and low-intensity ultrasound in the calcaneal tendon. *Lasers Surg Med*, 42(6), 559-565.
- Yamaguchi, Y. (2000). Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, 57(2), 276-289.
- Yamaguchi, Y., Mann, D. M., & Ruoslahti, E. (1990). Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346(6281), 281-284.
- Yegutkin, G., Bodin, P., & Burnstock, G. (2000). Effect of shear stress on the release of soluble ecto-enzymes ATPase and 5'-nucleotidase along with endogenous ATP from vascular endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 129(5), 921-926.
- Yoon, J. H., & Halper, J. (2005). Tendon proteoglycans: biochemistry and function. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 5(1), 22-34.
- Zhang, G., Ezura, Y., Chervoneva, I., Robinson, P. S., Beason, D. P., Carine, E. T., et al. (2006). Decorin regulates assembly of collagen fibrils and acquisition of biomechanical properties during tendon development. *J Cell Biochem*, 98(6), 1436-1449.
- Zittermann, S. I., & Issekutz, A. C. (2006). Basic fibroblast growth factor (bFGF, FGF-2) potentiates leukocyte recruitment to inflammation by enhancing endothelial adhesion molecule expression. *Am J Pathol*, 168(3), 835-846.

PARTIE II : LES METHODES DE TRANSFERT DE GENES

Le principe de base de la thérapie génique est la modification génétique de cellules somatiques. Basé sur les connaissances des mécanismes moléculaires de la pathologie, le transfert de gène peut corriger ou remplacer une fonction génique défaillante ou « enseigner » aux cellules des propriétés thérapeutiques. Nous nous focaliserons dans ce chapitre sur les méthodes actuelles de thérapie génique, les différents vecteurs existants et nous terminerons par une revue de la littérature sur la thérapie génique dans les tissus musculo-squelettiques et son application dans la réparation tissulaire.

I) LA THERAPIE GENIQUE

Aujourd'hui, on dénombre plus de 4000 pathologies ayant pour origine une anomalie génétique. En 2011, 1703 essais cliniques utilisant la thérapie génique sont en cours dans le monde. La plupart de ces essais cliniques tentent de traiter le cancer (64,5%), seuls 8,3% des essais cliniques tentent de traiter des maladies monogénétiques (source : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>). Les maladies monogénétiques sont pour la plupart des maladies rares cependant, dans la majorité des cas, seuls des traitements symptomatiques permettent une amélioration du confort de vie des malades. Il n'existe aucun traitement étiologique.

La méthode de thérapie génique a été imaginée il y a presque 40 ans, elle consiste à traiter la base de l'anomalie génétique en utilisant un gène comme médicament. L'idée étant de restaurer la fonctionnalité d'un gène absent ou présent sous une forme mutée directement responsable de la pathologie. La mucoviscidose et les myopathies sont les maladies monogénétiques héréditaires les plus fréquentes (1/3000 naissances pour la mucoviscidose, et 1/4000 pour la myopathie de Duchenne). Cette thérapie présente un avantage par rapport à l'administration des protéines recombinantes. En effet, l'utilisation de protéines recombinantes nécessite des injections de grandes quantités de protéines et ceci de façon répétée, de plus leur production reste à l'heure actuelle très onéreuse. Le gène inséré dans la cellule permet la production en continu de la protéine d'intérêt.

Le but initial de la thérapie génique était de restaurer l'expression d'un gène dans un organisme pour lequel une mutation entraîne une pathologie. Cependant de nombreuses études utilisent également la thérapie génique pour exprimer un gène dont l'expression a un effet bénéfique sur une pathologie. Par exemple le transfert des gènes impliqués dans la synthèse de la dopamine dans les neurones chez des sujets atteints de la maladie de Parkinson (Marks *et al.*, 2010) ou également le transfert de gènes codant pour des facteurs de croissance favorisant la cicatrisation (Suwalski *et al.*, 2010). Dans le cancer, différentes stratégies sont à l'étude comme la compensation de mutation par transfert d'un gène suppresseur de tumeur (p53 ou BRCA1) (Yu *et al.*, 2010), l'utilisation de gènes « suicide » consistant à faire exprimer des gènes cytotoxiques (gène HSV-tk) (Zhou *et al.*, 2010) ou la vaccination anti-tumorale (Perche *et al.*, 2011).

II) LE TRANSFERT DE GENE

Le transfert de gène, par définition, est la technique par laquelle un acide nucléique contenant la séquence du gène à exprimer dans la cellule est amené jusqu'à sa zone cible : le cytosol pour les ARNm et le noyau pour les ADN.

1) LES BARRIERES CELLULAIRES

Au cours du transport d'un acide nucléique (AN), ce dernier rencontre de nombreux obstacles résumés sur la figure 2-1. Les barrières au cours de la délivrance d'acides nucléiques se situent

principalement sur trois niveaux : extracellulaire (condensation et protection des acides nucléiques), intracellulaire (endocytose) et nucléaire (ciblage nucléaire et entrée dans le noyau). Tout d'abord les acides nucléiques doivent résister à l'environnement extracellulaire, différentes stratégies permettent une protection de l'acide nucléique à transférer : les vecteurs viraux encapsulent l'acide nucléique à transférer dans une capsid, tandis que les vecteurs synthétiques protègent les AN soit en les renfermant dans une bicouche lipidique (liposomes), en les condensant (polymères) ou en les véhiculant dans les pores de structures en silice (nanoparticules mésoporeuses). La membrane plasmique constitue la première barrière physique à l'entrée d'un AN dans une cellule. Cette barrière peut être franchie de différentes façons : par infection, par endocytose récepteur dépendante ou indépendante et par diffusion passive. Les virus utilisent le processus d'infection qui leur est propre tandis que les vecteurs synthétiques traversent la membrane plasmique par endocytose. Les méthodes physiques (électroporation, sonoporation) quant à elles induisent une déstabilisation de la membrane plasmique permettant le passage des AN soit directement par des pores membranaires transitoires soit en favorisant l'endocytose. Il est à noter que le mécanisme d'entrée des AN dans la cellule n'est pas complètement élucidé pour le transfert de gène par des méthodes physique. Une fois cette première barrière passée, le transgène doit arriver jusqu'au noyau afin d'y être transcrit et ainsi exprimer la protéine d'intérêt. La principale voie d'entrée des AN dans la cellule est l'endocytose. Les AN doivent ensuite sortir des endosomes pour être libérés dans le cytoplasme et ainsi échapper au lysosome. Plusieurs stratégies déstabilisant les endosomes ont été mises en place pour favoriser l'échappement des AN dans le cytoplasme. Une fois dans le cytoplasme, un ADN nu de plus de 2000pb est incapable de diffuser seul et les plasmides microinjectés ne diffusent pas beaucoup du site d'injection (Lukacs *et al.*, 2000). De plus l'ADN est très vulnérable aux nucléases dans le cytoplasme. La plupart des ADN ne parviennent pas au noyau ce qui contribue à la faible efficacité des vecteurs non viraux (Zabner *et al.*, 1995). Pour Vaughan et Dean, la migration de l'ADN du cytoplasme au noyau est probablement la barrière principale à la transfection. Ils montrent que les ADN transfectés par électroporation et microinjection empruntent le réseau de microtubules pour se diriger au noyau (Vaughan & Dean, 2006). Une stratégie consistant à positionner en amont du promoteur plusieurs séquences de fixation de la protéine NFκB a été mise en place au laboratoire afin d'augmenter l'importation nucléaire des AN à transférer. Cette protéine possède une séquence d'importation nucléaire NLS qui une fois fixée sur sa cible prend en charge le plasmide jusqu'au noyau (Goncalves *et al.*, 2009), le nombre de copies du plasmide retrouvé dans le noyau est ainsi multiplié par 6 favorisant ainsi l'expression du transgène.

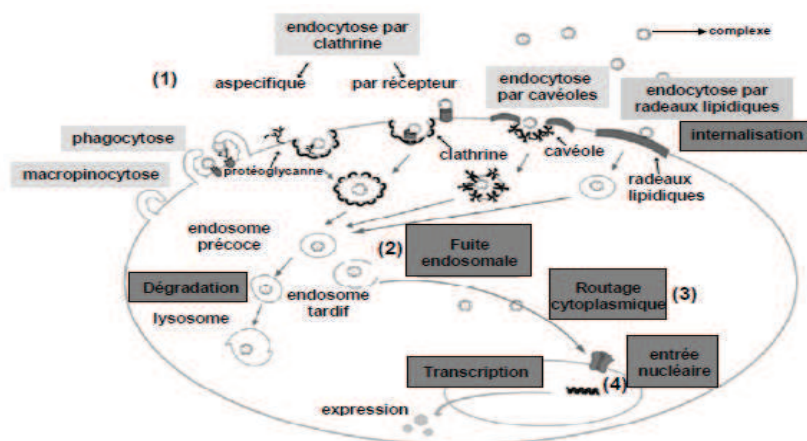


Figure 2-1. Schéma des principales barrières rencontrées pour la délivrance d'un transgène. (1) internalisation cellulaire, (2) fuite endosomale, (3) routage cytoplasmique, (4) entrée nucléaire. Adapté de (Morille *et al.*, 2008).

La seconde barrière physique est l'enveloppe nucléaire. Pour traverser cette barrière, deux stratégies existent : la stratégie la plus répandue consiste à faire passer l'ADN par le pore nucléaire qui est la voie d'entrée classique au noyau. Une autre stratégie consiste à faire passer l'ADN à transférer par la formation d'un pore dans l'enveloppe nucléaire. Le pore nucléaire est une structure complexe permettant un passage sélectif des molécules dans le noyau. Le diamètre du pore nucléaire est de 10nm. Enfin, une fois dans le noyau l'ADN doit être disponible aux ARN transcriptases.

2) L'ENDOCYTOSE

Le terme endocytose désigne le processus par lequel les cellules internalisent des macromolécules dans le milieu environnant. Il existe plusieurs mécanismes d'endocytose. La voie d'endocytose la mieux caractérisée est celle médiée par un récepteur, qui procure à la cellule une entrée de macromolécules spécifiques. Tout d'abord la macromolécule à internaliser se fixe spécifiquement sur son récepteur membranaire. Ces récepteurs sont concentrés dans des régions spécialisées sur la membrane plasmique appelées les puits, recouverts de clathrine (clathrin-coated pits). Après invagination membranaire le matériel à endocyter se retrouve dans des vésicules recouvertes de clathrine. Il existe également d'autres voies d'endocytose indépendante de la clathrine : la voie cavéolée et la macropinocytose. Les vésicules d'endocytose les mieux étudiées sont les vésicules recouvertes de clathrine liée au cargo-récepteur par un complexe hétérodimérique adaptin. La fixation du ligand sur son récepteur induit la phosphorylation de celui-ci conduisant à une modification de sa conformation. Ce signal va induire la formation d'une vésicule d'endocytose. Le processus de formation de la vésicule requiert de l'ATP, ce transport est donc un mécanisme actif.

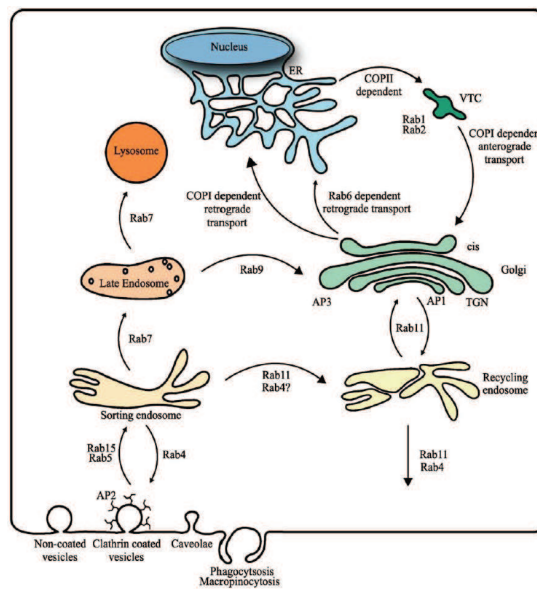


Figure 2-2. Les différentes voies d'endocytose (Watson et al., 2005).

Les molécules présentes dans les vésicules d'endocytose vont subir une baisse rapide de pH (<2min), passant d'un pH de 7,2 à un pH de 6 dans la lumière des vésicules. Une seconde baisse de pH (passage de pH 6 à pH 5) se produit durant la progression d'un endosome tardif au lysosome (Maxfield & McGraw, 2004). Le pH des endosomes et des lysosomes est contrôlé par plusieurs facteurs comme les ATPases vacuolaires, les canaux chlorures et sodium ou les échangeurs sodium-potassium (Grabe & Oster, 2001). Durant la maturation de l'endosome, les vésicules perdent rapidement leur manteau de clathrine et vont fusionner ensemble ou avec des structures préexistantes connues sous le nom d'endosome de triage (Conner & Schmid, 2003). Cet endosome formé est appelé endosome précoce, il prépare le cargo pour son transport. La baisse de pH dans

l'endosome précoce permet la dissociation de nombreux ligands de leurs récepteurs, permettant aux récepteurs d'être recyclés à la membrane plasmique via les endosomes de recyclage. La maturation des vésicules formées à partir des endosomes précoces permet de délivrer les molécules vers les endosomes tardifs. Les endosomes perdent alors leur capacité à fusionner avec d'autres vésicules d'endocytose de la membrane plasmique ou d'endosomes de triage (Aniento *et al.*, 1993).

Il est maintenant établi que le trafic vésiculaire implique les protéines de la famille Rab. Les protéines Rab sont de petites GTPases monomériques, il existe plus de 60 protéines Rab différentes dans le génome humain (Zerial & McBride, 2001). La figure 2-3 montre la distribution des protéines Rab, elles sont distribuées dans des compartiments intracellulaires distincts et régulent les transports entre les organelles (Novick & Zerial, 1997). Elles agissent comme des interrupteurs en oscillant entre la forme Rab-GTP ou Rab-GDP. La forme Rab-GTP est la forme active. Il existe de très nombreux effecteurs aux protéines Rab, chaque Rab possède des effecteurs distincts impliquant que ces molécules sont hautement spécialisées et sont exclusivement adaptées à un organe. Ainsi, la protéine Rab5 est spécifique des endosomes précoces et la protéine Rab7 des endosomes tardifs. Au laboratoire nous possédons des outils cellulaires pour suivre l'endocytose tels que des cellules exprimant de façon stable les protéines de fusion Rab5-GFP ou Rab7-GFP. Ces outils nous permettent ainsi de localiser le transgène dans les vésicules d'endocytose après internalisation.

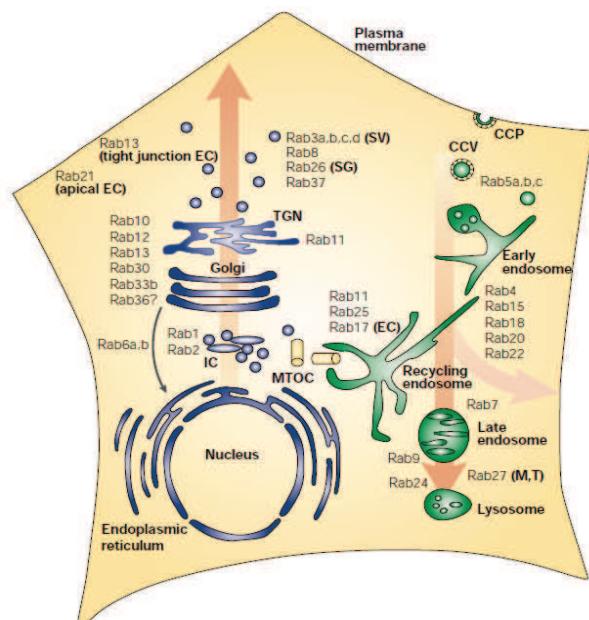


Figure 2-3. Localisation des différentes protéines Rab dans la cellule. Tiré de (Zerial & McBride, 2001).

3) STRATEGIES D'ÉCHAPPEMENT DES ENDOSOMES ET IMPORTATION NUCLEAIRE

La principale voie d'entrée des AN dans la cellule est l'endocytose. Les AN doivent ensuite sortir des endosomes pour être libérés dans le cytoplasme et ainsi échapper au lysosome. Plusieurs stratégies déstabilisant les endosomes ont été mises en place pour favoriser l'échappement des AN dans le cytoplasme. Certains peptides fusogéniques sensibles au pH ont été développés et permettent d'augmenter l'efficacité de transfert de gène (Kakudo *et al.*, 2004; Midoux *et al.*, 2009; Wagner, 1999). Les lipoplexes formulés avec du DOPE ont également des propriétés fusogéniques favorisant l'échappement de l'endosome (Talbot *et al.*, 1997). D'autres stratégies consistent à faire gonfler les endosomes par un effet de pompe à protons en utilisant des polymères cationiques possédant des bases faibles (Demeneix & Behr, 2005).

Le pore nucléaire est la structure régulant le passage des molécules dans le noyau. Afin de traverser ce pore les molécules de plus de 40kDa doivent disposer d'un signal de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Signal). L'entrée nucléaire est un processus inefficace, il a été estimé que seul 0,1% de l'ADN après microinjection dans le cytosol était transcrit. L'importation nucléaire est donc un processus limitant pour l'efficacité de transfection. Une stratégie d'importation nucléaire est d'inclure dans le plasmide une séquence de reconnaissance à facteur possédant une séquence de localisation nucléaire comme NFκB.

III) LES DIFFERENTES METHODES DE TRANSFERT DE GENES

De nombreuses méthodes de transfert sont utilisées dans les protocoles de thérapie génique : les virus, l'utilisation d'ADN nu, la lipofection et la polyfection. La majeure partie des essais cliniques (68%) de transfert de gène utilisent des virus modifiés, arrivent ensuite l'utilisation de plasmides ou d'acides nucléiques nus (18,7%), la lipofection (6,8%) (figure 2-4). Nous verrons dans cette partie quatre types de méthodes de transfert de gène: l'injection d'acide nucléique nu, les méthodes virales, les méthodes chimiques et les méthodes physiques.

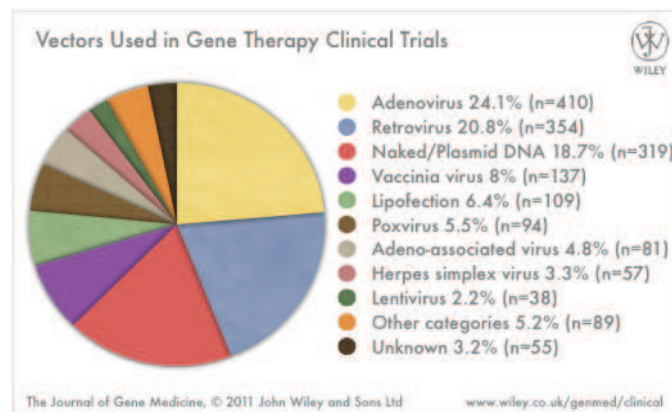


Figure 2-4. Répartition par type de vecteurs des essais cliniques de thérapie génique (source : <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>).

1) INJECTION D'ACIDES NUCLEIQUES NUS

Sans aucun système de délivrance, l'injection d'un acide nucléique nu localement dans les tissus à traiter ou de façon systémique est assurément la méthode la plus simple et la plus sécurisée. L'injection de la séquence d'intérêt étant inefficace, l'information génétique à transférer est donc vectorisée dans un plasmide. Le plasmide est une structure d'ADN circulaire bactérien ayant la capacité de se répliquer de façon indépendante de l'ADN chromosomique. Cependant, l'efficacité de transfert de gène par injection d'acides nucléiques nus est extrêmement faible en comparaison avec les acides nucléiques vectorisés par des méthodes virales, chimiques ou physiques. De fait, la richesse du milieu extracellulaire en nucléases et la présence de phagocytes entraînent la dégradation de l'ADN injecté. La plupart des études de thérapie génique utilisant des acides nucléiques nus sont effectuées par injection intramusculaire qui est particulièrement efficace chez la souris (Moreno-Igoa *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2005). Sept jours après injection d'ADN plasmidique nu dans le muscle, seules 20% de fibres musculaires expriment le transgène (Wang *et al.*, 2005). Une étude de transfert de gène réalisée sur le tendon d'Achille montre que la zone d'expression du transgène est très localisée et diminue fortement 2 jours après l'injection, jusqu'à devenir indétectable au bout de 42 jours (Jayankura *et al.*, 2003).

Des essais cliniques ont montré la possibilité d'utiliser des acides nucléiques nus pour la thérapie génique dans le muscle. Parmi eux, deux essais cliniques sont en cours pour transférer le facteur de croissance humaine hépatocyte growth factor (HGF) dans les tissus ischémiques en utilisant un ADN

plasmidique (pHGF) injecté en intramusculaire dans le but d'améliorer la perfusion tissulaire (Morishita *et al.*, 2011; Powell *et al.*, 2010). Les résultats de ces études sont encourageants puisque 12 mois après traitement 31% des patients traités ont vu une guérison de l'ulcération (contre aucun dans le groupe placebo). Cependant cette méthode nécessite des injections répétées de grandes quantités d'ADN plasmidique (deux injections locales de 2 à 4 mg de plasmide).

Le manque d'efficacité de l'injection d'ADN ne peut être pallié en utilisant des vecteurs. Il existe 3 catégories de vecteurs : les vecteurs viraux – basés sur l'utilisation de virus modifiés, les vecteurs chimiques – basés sur l'utilisation de liposomes, de polymères ou de nanoparticules (silice, or ou fer) et les méthodes physiques – basées sur l'utilisation de champs électriques, acoustiques, magnétiques ou photoniques.

2) LES VECTEURS VIRAUX

Plusieurs millions d'années d'évolution ont conduit les virus à devenir des vecteurs naturels pour le transfert de gène. Les virus ont la capacité de transférer à la cellule cible l'acide nucléique qu'ils contiennent par le processus d'infection, ils sont donc des outils de choix pour la thérapie génique. En 50 ans, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension de la biologie moléculaire des virus (principalement les adénovirus), ces études ont également procuré des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes de réplication de l'ADN, l'épissage des ARN, la transformation oncogénétique et l'apoptose (Berk, 2005; Howley & Livingston, 2009). La majorité des virus sont pathogènes pour l'homme. Leur effet cytopathogène peut aboutir à l'inactivation d'une fonction cellulaire ou à leur destruction. De plus, certains virus comme ceux de la famille Herpès persistent à l'état latent dans l'organisme et peuvent se réactiver plusieurs années après la primo-infection ou encore s'intégrer au génome de l'hôte tel que les virus de type rétrovirus (le VIH par exemple). Certains virus ont également un rôle oncogène (Papilloma virus et cancer du col utérin). Les virus sauvages ne peuvent donc être utilisés en thérapie génique sans modifications par génie génétique de leur effet cytopathogène. Des méthodes de biotechnologie ont permis de remplacer les séquences d'ADN ou d'ARN pathogènes par le gène thérapeutique. Le virus conserve l'expression des protéines de son enveloppe, de sa capside et des protéines fusogènes qui lui confère son pouvoir d'infection cellulaire, sans effet cytopathogène. Ces virus transformés permettent donc de transférer un acide nucléique thérapeutique sans engendrer d'effets délétères pour la cellule. De nombreuses études réalisées *in vitro* et *in vivo* ont démontré l'efficacité du transfert de gène à l'aide de virus. Différents types de vecteurs viraux sont utilisés, le choix du vecteur dépend du tissu et/ou de la cellule cible. On classe les vecteurs viraux en deux catégories selon leur mode d'intégration à la cellule: les virus qui intègrent leur génome à l'ADN de la cellule infectée (rétrovirus et virus adénoassociés) et ceux qui ne l'intègrent pas (adénovirus et virus du groupe herpès).

Les résultats remarquables en thérapie génique ont pour l'instant été obtenus en transfection *ex vivo* avec des rétrovirus et en injectant les cellules modifiées génétiquement. L'essai clinique mené en 2000 par le professeur Alain Fischer destiné à traiter le syndrome d'immunodéficience sévère lié au chromosome X (DICS-X1) a été le premier essai clinique de thérapie génique sur l'homme en France (Cavazzana-Calvo *et al.*, 2000; Fischer *et al.*, 2000). Les cellules souches hématopoïétiques (CSH-CD34+) du malade ont été infectées *ex vivo* par le rétrovirus de Moloney puis injectées au patient. Plus de 10 ans après cet essai clinique, 20 patients ont été inclus, cependant 5 patients ont développé une leucémie aiguë lymphoblastique. Cette pathologie a été induite par l'insertion du gène thérapeutique en amont d'un oncogène. Malgré la toxicité de ce protocole thérapeutique l'essai clinique de d'Alain Fischer a montré la preuve de principe de la thérapie génique. Depuis, plusieurs maladies telles que le déficit en adénosine déaminase et l'adrénoleucodystrophie liée à l'X ont été traitées avec succès (Cartier *et al.*, 2009).

Les virus ont démontré la faisabilité de la thérapie génique et restent les vecteurs les plus efficaces pour introduire des gènes dans une cellule. Cependant les vecteurs viraux ont montré leurs limites, des événements tels que des réponses immunes sévères ainsi que des insertions induisant une mutagenèse sont apparus lors des essais cliniques précédents (Thomas *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2006). De plus, la taille limitée de l'insert à transférer, la faible capacité de ciblage cellulaire et les problématiques liées à la production des particules virales ont poussé les recherches vers des méthodes non virales telles que l'utilisation de vecteurs synthétiques et des méthodes physiques.

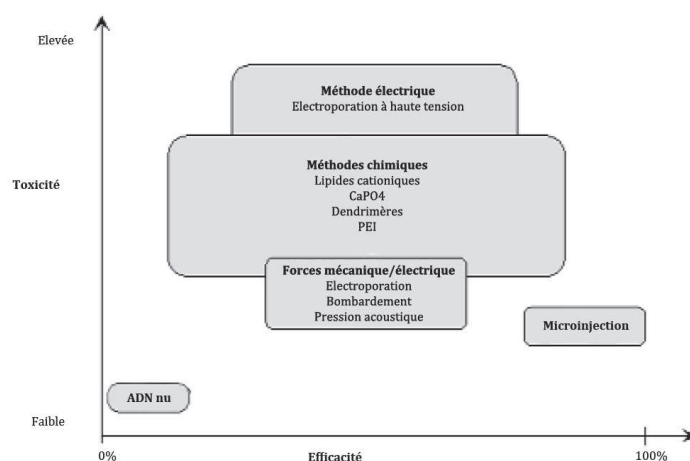


Figure 2-5. Comparaison de l'efficacité et de la toxicité des méthodes de transfert de gène non virales. Adapté de (Luo & Saltzman, 2000).

2) LES VECTEURS SYNTHETIQUES

Parmi les vecteurs synthétiques, les liposomes et les polymères sont les vecteurs synthétiques les plus étudiés, plus récemment l'utilisation de nanoparticules de silice est apparue. Les méthodes chimiques utilisent des molécules de synthèse pour complexer les plasmides. La formation de ces complexes repose sur des interactions électrostatiques entre les acides nucléiques chargés négativement et des composés chimiques chargés positivement. Parmi les 60 agents de transfection synthétiques disponibles dans le commerce, plus de la moitié sont basés sur l'utilisation de réactifs lipidiques cationiques (Tros de Ilarduya *et al.*, 2010).

1. LES LIPOSOMES

Les liposomes sont des vésicules lipidiques composés de lipides cationiques. Les premières expériences de transfert de gène utilisant des liposomes ont été réalisées en 1989 et le premier essai clinique chez l'homme en 1993 (Brigham *et al.*, 1989; Nabel *et al.*, 1993). Il existe de nombreux types de lipides cationiques développés pour le transfert de gène (figure 2-7). Ces lipides cationiques sont rares chez les êtres vivants et seule la sphingosine est présente dans les cellules en de faibles quantités, d'où leur toxicité élevée (Kuvichkin *et al.*, 2009). Ils sont composés de 3 domaines : une chaîne hydrophobe, un groupement espaceur et d'une tête polaire hydrophile chargée. Ces trois domaines sont reliés la plupart du temps par un squelette glycérol comme c'est le cas pour les principaux lipides cationiques utilisés en transfection (figure 2-6).

Différentes structures de liposomes peuvent être retrouvées en fonction de leur taille (Jesorka & Orwar, 2008). On retrouve ainsi les liposomes unilamellaires de taille petite (de 20 à 200nm),

moyenne (200nm à 1µm) et géante (>1µm). Dans un milieu aqueux, les lipides cationiques vont s'organiser de façon à ce que la partie hydrophile se trouve en surface tandis que les parties hydrophobes vont s'assembler entre elles en bicouches lipidiques pour former une structure de liposome. Les groupements chargés situés en surface du liposome induisent des liaisons électrostatiques avec les acides nucléiques, s'ensuivent des modifications morphologiques, le plus souvent entraînant la formation de lipoplexes (Felgner & Ringold, 1989).

Les lipoplexes sont internalisés dans la cellule par endocytose. Il est difficile d'associer une voie d'endocytose spécifique pour les lipoplexes car la voie d'endocytose varie en fonction du type cellulaire, de la composition moléculaire de la surface membranaire (Douglas *et al.*, 2008; Rejman *et al.*, 2005; Rejman *et al.*, 2006; van der Aa *et al.*, 2007).

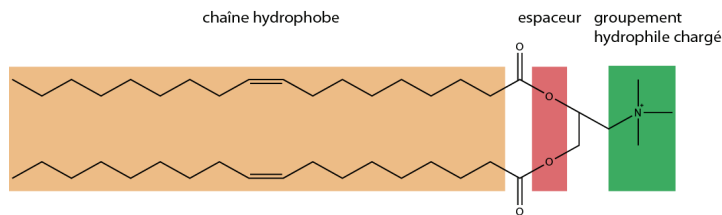


Figure 2-6. Représentation schématique des trois groupements du DOTAP, adapté de (Lv *et al.*, 2006).

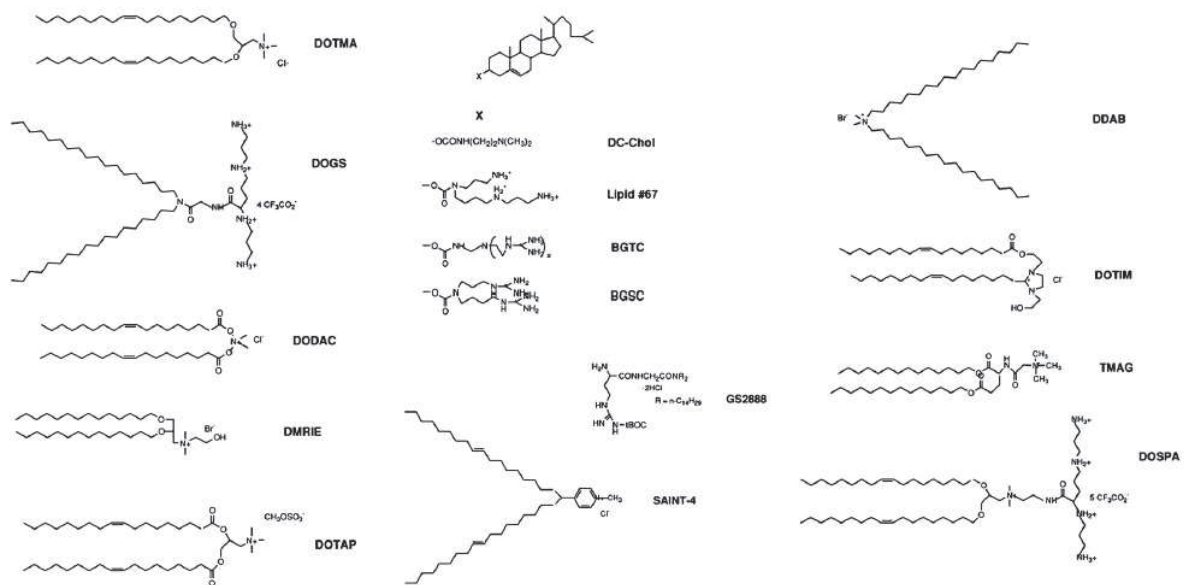


Figure 2-7. Lipides cationiques les plus utilisés en transfection (Tros de Ilarduya *et al.*, 2010).

2. LES POLYMERES

Les polymères cationiques les plus utilisés pour le transfert de gène sont la poly-L-lysine, la poly-L-ornithine, la polyéthylénimine (PEI), le chitosan et les dendrimères. La poly-L-lysine est le premier polymère à avoir été utilisé pour la transfection de cellules (Wu & Wu, 1987). La PEI est l'un des polymères les plus utilisés à l'heure actuelle. Les interactions électrostatiques entre le vecteur et l'ADN permettent sa condensation en particules de 100nm et la protection de l'acide nucléique à transférer. Un acide nucléique condensé par un polymère est appelé polyplexe. Le PEI sous sa forme linéaire est efficace *in vitro* et *in vivo* (Brissault *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2000) cependant le polymère présente une forte toxicité notamment à cause du PEI libre restant après formation de complexes

avec l'ADN (Clamme *et al.*, 2003). Des effets létaux ont été observés chez des souris ayant reçu des polyplexes PEI en injection intraveineuse (Zhang *et al.*, 2004).

La libération des complexes présents dans les vésicules d'endocytose, est une étape essentielle pour permettre une expression du transgène. Le PEI possède des amines secondaires protonables en milieu acide qui sont capables de capter les protons dans les endosomes ce qui permet de déstabiliser les membranes des endosomes par un effet tampon (Ogris *et al.*, 2001). La forte augmentation de la concentration ionique dans les endosomes entraîne par osmose une entrée importante d'eau qui entraîne un gonflement de celui-ci, ce qui a pour effet de favoriser leur rupture (Bieber *et al.*, 2002; Sonawane *et al.*, 2003). Cet effet de pompe à proton peut être également obtenu en utilisant l'histidine. En effet, l'histidine possède un noyau imidazole qui est une base faible protonable à pH < 6. L'utilisation de polymères cationiques histidylés permet donc de condenser l'ADN mais également de favoriser la libération des polyplexes des endosomes. La polylysine histidylée a été le premier d'une longue série de vecteurs histidylés ou contenant des groupements imidazole. La substitution de résidus histidine sur la polylysine a permis d'augmenter de 3 à 4,5 log l'efficacité de transfection de la polylysine *in vitro* (Midoux & Monsigny, 1999). L'efficacité de transfection a été fortement réduite lorsque les cellules étaient incubées en présence de la bafilomycine A1, un inhibiteur spécifique de l'ATPase responsable de l'accumulation des protons dans l'endosome. L'échappement des endosomes des polyplexes composés de vecteurs histidylés n'est pas encore connu, il est supposé qu'ils agissent comme la chloroquine ou la PEI par un effet d'éponge à proton. Cependant, un phénomène de fusion membranaire peut aussi être mis en jeu. En effet, ce phénomène a été observé en milieu acide avec la poly-L-histidine (Wang & Huang, 1984).

3. LES NANOPARTICULES ET NANOMATERIAUX

L'avantage majeur des nanomatériaux par rapport aux particules biodégradables faites de liposomes ou de polymères est la possibilité de contrôler de manière précise leur taille et leur forme en plus de la versatilité de fonctionnalisation de leur surface. En outre, les nanomatériaux inorganiques possèdent un large éventail de fonctionnalités qui découlent de leurs propriétés optiques, électriques et physiques dont certaines peuvent être exploitées en imagerie et d'autres peuvent améliorer le passage de certaines barrières cellulaires.

Ci-dessous sont décrits brièvement 3 types de nanoparticules les plus utilisés en transfert de gène.

NANOPARTICULES MAGNÉTIQUES

Les nanoparticules magnétiques (NM) ont des propriétés physiques qui leur permettent d'être manipulés sous l'influence d'un champ magnétique. Ces NM sont généralement composées d'éléments magnétiques tels que le fer, le nickel, le cobalt sous forme d'oxydes.

Une fois administrées par voie systémique, ces NM peuvent être concentrées au site d'intérêt grâce à une application externe d'un champ magnétique (Duguet *et al.*, 2006; Pankhurst *et al.*, 2003). Cette propriété a été exploitée pour l'imagerie par résonance magnétique (IRM) en les utilisant comme des agents de contraste, pour le ciblage des médicaments ou de gènes et pour l'ingénierie tissulaire et cellulaire en les exploitant dans les protocoles de bioséparation (Gupta *et al.*, 2007; McCarthy *et al.*, 2007). Cette double capacité : transport de médicaments et réactivité à un champ magnétique rend les NM comme outil de choix pour la théranostique – exploitation double à la fois pour le diagnostic et la thérapie- une des bases de la médecine personnalisée (Ozdemir *et al.*, 2006).

Ces NM ont été également exploités comme agent de transfection. Ceci est possible grâce à une fonctionnalisation de leur surface avec des groupements ou des molécules capables d'interagir avec de l'ADN. La magnétofection désigne la méthode de transfection basée sur l'utilisation des MN comme vecteurs d'ADN et du champ magnétique comme moyens physique de ciblage (Gupta & Gupta, 2005). Plusieurs études ont démontré que la fonctionnalisation des NM avec de la PEI

améliore significativement l'efficacité de la PEI aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Mykhaylyk *et al.*, 2007; Scherer *et al.*, 2002).

NANOTUBES DE CARBONE

L'intérêt qu'à susciter l'utilisation des nanotubes de carbone (NTC) en tant que système de délivrance réside dans le fait qu'ils possèdent une forme et une taille qui facilitent leur translocation à travers les membranes cellulaires (Bianco *et al.*, 2005; Pantarotto *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2003). Les nanotubes de carbone existent sous 2 formes : mono-feuillet (SWNT, single walled carbon nanotube) et multi-feuillet (MWNT, multi walled carbon nanotube).

Les études rapportées par Singh *et al.* ont révélé que les NTC fonctionnalisés (f-NTC) sont plus solubles ce qui leur permet d'être rapidement éliminés dans la circulation sanguine et par la voie d'excrétion rénale (Singh *et al.*, 2006). Bianco *et al.*, ont signalé que des f-NTC fonctionnalisés par des groupements amines peuvent être utilisés pour la vaccination contre l'infection virale en greffant des antigènes peptidiques et pour transférer des ADN plasmidiques (Bianco *et al.*, 2005). Aucune réponse immunitaire contre les NTC n'a été détectée lors de cette étude. L'efficacité du transfert de gène obtenu est dix fois supérieure à celui de l'ADN seul, ce qui reste très modeste. Concernant le mécanisme de pénétration de la membrane cellulaire, les auteurs ont proposé un mécanisme spontané du lequel les MWNT se comportent comme des nano-aiguilles capables de passer au travers la membrane cellulaire sans provoquer la mort cellulaire (Cai *et al.*, 2005). Les SWNTs ont une forte absorption optique dans le proche infrarouge, cette propriété peut être utilisée pour déclencher le relargage de drogues ou de gènes (Kam *et al.*, 2005).

NANOPARTICULES DE SILICE MESOPOREUSES

Les groupes de Unger, Stucky, et Zhao ont été les premiers à avoir produit des sphères de silice mésoporeuses de taille micrométrique (Slowing *et al.*, 2008). Ces synthèses ont permis d'obtenir des particules avec une taille monodisperse. D'autres équipes ont par la suite mis au point la production de nanosphères de silice avec une structure poreuse ordonnée. MCM-41 est une silice mésoporeuse qui a la capacité d'encapsuler une grande quantité de molécules bioactives (Botterhuis *et al.*, 2006; Vallet-Regi *et al.*, 2001). Pour notre part, nous avons utilisé ces MCM-41 pour vectoriser des plasmides d'ADN dans le tendon d'Achille de rat. Ces résultats ont fait l'objet d'un article dans lequel je cosigne en deuxième position (voir partie résultats page 125).

4) LES METHODES PHYSIQUES

Parmi les méthodes de transfert de gène, on distingue également les méthodes physiques. Ces méthodes emploient des champs électriques (électroporation), acoustiques (sonoporation), magnétiques (magnétofection) ou photonique (laser) pour déstabiliser les membranes cellulaires de façon transitoire. Les deux principales méthodes physiques employées sont l'électroporation et la sonoporation. Dans ces techniques, l'acide nucléique à transférer n'est pas condensé. Cependant des études récentes cherchent à coupler les vecteurs chimiques et physiques afin d'augmenter leur efficacité.

1. L'ELECTROPORATION OU ELECTROPERMEABILISATION

L'électroporation consiste en l'application de courts pulses de champs électriques de haut voltage pour induire une perméabilisation permettant une entrée de molécules extracellulaires. Une déstabilisation est obtenue lorsque le champ électrique est au dessus du potentiel de repos membranaire. La perméabilisation membranaire est induite transitoirement lorsque des champs électriques sont appliqués durant une période de l'ordre de la milliseconde sur des suspensions cellulaires. La viabilité cellulaire est dépendante des paramètres utilisés tels que l'amplitude du champ électrique, la durée et le nombre de pulses. Les pulses électriques améliorent les interactions entre la membrane plasmique et les composés extracellulaires favorisant leur entrée progressive

dans la cellule. Il est clairement admis que l'efficacité de transfert de gène est liée à la combinaison entre la perméabilisation membranaire et une électrophorèse de l'ADN (Teissie & Rols, 1994; Xie & Tsong, 1993).

Cinq étapes décrivent la cinétique d'électroperméabilisation :

1. La phase d'induction (μ s). Les champs électriques externes appliqués induisent une augmentation de la différence de potentiel membranaire entraînant des déformations locales lorsque cette valeur atteint 200mV (seuil critique de perméabilisation). Cette étape est fortement dépendante des tampons utilisés.
2. La phase d'expansion (ms). La perméabilisation dure aussi longtemps que le champ électrique est maintenu à la valeur critique de perméabilisation.
3. La phase de stabilisation (ms). Le retour à une organisation normale de la membrane est obtenu dès que le champ électrique est en dessous de la valeur critique de perméabilisation.
4. Phase de retour à l'état imperméable (sec à min). Durant cette étape appelée aussi "resealing", la membrane se referme lentement, ce phénomène dure de quelques secondes à quelques minutes.
5. Etape de mémoire. En conséquence des modifications membranaires apportées, les phénomènes tels que les flip-flops membranaires sont rétablis sur des temps plus longs.

Toutes les cellules ont un potentiel membranaire de repos compris entre -20mV et -95mV. Ce potentiel de membrane est créé par la différence de perméabilité membranaire face aux ions et à la différence de composition ionique entre les milieux intra et extra cellulaires. Lorsque les cellules sont exposées à un champ électrique elles subissent des perturbations entraînant la formation de pores membranaires.

Cette méthode est très utilisée *in vivo* pour transférer des plasmides dans de nombreux tissus tels que la peau (Vandermeulen *et al.*, 2007), le muscle (Bloquel *et al.*, 2006), le cerveau (Akaneya *et al.*, 2005), le foie (Jaichandran *et al.*, 2006), les articulations (Grossin *et al.*, 2003), les poumons (Pringle *et al.*, 2007) et les tumeurs (Golzio *et al.*, 2009). L'électroporation permet également le développement de protocoles de vaccination génétique (Peng *et al.*, 2007) et d'immunothérapie anti-cancéreuse (Ugen *et al.*, 2006).

2. LA SONOPORATION

La sonoporation est une technique physique de transfert de gène basée sur l'utilisation des ultrasons couplés à des microbulles de gaz. Cette méthode fait l'objet d'un chapitre complet dans ce manuscrit (Introduction Partie 3 page 89). Brièvement, les ultrasons sont des ondes mécaniques qui alternent des phases de compression et de raréfaction du milieu. Les microbulles de gaz ont comme propriétés d'osciller en présence d'ultrasons et ceci en fonction de leur fréquence et amplitude. Cette oscillation va induire une perméabilisation de la membrane plasmique de façon directe par la formation de pores membranaires. Cependant, le mécanisme d'action de la sonoporation n'est pas encore bien connu.

Afin d'augmenter l'efficacité des méthodes non-virales de nombreuses études se sont portées sur la combinaison d'une méthode non-virale avec les ultrasons. Les ultrasons ont permis d'augmenter l'efficacité de transfert de molécules ou de gène lorsqu'ils sont combinés : à l'électroporation (Escoffre *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2002), la PEI (Qiu *et al.*, 2010; Xenariou *et al.*, 2010), aux liposomes (Anwer *et al.*, 2000; Hayashi *et al.*, 2009) et à des liposomes enrichis en gaz (Suzuki *et al.*, 2009).

3. AUTRES METHODES PHYSIQUES.

LA BIOLISTIQUE

La biolistique désigne le bombardement de microparticules qui permet de transférer des plasmides dans les cellules et les tissus. Il est nécessaire d'absorber le plasmide sur des particules d'or ou de tungstène. Largement utilisé pour les plantes cette technique a été récemment exploitée pour une stratégie de vaccination génique (Ghochikyan *et al.*, 2003). L'injection sous haute pression des particules a permis une amélioration de la délivrance des plasmides. En effet, ce système permet de transfecter les tissus sous cutanés et les muscles (Dileo *et al.*, 2003). Cette méthode a été également exploitée pour le transfert de gène dans la rétine (Zagon *et al.*, 2006) et dans la sphère uro-génitale (Chuang *et al.*, 2003).

LES CHAMPS MAGNETIQUES

L'utilisation de champs magnétiques intenses associés à des nanoparticules magnétiques fonctionnalisées pour un couplage avec de l'ADN permet un transfert ciblé de plasmide. Cet aspect a été abordé dans la partie nanoparticules et nanomatériaux dans ce chapitre.

LE LASER

L'application d'un laser infrarouge femtoseconde a permis d'augmenter l'efficacité de transfert de gène dans le muscle par rapport à l'injection d'ADN nu (Kurata *et al.*, 1986). Le mécanisme supposé est la formation de pores membranaires. La principale limitation de cette technique est la faible pénétration des photons dans les tissus, elle n'est que de quelques millimètres limitant les applications aux tissus superficiels. Récemment, une application de cette méthode pour une vaccination intra dermique contre l'antigène de surface du virus de l'hépatite B a été réalisée (Zeira *et al.*, 2007).

IV) REFERENCES

- Akaneya, Y., Jiang, B., & Tsumoto, T. (2005). RNAi-induced gene silencing by local electroporation in targeting brain region. *J Neurophysiol*, 93(1), 594-602.
- Aniento, F., Emans, N., Griffiths, G., & Gruenberg, J. (1993). Cytoplasmic dynein-dependent vesicular transport from early to late endosomes. *J Cell Biol*, 123(6 Pt 1), 1373-1387.
- Anwer, K., Kao, G., Proctor, B., Anscombe, I., Florack, V., Earls, R., et al. (2000). Ultrasound enhancement of cationic lipid-mediated gene transfer to primary tumors following systemic administration. *Gene Ther*, 7(21), 1833-1839.
- Berk, A. J. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene*, 24(52), 7673-7685.
- Bianco, A., Kostarelos, K., Partidos, C. D., & Prato, M. (2005). Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical Communications*(5), 571-577.
- Bieber, T., Meissner, W., Kostin, S., Niemann, A., & Elsasser, H. P. (2002). Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes. *J Control Release*, 82(2-3), 441-454.
- Bloquel, C., Bejjani, R., Bigey, P., Bedioui, F., Doat, M., BenEzra, D., et al. (2006). Plasmid electrotransfer of eye ciliary muscle: principles and therapeutic efficacy using hTNF-alpha soluble receptor in uveitis. *FASEB J*, 20(2), 389-391.
- Botterhuis, N. E., Sun, Q., Magusin, P. C., van Santen, R. A., & Sommerdijk, N. A. (2006). Hollow silica spheres with an ordered pore structure and their application in controlled release studies. *Chemistry*, 12(5), 1448-1456.
- Brigham, K. L., Meyrick, B., Christman, B., Magnuson, M., King, G., & Berry, L. C., Jr. (1989). In vivo transfection of murine lungs with a functioning prokaryotic gene using a liposome vehicle. *Am J Med Sci*, 298(4), 278-281.
- Brissault, B., Leborgne, C., Guis, C., Danos, O., Cheradame, H., & Kichler, A. (2006). Linear topology confers in vivo gene transfer activity to polyethylenimines. *Bioconjug Chem*, 17(3), 759-765.
- Cai, D., Mataraza, J. M., Qin, Z. H., Huang, Z. P., Huang, J. Y., Chiles, T. C., et al. (2005). Highly efficient molecular delivery into mammalian cells using carbon nanotube spearing. *Nature Methods*, 2(6), 449-454.
- Cartier, N., Hacein-Bey-Abina, S., Bartholomae, C. C., Veres, G., Schmidt, M., Kutschera, I., et al. (2009). Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science*, 326(5954), 818-823.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., et al. (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, 288(5466), 669-672.
- Chuang, Y. C., Chou, A. K., Wu, P. C., Chiang, P. H., Yu, T. J., Yang, L. C., et al. (2003). Gene therapy for bladder pain with gene gun particle encoding pro-opiomelanocortin cDNA. *J Urol*, 170(5), 2044-2048.
- Clamme, J. P., Krishnamoorthy, G., & Mely, Y. (2003). Intracellular dynamics of the gene delivery vehicle polyethylenimine during transfection: investigation by two-photon fluorescence correlation spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1617(1-2), 52-61.
- Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, 422(6927), 37-44.
- Demeneix, B., & Behr, J. P. (2005). Polyethylenimine (PEI). *Adv Genet*, 53PA, 215-230.
- Dileo, J., Miller, T. E., Jr., Chesnoy, S., & Huang, L. (2003). Gene transfer to subdermal tissues via a new gene gun design. *Hum Gene Ther*, 14(1), 79-87.
- Douglas, K. L., Piccirillo, C. A., & Tabrizian, M. (2008). Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. *Eur J Pharm Biopharm*, 68(3), 676-687.
- Duguet, E., Vasseur, S., Mornet, S., & Devoisselle, J. M. (2006). Magnetic nanoparticles and their applications in medicine. *Nanomedicine (Lond)*, 1(2), 157-168.

- Escoffre, J. M., Kaddur, K., Rols, M. P., & Bouakaz, A. (2010). In vitro gene transfer by electrosonoporation. *Ultrasound Med Biol*, 36(10), 1746-1755.
- Felgner, P. L., & Ringold, G. M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature*, 337(6205), 387-388.
- Fischer, A., Hacein-Bey, S., Le Deist, F., Soudais, C., Di Santo, J. P., de Saint Basile, G., et al. (2000). Gene therapy of severe combined immunodeficiencies. *Immunol Rev*, 178, 13-20.
- Ghochikyan, A., Vasilevko, V., Petrushina, I., Movsesyan, N., Babikyan, D., Tian, W., et al. (2003). Generation and characterization of the humoral immune response to DNA immunization with a chimeric beta-amyloid-interleukin-4 minigene. *Eur J Immunol*, 33(12), 3232-3241.
- Golzio, M., Mazzolini, L., Paganin-Gioanni, A., & Teissie, J. (2009). Targeted gene silencing into solid tumors with electrically mediated siRNA delivery. *Methods Mol Biol*, 555, 15-27.
- Goncalves, C., Ardourel, M. Y., Decoville, M., Breuzard, G., Midoux, P., Hartmann, B., et al. (2009). An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med*, 11(5), 401-411.
- Grabe, M., & Oster, G. (2001). Regulation of organelle acidity. *J Gen Physiol*, 117(4), 329-344.
- Grossin, L., Cournil-Henrionnet, C., Mir, L. M., Liagre, B., Dumas, D., Etienne, S., et al. (2003). Direct gene transfer into rat articular cartilage by in vivo electroporation. *FASEB J*, 17(8), 829-835.
- Gupta, A. K., & Gupta, M. (2005). Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021.
- Gupta, A. K., Naregalkar, R. R., Vaidya, V. D., & Gupta, M. (2007). Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications. *Nanomedicine*, 2(1), 23-39.
- Hayashi, S., Mizuno, M., Yoshida, J., & Nakao, A. (2009). Effect of sonoporation on cationic liposome-mediated IFNbeta gene therapy for metastatic hepatic tumors of murine colon cancer. *Cancer Gene Ther*, 16(8), 638-643.
- Howley, P. M., & Livingston, D. M. (2009). Small DNA tumor viruses: large contributors to biomedical sciences. *Virology*, 384(2), 256-259.
- Jaichandran, S., Yap, S. T., Khoo, A. B., Ho, L. P., Tien, S. L., & Kon, O. L. (2006). In vivo liver electroporation: optimization and demonstration of therapeutic efficacy. *Hum Gene Ther*, 17(3), 362-375.
- Jayankura, M., Boggione, C., Frisen, C., Boyer, O., Fouret, P., Saillant, G., et al. (2003). In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J Gene Med*, 5(7), 618-624.
- Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*, 1, 801-832.
- Kakudo, T., Chaki, S., Futaki, S., Nakase, I., Akaji, K., Kawakami, T., et al. (2004). Transferrin-modified liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide: an artificial viral-like delivery system. *Biochemistry*, 43(19), 5618-5628.
- Kam, N. W., O'Connell, M., Wisdom, J. A., & Dai, H. (2005). Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(33), 11600-11605.
- Kurata, S., Tsukakoshi, M., Kasuya, T., & Ikawa, Y. (1986). The laser method for efficient introduction of foreign DNA into cultured cells. *Exp Cell Res*, 162(2), 372-378.
- Kuvichkin, V. V., Danev, R. S., Shigematsu, H., & Nagayama, K. (2009). DNA-induced aggregation and fusion of phosphatidylcholine liposomes in the presence of multivalent cations observed by the cryo-TEM technique. *J Membr Biol*, 227(2), 95-103.
- Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., & Verkman, A. S. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem*, 275(3), 1625-1629.
- Luo, D., & Saltzman, W. M. (2000). Synthetic DNA delivery systems. *Nat Biotechnol*, 18(1), 33-37.
- Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., & Yan, J. (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release*, 114(1), 100-109.

- Marks, W. J., Jr., Bartus, R. T., Siffert, J., Davis, C. S., Lozano, A., Boulis, N., et al. (2010). Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. *Lancet Neurol*, 9(12), 1164-1172.
- Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 121-132.
- McCarthy, J. R., Kelly, K. A., Sun, E. Y., & Weissleder, R. (2007). Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)*, 2(2), 153-167.
- Midoux, P., & Monsigny, M. (1999). Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes. *Bioconjug Chem*, 10(3), 406-411.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J. J., & Jaffres, P. A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol*, 157(2), 166-178.
- Moreno-Igoa, M., Manzano, R., Olivan, S., Calvo, A. C., Toivonen, J. M., & Osta, R. (2010). Effects of gene therapy on muscle 18S rRNA expression in mouse model of ALS. *BMC Res Notes*, 3, 275.
- Morille, M., Passirani, C., Vonarbourg, A., Clavreul, A., & Benoit, J. P. (2008). Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials*, 29(24-25), 3477-3496.
- Morishita, R., Makino, H., Aoki, M., Hashiya, N., Yamasaki, K., Azuma, J., et al. (2011). Phase I/IIa Clinical Trial of Therapeutic Angiogenesis Using Hepatocyte Growth Factor Gene Transfer to Treat Critical Limb Ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Mykhaylyk, O., Antequera, Y. S., Vlaskou, D., & Plank, C. (2007). Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro. *Nat Protoc*, 2(10), 2391-2411.
- Nabel, G. J., Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Fox, B. A., Plautz, G. E., Gao, X., et al. (1993). Direct gene transfer with DNA-liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 11307-11311.
- Novick, P., & Zerial, M. (1997). The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol*, 9(4), 496-504.
- Ogris, M., Carlisle, R. C., Bettinger, T., & Seymour, L. W. (2001). Melittin enables efficient vesicular escape and enhanced nuclear access of nonviral gene delivery vectors. *J Biol Chem*, 276(50), 47550-47555.
- Ozdemir, V., Williams-Jones, B., Glatt, S. J., Tsuang, M. T., Lohr, J. B., & Reist, C. (2006). Shifting emphasis from pharmacogenomics to theragnostics. *Nat Biotechnol*, 24(8), 942-946.
- Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K., & Dobson, J. (2003). Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D-Applied Physics*, 36(13), R167-R181.
- Pantarotto, D., Singh, R., McCarthy, D., Erhardt, M., Briand, J. P., Prato, M., et al. (2004). Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43(39), 5242-5246.
- Peng, B., Zhao, Y., Xu, L., & Xu, Y. (2007). Electric pulses applied prior to intramuscular DNA vaccination greatly improve the vaccine immunogenicity. *Vaccine*, 25(11), 2064-2073.
- Perche, F., Benvegnu, T., Berchel, M., Lebegue, L., Pichon, C., Jaffres, P. A., et al. (2011). Enhancement of Dendritic cells transfection in vivo and of vaccination against B16F10 melanoma with Mannosylated Histidylated lipopolyplexes loaded with tumor antigen mRNA. *Nanomedicine*.
- Powell, R. J., Goodney, P., Mendelsohn, F. O., Moen, E. K., & Annex, B. H. (2010). Safety and efficacy of patient specific intramuscular injection of HGF plasmid gene therapy on limb perfusion and wound healing in patients with ischemic lower extremity ulceration: results of the HGF-0205 trial. *J Vasc Surg*, 52(6), 1525-1530.
- Pringle, I. A., McLachlan, G., Collie, D. D., Sumner-Jones, S. G., Lawton, A. E., Tennant, P., et al. (2007). Electroporation enhances reporter gene expression following delivery of naked plasmid DNA to the lung. *J Gene Med*, 9(5), 369-380.

- Qiu, Y., Luo, Y., Zhang, Y., Cui, W., Zhang, D., Wu, J., et al. (2010). The correlation between acoustic cavitation and sonoporation involved in ultrasound-mediated DNA transfection with polyethylenimine (PEI) in vitro. *J Control Release*, 145(1), 40-48.
- Rejman, J., Bragonzi, A., & Conese, M. (2005). Role of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis in gene transfer mediated by lipo- and polyplexes. *Mol Ther*, 12(3), 468-474.
- Rejman, J., Conese, M., & Hoekstra, D. (2006). Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *J Liposome Res*, 16(3), 237-247.
- Scherer, F., Anton, M., Schillinger, U., Henke, J., Bergemann, C., Kruger, A., et al. (2002). Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 9(2), 102-109.
- Singh, R., Pantarotto, D., Lacerda, L., Pastorin, G., Klumpp, C., Prato, M., et al. (2006). Tissue biodistribution and blood clearance rates of intravenously administered carbon nanotube radiotracers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(9), 3357-3362.
- Slowing, II, Vivero-Escoto, J. L., Wu, C. W., & Lin, V. S. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(11), 1278-1288.
- Sonawane, N. D., Szoka, F. C., Jr., & Verkman, A. S. (2003). Chloride accumulation and swelling in endosomes enhances DNA transfer by polyamine-DNA polyplexes. *J Biol Chem*, 278(45), 44826-44831.
- Suwalski, A., Dabboue, H., Delalande, A., Bensamoun, S. F., Canon, F., Midoux, P., et al. (2010). Accelerated Achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials*, 31(19), 5237-5245.
- Suzuki, R., Namai, E., Oda, Y., Nishiie, N., Otake, S., Koshima, R., et al. (2009). Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release*.
- Talbot, W. A., Zheng, L. X., & Lentz, B. R. (1997). Acyl chain unsaturation and vesicle curvature alter outer leaflet packing and promote poly(ethylene glycol)-mediated membrane fusion. *Biochemistry*, 36(19), 5827-5836.
- Teissie, J., & Rols, M. P. (1994). Manipulation of cell cytoskeleton affects the lifetime of cell membrane electroporation. *Ann N Y Acad Sci*, 720, 98-110.
- Thomas, C. E., Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2003). Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet*, 4(5), 346-358.
- Tros de Ilarduya, C., Sun, Y., & Duzgunes, N. (2010). Gene delivery by lipoplexes and polyplexes. *Eur J Pharm Sci*, 40(3), 159-170.
- Ugen, K. E., Kutzler, M. A., Marrero, B., Westover, J., Coppola, D., Weiner, D. B., et al. (2006). Regression of subcutaneous B16 melanoma tumors after intratumoral delivery of an IL-15-expressing plasmid followed by in vivo electroporation. *Cancer Gene Ther*, 13(10), 969-974.
- Vallet-Regi, M., Ramila, A., del Real, R. P., & Perez-Pariente, J. (2001). A new property of MCM-41: Drug delivery system. *Chemistry of Materials*, 13(2), 308-311.
- van der Aa, M. A., Huth, U. S., Hafele, S. Y., Schubert, R., Oosting, R. S., Mastrobattista, E., et al. (2007). Cellular uptake of cationic polymer-DNA complexes via caveolae plays a pivotal role in gene transfection in COS-7 cells. *Pharm Res*, 24(8), 1590-1598.
- Vandermeulen, G., Staes, E., Vanderhaeghen, M. L., Bureau, M. F., Scherman, D., & Preat, V. (2007). Optimisation of intradermal DNA electrotransfer for immunisation. *J Control Release*, 124(1-2), 81-87.
- Vaughan, E. E., & Dean, D. A. (2006). Intracellular trafficking of plasmids during transfection is mediated by microtubules. *Mol Ther*, 13(2), 422-428.
- Wagner, E. (1999). Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 38(3), 279-289.
- Wang, C. Y., & Huang, L. (1984). Polyhistidine mediates an acid-dependent fusion of negatively charged liposomes. *Biochemistry*, 23(19), 4409-4416.

- Wang, X., Liang, H. D., Dong, B., Lu, Q. L., & Blomley, M. J. (2005). Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology*, 237(1), 224-229.
- Watson, P., Jones, A. T., & Stephens, D. J. (2005). Intracellular trafficking pathways and drug delivery: fluorescence imaging of living and fixed cells. *Adv Drug Deliv Rev*, 57(1), 43-61.
- Woods, N. B., Bottero, V., Schmidt, M., von Kalle, C., & Verma, I. M. (2006). Gene therapy: therapeutic gene causing lymphoma. *Nature*, 440(7088), 1123.
- Wu, G. Y., & Wu, C. H. (1987). Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system. *J Biol Chem*, 262(10), 4429-4432.
- Xenariou, S., Liang, H. D., Griesenbach, U., Zhu, J., Farley, R., Somerton, L., et al. (2010). Low-frequency ultrasound increases non-viral gene transfer to the mouse lung. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42(1), 45-51.
- Xie, T. D., & Tsong, T. Y. (1993). Study of mechanisms of electric field-induced DNA transfection. V. Effects of DNA topology on surface binding, cell uptake, expression, and integration into host chromosomes of DNA in the mammalian cell. *Biophys J*, 65(4), 1684-1689.
- Yamashita, Y., Shimada, M., Tachibana, K., Harimoto, N., Tsujita, E., Shirabe, K., et al. (2002). In vivo gene transfer into muscle via electro-sonoporation. *Hum Gene Ther*, 13(17), 2079-2084.
- Yu, M., Chen, W., & Zhang, J. (2010). p53 gene therapy for pulmonary metastasis tumor from hepatocellular carcinoma. *Anticancer Drugs*, 21(9), 882-884.
- Zabner, J., Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., & Welsh, M. J. (1995). Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. *J Biol Chem*, 270(32), 18997-19007.
- Zagon, I. S., Sassani, J. W., Malefyt, K. J., & McLaughlin, P. J. (2006). Regulation of corneal repair by particle-mediated gene transfer of opioid growth factor receptor complementary DNA. *Arch Ophthalmol*, 124(11), 1620-1624.
- Zeira, E., Manevitch, A., Manevitch, Z., Kedar, E., Gropp, M., Daudi, N., et al. (2007). Femtosecond laser: a new intradermal DNA delivery method for efficient, long-term gene expression and genetic immunization. *FASEB J*, 21(13), 3522-3533.
- Zerial, M., & McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(2), 107-117.
- Zhang, S., Xu, Y., Wang, B., Qiao, W., Liu, D., & Li, Z. (2004). Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. *J Control Release*, 100(2), 165-180.
- Zheng, M., Jagota, A., Strano, M. S., Santos, A. P., Barone, P., Chou, S. G., et al. (2003). Structure-based carbon nanotube sorting by sequence-dependent DNA assembly. *Science*, 302(5650), 1545-1548.
- Zhou, S., Li, S., Liu, Z., Tang, Y., Wang, Z., Gong, J., et al. (2010). Ultrasound-targeted microbubble destruction mediated herpes simplex virus-thymidine kinase gene treats hepatoma in mice. *J Exp Clin Cancer Res*, 29, 170.
- Zou, S. M., Erbacher, P., Remy, J. S., & Behr, J. P. (2000). Systemic linear polyethylenimine (L-PEI)-mediated gene delivery in the mouse. *J Gene Med*, 2(2), 128-134.

PARTIE III : UTILISATION DE LA SONOPORATION COMME METHODE DE TRANSFERT DE GENE

Les applications thérapeutiques des ultrasons sont apparues bien avant la technique de l'échographie. Il a été reconnu dès 1927 que les ultrasons pouvaient produire des changements durables dans les systèmes biologiques, depuis de nombreuses études sur la sécurité des ultrasons mais également sur la thérapie par ultrasons ont suivi (Wood & Loomis, 1927).

I) GENERALITES SUR LES ULTRASONS ET L'ECHOGRAPHIE

Les ultrasons sont des ondes acoustiques de type mécanique alternant des phases de compression et d'expansion du milieu dans lequel ils se propagent. Les ultrasons ne peuvent donc pas se propager dans le vide à l'inverse des ondes électromagnétiques. On distingue 3 gammes de sons en fonction de leur fréquence : les infrasons dont la fréquence est inférieure à 20Hz ; les sons qui correspondent à la gamme de fréquence audible pour l'homme de 20Hz à 20kHz ; et les ultrasons dont la fréquence est supérieure à 20kHz. Par définition l'oreille humaine ne peut donc pas percevoir les ultrasons. Cela s'explique par la morphologie de la membrane basilaire présente dans la cochlée ; celle-ci ne peut entrer en résonance que pour des sons dont la fréquence est comprise entre 20Hz et 20kHz.

Différents paramètres caractérisent les ondes ultrasonores dans un milieu. Les paramètres des ondes ultrasonores sont la fréquence, l'amplitude, la répétition du pulse (nombres de cycles, durée du pulse et fréquence de répétition). La célérité (m/s) est la vitesse de l'onde ultrasonore dans un milieu donné et dépend de l'impédance acoustique du milieu et de sa masse volumique (équation 1). L'impédance acoustique (kg/m²/s) correspond à l'aptitude d'un milieu donné à la pénétration des ultrasons, elle dépend de la compressibilité du milieu et de sa masse volumique (équation 2).

$$c = \frac{Z}{\rho} ,$$

Equation 1. Célérité de l'onde ultrasonore. Z = impédance acoustique (kg/m²/s), c = célérité (m/s), ρ = masse volumique (kg/m³)

$$Z = \sqrt{\frac{\rho}{\chi}} ,$$

Equation 2. Impédance acoustique. Z= impédance acoustique (kg/m²/s), χ = compressibilité du milieu (m/s²/kg) , ρ = masse volumique (kg/m³)

Une onde ultrasonore est caractérisée par plusieurs paramètres :

- sa fréquence : par définition une onde ultrasonore est de fréquence supérieure à 20 kHz. Les ultrasons utilisés en thérapeutique sont généralement à une fréquence entre 1 et 3 MHz. Les ultrasons utilisés en échographie sont de fréquence plus élevée à partir de 6 MHz jusqu'à 50 MHz pour l'échographie de haute résolution.
- son amplitude : l'amplitude de l'onde ultrasonore correspond directement à la pression acoustique (en pascal) délivrée. Il existe une relation entre l'intensité ultrasonore et la pression acoustique (équation 3). L'intensité ultrasonore s'exprime en W/cm² et a une valeur moyenne lors en échographie de 100mW/cm² et de 1 à 3 W/cm² en physiothérapie.

$$I = \frac{p^2}{2\rho c},$$

Equation 3. Intensité ultrasonore. I = intensité (W/cm²), p = pression acoustique (Pa), ρ = masse volumique (kg/m³), c = célérité (m/s)

- son pulse : la majeure partie des protocoles thérapeutiques ultrasonore utilisent des ultrasons pulsés. L'imagerie échographique utilise également des pulse ultrasonores. Deux paramètres de pulse sont à prendre en compte : la durée du pulse de stimulation et la fréquence de répétition de ce pulse. Le duty cycle est exprimé en % et correspond à la durée du pulse de stimulation divisé par la durée du pulse total (stimulation et non stimulation). Le duty cycle est très faible en échographie (autour de 3%), seuls quelques cycles sont envoyés tandis que pour la physiothérapie le duty cycle est plus élevé (le plus souvent à 20%).

La principale utilisation des ultrasons en médecine est l'imagerie échographique. Cette technique a été développée en 1951 par J.J. Wild et J. Reid. L'échographie médicale ultrasonore repose sur la réflexion des ultrasons à l'interface de deux milieux d'impédances acoustiques différentes. Comme présenté dans le tableau 1 dans les tissus biologiques, la célérité est généralement voisine de celle de l'eau (1550 m/s) comme par exemple dans le foie, reins ou les muscles, cependant dans la graisse cette valeur est inférieure (1450 m/s). La célérité est par contre supérieure dans les tendons (1720 à 2000 m/s) et dans les os (3000 et 4000 m/s). Le facteur de réflexion aux interfaces est très faible et dépend principalement de la différence de célérité car les masses volumiques sont comparables entre les tissus mous (sauf pour les os, pour les tendons et la peau en moindre mesure), ce qui nécessite une forte amplification du signal à la réception. Toutefois ce faible facteur de réflexion confère aux tissus une certaine transparence qui facilite les explorations en profondeur. Les ultrasons sont également utilisés dans de nombreux domaines tels que la marine pour les sonars, l'industrie pour la découpe de matériaux, la détection d'anomalie (soudures) et en biologie pour l'homogénéisation de produits (sonication).

Tableau 3-1. Valeurs de célérité ultrasonore dans l'eau et différents tissus.

Milieu/Tissu	Célérité (m/s)	Milieu/Tissu	Célérité (m/s)
Eau	1550	Graisse	1450
Foie	1550	Peau	1720 à 2000
Rein	1560	Tendon	1720 à 2000
Muscle	1590	Os	3000 à 4000

II) EFFETS BIOLOGIQUES ET THERAPEUTIQUES DES ULTRASONS

Hormis l'utilisation des ultrasons en imagerie échographique, les ultrasons sont largement utilisés pour leurs effets thérapeutiques. Deux types d'effets ont lieu lorsqu'un milieu est soumis aux ultrasons : des effets thermiques et des effets non thermiques (ter Haar, 2007). Il est admis que les ultrasons en mode continu induisent des effets thermiques tandis que les ultrasons pulsés induisent des effets non thermiques ; il semblerait cependant que ces effets ne soient pas dissociables et que des effets thermiques sont à prendre en compte lors d'une stimulation en mode pulsé. La pulsation des ultrasons réduit l'augmentation de température proportionnellement au ratio du pulse mais n'élimine pas l'échauffement (Duck, 1998).

1) EFFETS THERMIQUES

Du fait de la nature mécanique des ondes ultrasonores, il existe un échauffement des matériaux traversé et ceci de façon dépendante de l'intensité ultrasonore. Cet échauffement est dû à l'absorption par le tissu d'une partie de l'énergie ultrasonore envoyée. L'intensité de ces effets est également fonction de du coefficient d'absorption du tissu (proportionnel à la fréquence), du temps de stimulation, du taux de répétition du pulse et de la puissance émise. Un indice thermique (TI) a donc été mis en place afin de déterminer l'élévation de température dans un tissu soumis aux ultrasons (équation 4). L'indice thermique donne une information sur l'augmentation thermique du tissu suite à une stimulation ultrasonore. En fonction du type de tissu l'élévation de température sera donc plus ou moins importante. Le TI n'indique pas l'augmentation réelle de température dans les tissus car les tissus ont différentes valeurs de w_{DEG} . Pour cette raison, différentes valeurs ont été introduites. Les trois indices thermiques les plus répandus sont : l'indice thermique pour les tissus mous (TIS), l'indice pour les os (TIB) et l'indice thermique crânien (TIC). La "World Federation for Ultrasound in Medicine and Biology Temperature" fait état qu'une augmentation de température de 1,5°C ne présente aucun danger biologique tandis qu'une augmentation de 4 à 5°C durant cinq minutes est potentiellement dangereux (Barnett *et al.*, 2000). Aucun effet pathologique significatif n'a été observé avec un $TI < 2$. Cependant, à un TI supérieur, les effets thermiques des ultrasons peuvent constituer un risque pour le tissu insonifié. Néanmoins, certaines thérapies tirent parti de cet effet, comme la physiothérapie utilisés en kinésithérapie ou les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU).

$$TI = \frac{w_0}{w_{DEG}},$$

Equation 4. Indice thermique. w_0 = puissance délivrée par l'appareillage ultrasonore, w_{DEG} = puissance nécessaire pour faire augmenter le tissu de 1°C.

2) EFFETS NON THERMIQUES

Les effets non thermiques sont divisés en deux catégories avec d'une part la cavitation et d'autre part les autres effets mécaniques. Les ultrasons de faible intensité ont des effets biologiques. La majeure partie des effets biologiques à faible intensité est non thermique. Le principal effet non thermique est la cavitation. La cavitation correspond à la formation d'une bulle de gaz dans un liquide. L'index mécanique (formule 5) découvert par Holland et Apfel en 1989 donne une indication sur les dommages mécaniques des tissus dû à la cavitation inertielle (Apfel & Holland, 1991; Holland & Apfel, 1989). Pour un MI < 0,3 l'amplitude acoustique est considérée comme faible, pour des valeurs de MI comprises entre 0,3 et 0,7 des dommages biologiques ont été observés sur les intestins et les poumons lors de l'échographie du fœtus (British, 2000). Pour un MI supérieur à 0,7 l'amplitude des ultrasons est considérée comme élevée et il existe un risque de cavitation (ter Haar, 2009). Ce risque augmente en fonction de l'index mécanique, la valeur seuil d'indice mécanique à ne pas dépasser pour rester dans les limites de sécurité biologique actuellement est de 1,9 sur les échographes (ter Haar, 2009). Les microbulles oscillent à différents régimes en fonction de l'amplitude des ultrasons, pour des MI bas, les microbulles oscillent de façon stable (cavitation stable), tandis que pour des MI plus élevés les microbulles vont à chaque cycle de pression négative croître en taille jusqu'à s'effondrer sur elle-même, c'est la cavitation inertielle. Cet effondrement de la microbulle se caractérise notamment par une fragmentation qui entraîne une élévation de température localement, ainsi qu'une production de radicaux libres. Pour des MI très élevés la

microbulle forme un « micro-jet », la microbulle se projette contre la membrane plasmique de façon très violente, ce qui induit la formation de pores membranaires (figure 3-4c).

$$MI = \frac{p^-}{\sqrt{F}}$$

Formule 5. Indice mécanique. MI = index mécanique, p^- = pic de pression négative (MPa), F = fréquence (MHz)

3) LES METHODES THERAPEUTIQUES UTILISANT LES ULTRASONS

En ce qui concerne l'imagerie échographique, les paramètres ultrasonores ont été choisis pour leur capacité à donner des images avec une bonne résolution spatiale et temporelle en utilisant des pulses très courts (de l'ordre de la microseconde) ainsi qu'une pression acoustique suffisante pour obtenir un bon rapport signal sur bruit. Le but est d'obtenir l'image à visée diagnostique sans causer d'effet cellulaire significatif. À l'inverse, les applications thérapeutiques des ultrasons requièrent que le tissu ciblé subisse des changements réversibles ou non (en fonction du but thérapeutique). Les ultrasons thérapeutiques sont généralement délivrés en continu ou avec de longs pulses (de l'ordre de la milliseconde). L'absorption par les tissus de l'énergie ultrasonore conduit à un échauffement tissulaire. Les thérapies par ultrasons peuvent être divisées en deux catégories : « haute » intensité et « basse » intensité, la première est basée sur les effets thermiques, pas la seconde (Baker *et al.*, 2001).

ULTRASONS DE HAUTE INTENSITE

Le but principal de nombreuses applications thérapeutiques des ultrasons est l'échauffement des tissus dont principalement le "High Intensity Focused Ultrasound" (HIFU), la sonothrombolyse la lithotritie et la lipolyse (Mitragotri, 2005).

- HIFU

L'augmentation de quelques degrés par rapport à la température normale peut avoir de nombreux effets physiologiques bénéfiques comme par exemple l'augmentation de la perfusion sanguine dans la région stimulée. En fonction des paramètres acoustiques, la stimulation ultrasonore induit ou non des effets thermiques. Dans certaines applications c'est l'effet thermique qui est attendu, comme dans la technique HIFU. Cette technique utilise des ultrasons de haute intensité focalisés qui permettent d'élever spécifiquement la température d'une zone d'un organe de façon très rapide (température atteinte : 56°C en moins de 3 secondes). Les intensités ultrasonores utilisées dans cette technique sont de l'ordre du kW/cm² soit environ 1000 fois l'intensité utilisée en physiothérapie et 10 000 fois cette utilisée en échographie. Une élévation de température à 56°C durant une seconde conduit à la mort cellulaire (Kennedy *et al.*, 2003). L'élévation de la température dépend de l'intensité ultrasonore, du coefficient d'absorption tissulaire, de la perfusion tissulaire et du temps d'exposition aux ultrasons. Les traitements hyperthermiques se basent sur le maintien d'une température comprise entre 43 et 60°C durant quelques secondes jusqu'à 1 heure. Hilger *et al.* ont trouvé que la température thermoablasive critique pour le tissu tumoral est comprise entre 55 et 60°C (Hilger *et al.*, 2005). La technique des HIFU est de plus en plus utilisée comme méthode d'ablation tumorale en remplacement de la chirurgie chez l'homme. Le traitement HIFU est le plus souvent guidé par échographie cependant il existe un appareillage permettant de réaliser des protocoles de HIFU guidés par IRM (Orsi *et al.*, 2010). Les HIFU ont prouvé leur efficacité dans le cadre de cancers du foie, du pancréas et du sein. La principale complication est l'apparition de brûlures sur la peau.

- LA SONOTHROMBOLYSE

La sonothrombolyse est une technique utilisée dans la dissolution des caillots sanguins pour le traitement des crises cardiaques (Alexandrov *et al.*, 2004; Daffertshofer & Hennerici, 2003). La dissolution du caillot est uniquement la conséquence directe de la pression acoustique appliquée. Une amélioration peut être obtenue lorsqu'on couple cette méthode à une enzyme telle que l'activateur de plasminogène impliquée dans la dégradation des caillots sanguins (Mitragotri, 2005). Cette technique a été réalisée sur des modèles animaux et également en clinique.

ULTRASONS DE FAIBLE INTENSITE

Les thérapies ultrasonores de faible intensité sont la sonophorèse (appelée également phonophorèse), la physiothérapie, ainsi que la sonoporation.

- SONOPHORESE

Les ultrasons permettent également d'augmenter le transfert de molécules thérapeutiques dans les tissus. Le terme sonophorèse désigne la technique de transfert de molécules actives par la peau en présence d'ultrasons (Ogura *et al.*, 2008; Skauen & Zentner, 1984). Les mécanismes par lesquels les ultrasons perméabilisent la peau restent méconnus. Les ultrasons de faible fréquence (entre 20 et 100kHz) apparaissent comme les plus efficaces pour cette technique. La première étude rapportant le fait que les ultrasons augmentent le transfert de molécules par voie transdermique date de 1954, en utilisant de l'hydrocortisone (Fellinger & Schmidt, 1954). Les différentes molécules transférées par cette méthode sont l'hydrocortisone, l'érythropoïétine, l'insuline ou encore des agents anesthésiants tels que la lidocaïne ou la xylocaïne (Becker *et al.*, 2005; Katz *et al.*, 2004). Cette méthode a fait l'objet d'une étude clinique chez l'homme pour le transfert efficace de stéroïdes (le betaméthasone) (Maruani *et al.*, 2010). L'avantage de cette technique est l'administration de substances sans injection, le produit est appliqué sur la peau et le transfert intradermique est réalisé par les ultrasons.

- PHYSIOTHERAPIE

Il est à noter que les ultrasons sont utilisés de façon empirique dans la thérapie des tendinopathies, des troubles articulaires et osseux. Les ultrasons sont également utilisés pour accélérer la réparation tissulaire, la résolution de l'œdème ainsi que la cicatrisation. Cette méthode est connue sous le nom de physiothérapie. Les deux principaux tissus traités en physiothérapie sont les tendons et l'os. Ainsi, des études menées sur un modèle de lésion du tendon d'Achille ou sur les fractures osseuses montrent que la stimulation ultrasonore sur ces tissus lésés accélère la réparation tendineuse (Ng *et al.*, 2003; Ng & Fung, 2007; Yeung *et al.*, 2006) et osseuse (Azuma *et al.*, 2001; Favaro-Pipi *et al.*, 2010) en stimulant principalement la production de matrice extracellulaire et la prolifération cellulaire. Là encore, les mécanismes par lesquels les ultrasons exercent leurs bénéfices thérapeutiques sont encore mal connus. Ce bénéfice dépend cependant de nombreux paramètres tels que la fréquence de l'onde ultrasonore, l'intensité, le temps de stimulation, le nombre de traitements ainsi que la phase de réparation pendant laquelle le traitement a lieu. Il a été montré par exemple qu'un traitement de physiothérapie ultrasonore durant la phase précoce de réparation osseuse (phase inflammatoire et proliférative) permet une accélération de la réparation osseuse. Cependant, si le traitement est effectué lors de la phase proliférative tardive c'est la formation de cartilage qui est stimulée (ter Haar, 2007). Tous ces paramètres doivent être encore optimisés afin de proposer un protocole thérapeutique efficace pour les lésions de l'os. Les effets sur les tendons seront discutés plus tard dans le manuscrit.

- SONOPORATION

La sonoporation est le terme utilisé pour décrire le phénomène par lequel les ultrasons modifient transitoirement la perméabilité de la membrane plasmique en présence d'agents de contraste ultrasonore, permettant un transfert de molécules de faible et haut poids moléculaire (de l'ordre du mégadalton) dans la cellule. Cette technique sera détaillée plus loin dans cette partie.

III) LES MICROBULLES DE GAZ

1) Présentation

Les microbulles de gaz sont comme leur nom l'indique des objets de taille micrométrique composés de gaz. Elles ont été mises au point comme agent de contraste ultrasonore, car le gaz est un puissant réflecteur des ultrasons. En effet, l'ajout des microbulles de gaz dans la circulation systémique permet de créer des interfaces de milieux d'impédance acoustiques très différentes et ainsi engendrer une réflexion des ultrasons. Le potentiel de ces agents de contraste est donc de pouvoir pallier aux faibles différences d'échogénicité des tissus en réhaussant le contraste des images du compartiment vasculaire. Les microbulles de gaz ont des propriétés physiques qui leur permettent d'être des oscillateurs acoustiques. Cela signifie qu'en fonction de l'onde ultrasonore envoyée, les microbulles de gaz entrent en oscillation. Ces oscillations sont une alternance de phases de compression et d'expansion de la microbulle, l'amplitude et la fréquence d'oscillation de la microbulle est directement liée à l'onde ultrasonore envoyée (figure 3-1). Cette propriété oscillatoire est principalement due à la compressibilité de la microbulle – composée majoritairement de gaz – ainsi que l'élasticité de son enveloppe composée le plus souvent de phospholipides. Cette oscillation crée alors en retour un signal ultrasonore (écho) que l'on visualise sur un échographe. Les microbulles possèdent une fréquence de résonance, c'est-à-dire une fréquence à laquelle l'amplitude des oscillations est maximale, celle-ci se situe entre 2 et 5 MHz en fonction du type de microbulles. L'échographie de contraste est principalement utilisée en cardiologie et de plus en plus en oncologie dans la détection de tumeurs. De nombreuses microbulles de gaz sont d'ores et déjà utilisées en clinique (tableau 3-2). Cette technique possède en effet de nombreux avantages : elle est peu coûteuse, non invasive (les ultrasons utilisés en échographie de contraste sont les mêmes que ceux utilisés en échographie de diagnostic anténatal chez le bébé) et permet de visualiser les vaisseaux sanguins car l'agent de contraste est injecté par voie intraveineuse. Cette propriété permet d'utiliser l'échographie de contraste pour visualiser en cardiologie des malformations cardiaque (par exemple un foramen ovale perméable entre les deux oreillettes) ainsi que les anomalies vasculaires coronariennes ou au niveau du péricarde.

Cette technique d'imagerie émergente est également de plus en plus utilisée en oncologie pour la détection de tumeurs. En effet, les tissus tumoraux ayant dans leur microenvironnement une hypervascularisation chaotique, la zone tumorale sera de ce fait la première à être visualisée après injection de l'agent de contraste lors de l'examen échographique. En 2006, il a été estimé à 1 million le nombre d'utilisations d'ACU en clinique dans le monde, ce chiffre est en constante augmentation (Blomley *et al.*, 2007).

L'interaction entre les ultrasons et les microbulles de gaz est une forme de cavitation acoustique, les microbulles peuvent agir comme noyau de cavitation inertielle. Ces perturbations produisent des perturbations mécaniques et peuvent induire des effets biologiques sur les cellules et les tissus, ces effets seront détaillés dans la section interaction cellule-microbulle ultrasons. *In vitro*, les effets des microbulles sur les cellules est connu sous le nom de sonoporation. Le phénomène de sonoporation et la mort cellulaire ont été rapportés pour des valeurs de MI inférieures au seuil de cavitation inertielle. *In vivo*, des effets cytotoxiques ou inflammatoires ont été observés pour des valeurs de MI de l'ordre de 0,4. Il est donc important de revoir les valeurs seuils en fonction du type d'échographie réalisée.

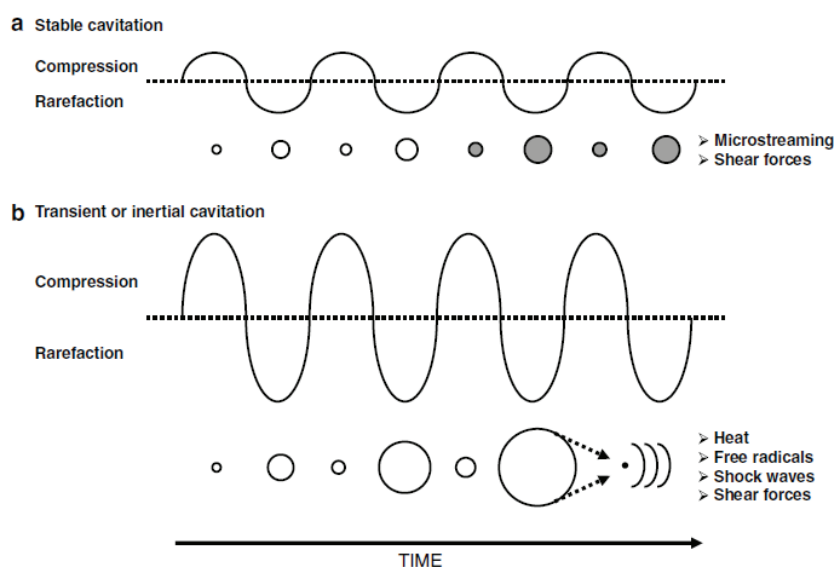


Figure 3-1. Schéma illustrant les effets d'un champ acoustique à différentes intensités sur une microbulle de gaz. (a) Les ultrasons de faible intensité induisent l'oscillation d'une microbulle déjà existante, on parle de cavitation stable lorsque la taille de la microbulle oscille autour de son diamètre de résonance (cercles pleins). (b) À de plus fortes intensités le diamètre de la microbulle croît rapidement en quelques cycles jusqu'à s'effondrer sur elle-même en créant des effets thermiques (Newman & Bettinger, 2007).

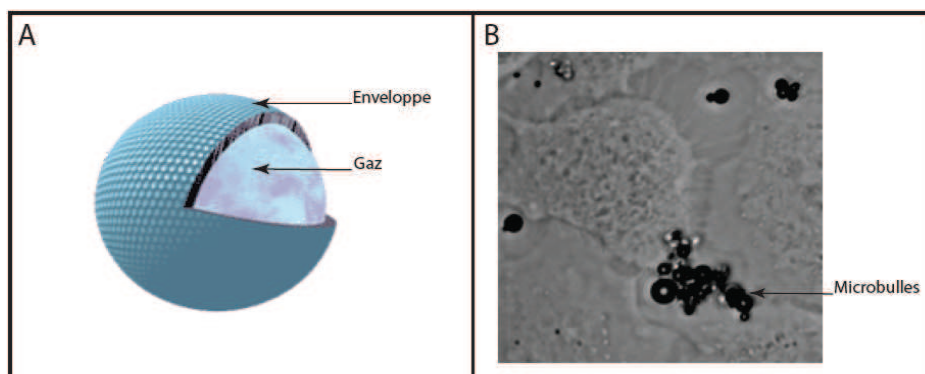


Figure 3-2. Illustration d'une microbulle de gaz (A), observation en microscopie optique de microbulles MicromarkerTM autour de cellules HeLa avant stimulation ultrasonore (B).

2) Composition

Un agent de contraste ultrasonore (ACU) doit remplir quelques conditions : les ACU sont des microbulles composées de gaz stabilisés ou non par une enveloppe de matériau biocompatible comme des protéines, des lipides ou des polymères. Les ACU doivent être de taille inférieure à celle d'une hématie (passage des différentes barrières biologiques) et être appropriés pour l'injection intraveineuse. Les ACU doivent également être suffisamment petits et stables pour traverser les capillaires pulmonaires. Une fois injecté, les ACU doivent persister dans la circulation suffisamment longtemps, sans être détruit, pour réaliser une image échographique (au moins 20 minutes), ils doivent conserver les mêmes dynamiques de flux que le sang.

Le tableau 3-2 présente les différentes microbulles développées à ce jour. Différents types de gaz ont été utilisés dans la fabrication des microbulles. Les premiers agents de contraste mis sur le marché étaient composés d'air (Echovist, Albunex, Levovist). La première génération d'ACU

développée dans les années 1990 consiste en des microbulles d'air entourées de parois rigides constituées d'albumine humaine ou de galactose. Le premier ACU mis sur le marché est l'Echovist, ce dernier ne pouvait être utilisé que pour l'imagerie du cœur droit. Sa taille étant trop élevée l'Echovist ne franchi pas la microcirculation pulmonaire. De plus sa durée de vie après injection est très faible (<1min). Le premier ACU capable de résister à la circulation pulmonaire fût l'Albunex puis le Levovist. Une imagerie de contraste du cœur droit et gauche est alors possible. La deuxième génération de microbulles est marquée par le remplacement de l'air par des gaz lourds tels que les perfluorocarbones (PFC), principalement C_3F_8 et C_4F_{10} ou les hexafluores de soufre (SF_6). Ces gaz de haut poids moléculaire ont la propriété de diffuser très lentement dans le sang, ce qui augmente significativement le temps de demi-vie des ACU après injection dans la circulation sanguine. Leur enveloppe est le plus souvent composée de phospholipides. Des surfactants entourent ensuite cette enveloppe pour stabiliser la microbulle. L'épaisseur et l'élasticité de la paroi sont des paramètres importants car ils déterminent l'échogénicité de la microbulle (Van Liew & Burkard, 1995). Les agents de contraste de troisième génération sont en cours de développement, ils permettent notamment une rémanence dans la circulation plus élevée.

Tableau 3-2. Liste des agents de contraste ultrasonores développés pour une utilisation en clinique et en recherche.

Nom	Fabricant	Gaz	Enveloppe	Taille	Année
Echovist	Schering AG	Air	Galactose		1991
Albunex	Mallinckodt	Air	Albumine humaine	3,85 μm	1994
Levovist	Schering AG	Air	Galactose / Acide palmitique	2-8 μm	1996
Optison	Molecular Biosystems	C_3F_8	Albumine humaine	93% <10 μm	2001
Quantison	Andaris	Air	Albumine humaine	3,2 μm	
Definity	Lantheus	C_3F_8	Phospholipides	1,1-3,3 μm	2001
Sonovue	Bracco	SF_6	Phospholipides	2,5-6 μm	2001
Sonazoid	Amersham Health	C_4F_{10}	Lipides	3 μm	2006
BR14	Bracco	C_3F_8	Phospholipides	2,6 μm	2005
Micromarker	Bracco	C_4F_{10}/N_2	Phospholipides	2,3-2,9 μm	2010

Le ciblage de tissu étant très important que ce soit pour l'imagerie ou la thérapie, des ACU ciblés sont à présent à l'étude. Les microbulles ciblées grâce au couplage de ligands ayant la capacité de se fixer spécifiquement sur des molécules du tissu cible (pathologique par exemple) permettent de visualiser ou de traiter préférentiellement les zones d'intérêt. Un agent de contraste commercial récent, le Micromarker Target-ready™ (Visualsonics), a par exemple la capacité d'être greffé à un anticorps *via* une biotine grâce à la présence de groupements streptavidine à leur surface permettant ainsi de réaliser de l'imagerie moléculaire (figure 3-3). Actuellement, beaucoup de travaux ont été réalisés *in vitro* sur ce type de microbulles qui peuvent désormais, par exemple, reconnaître spécifiquement la P-sélectine (Lindner *et al.*, 2001), les ICAM-1 (Weller *et al.*, 2003), le TNF- α , les intégrines (Ellegala *et al.*, 2003) ou encore le VEGFR2 (Anderson *et al.*, 2010). Ce type de microbulles ainsi fonctionnalisés a permis, par exemple, de cibler et de détecter *in vivo* des thrombus chez le porc en se fixant aux récepteurs GPIIb/IIIa exprimés à la surface des plaquettes (Unger *et al.*, 2000).

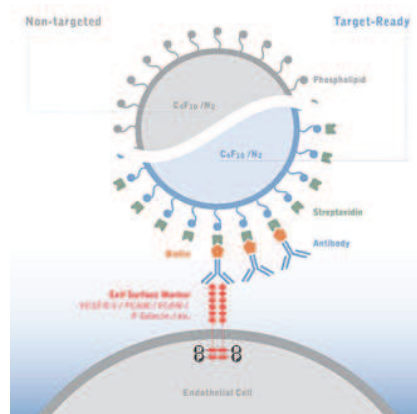


Figure 3-3. Illustration du fonctionnement d'une microbulle ciblée (Micromarker Target-Ready™). Source : <http://www.visualsonics.com/contrast-imaging>

3) INFLUENCE DE LA COMPOSITION DES MICROBULLES SUR LEURS PROPRIETES ACOUSTIQUES

Les paramètres physiques des microbulles qui ont une influence sur leurs propriétés acoustiques sont : la taille de la microbulle, l'épaisseur de l'enveloppe, la rigidité de l'enveloppe et le type de gaz utilisé.

1. INFLUENCE DE LA TAILLE DES MICROBULLES DE GAZ.

La taille des ACU est un paramètre très important. La capacité de dispersion des ultrasons par les ACU est augmenté avec leur taille (de Jong *et al.*, 1991). Les microbulles les plus grosses vont ainsi renvoyer plus d'énergie ultrasonore que les plus petites. Les ACU étant injectés dans la circulation systémique, leur taille ne doit pas dépasser la taille d'un capillaire afin de ne pas l'obstruer, cette taille a été estimée à 10 μm . Obtenir une solution contenant une distribution de taille de microbulle très étroite est un challenge technique, d'autant plus qu'en fonction de leur environnement les microbulles peuvent fusionner, croître ou se contracter (Van Liew & Burkard, 1995). La fréquence de résonance est fortement dépendante de la taille de la microbulle: une microbulle de petite taille résonne à des fréquences plus élevées.

2. INFLUENCE DE L'ENVELOPPE.

La cinétique de dissolution d'une microbulle non enveloppée est très rapide et en particulier pour les microbulles de petite taille. Selon l'équation d'Eptsein et Plasset, une microbulle d'air non enveloppée de 1 μm et de 5 μm se dissolvent respectivement en 2ms et 93ms (de Jong *et al.*, 1991). Pour cette raison, tous les ACU utilisés à l'heure actuelle sont composés d'une enveloppe afin d'empêcher une dissolution trop rapide du gaz et permet ainsi une protection de la microbulle. L'enveloppe des premiers ACU était composée de protéines, de surfactants ou de polymères (tableau 3-2). L'utilisation des surfactants comme stabilisateur mécanique a permis de diminuer les tensions de surface responsables de la diffusion du gaz (Van Liew & Burkard, 1995). La modification de la composition de l'enveloppe influe sur son élasticité, ce qui a pour effet de changer la fréquence de résonance d'une microbulle. Plus l'enveloppe est rigide, plus la fréquence de résonance est élevée. La fréquence de résonance est un paramètre important car il détermine la gamme de fréquence utilisable pour réaliser une imagerie échographique de contraste de qualité. L'épaisseur des enveloppes des ACU varie de 10nm à 300nm. Ce paramètre va également influencer l'élasticité de l'enveloppe et ainsi la fréquence de résonance. Le Quantison™ possède une enveloppe de 300nm d'épaisseur, il fait partie des ACU les plus rigides (Frinking & de Jong, 1998).

3. INFLUENCE DE LA COMPOSITION EN GAZ.

Les premiers ACU étaient constitués d'air, un problème de stabilité s'est posé car la majorité des ACU étaient dissous dans le sang avant de pouvoir réaliser une imagerie de contraste ultrasonore (Meltzer *et al.*, 1980). Les générations suivantes d'ACU sont constituées de gaz de plus haut poids moléculaire. Ces gaz possèdent un coefficient d'Ostwald plus faible que l'air (Kabalinov *et al.*, 1998). Ce coefficient correspond à la quantité de solvant nécessaire pour dissoudre une quantité donnée de gaz (pour une température et une pression donnée). Les simulations réalisées à l'aide de l'équation d'Eptsein et Plasset, qui prennent en compte le coefficient d'Ostwald, montrent que l'utilisation d'un gaz tel que le SF₆ (présent dans le Sonovue®) multiplie par 4 le temps de dissolution d'une microbulle (pour une microbulle de 3µm) (Bouakaz & de Jong, 2007). Basés sur des résultats similaires, des ACU de seconde génération contenant des gaz à haut poids moléculaire ont été développés : il s'agit des perfluorocarbones (PFC). Ces gaz ont des coefficients d'Ostwald encore plus faibles que le SF₆. Le poids moléculaire et le coefficient d'Ostwald sont inversement corrélés : plus le poids moléculaire est élevé plus ce coefficient est faible et par conséquent, moins le gaz diffuse en dehors de la microbulle.

4) LES REGIMES OSCILLATOIRES

Il existe plusieurs régimes oscillatoires des microbulles de gaz en fonction de la stimulation ultrasonore, plus l'indice mécanique est élevée moins l'oscillation est linéaire jusqu'à ce que la microbulle implose. L'implosion d'une microbulle est un phénomène extrêmement rapide appelé « micro-jet » induisant une très forte libération d'énergie, localement la température peut atteindre 4500K (Didenko *et al.*, 1999; Vinodgopal *et al.*, 2001), on parle de cavitation transitoire. En implosant, la microbulle va venir se projeter contre un support (voir figure 3-4c). Pour de faibles indices mécaniques, l'oscillation de la microbulle est stable et on parle de cavitation stable. Selon le type de cavitation les effets engendrés sont différents, la cavitation transitoire induit des effets thermiques, des effets sur le stress oxydant ainsi que des effets mécaniques puissants (micro-jet) tandis que la cavitation stable n'induit que peu d'effets thermiques et des effets mécaniques modérés (massage cellulaire) (figure 3-1).

5) LES METHODES D'ENCAPSULATION POSSIBLES

En plus de pouvoir se fixer sur une cible spécifique, les ACU sont des agents de contraste ayant potentiellement un rôle bimodal : tout d'abord un rôle en imagerie (échographie) et un rôle en thérapeutique grâce à la possibilité d'encapsuler des molécules d'intérêt comme drogues ou des acides nucléiques. La délivrance de l'agent thérapeutique pourra ainsi être suivie par imagerie. Différentes stratégies d'encapsulation peuvent alors être imaginées, l'agent thérapeutique pourrait être a) inséré dans une goutte d'huile au niveau de l'enveloppe de la microbulle, b) incorporé dans l'enveloppe de la microbulle, c) attaché par liaison électrostatique à l'enveloppe, d) attaché de façon covalente par liaison avidine-biotine (figure 3-5).

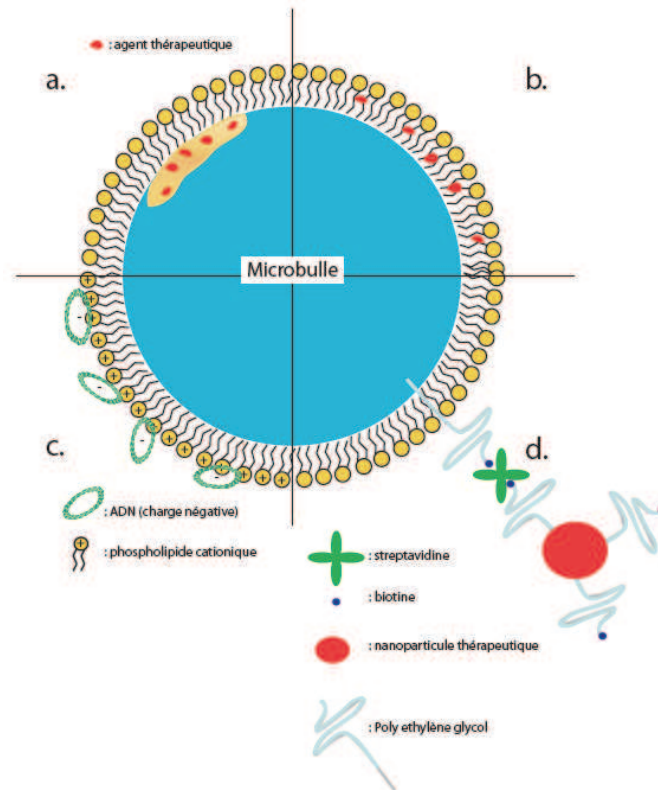


Figure 3-5: Présentation de 4 méthodes possibles d'encapsulation d'agents thérapeutiques. L'agent thérapeutique est: a) dissous dans une goutte d'huile dans la microbulle, b) incorporé dans l'enveloppe, c) lié par des charges électrostatiques à l'enveloppe, d) attaché par des liaisons avidine-biotine dans des nanoparticules.

IV) LA SONOPORATION

1) HISTORIQUE

En 1987, Fechheimer *et al.* ont été les premiers à montrer un transfert de molécule dans une cellule par ultrasons. Les auteurs ont transféré du dextran-FITC de 40kDa dans des cellules HeLa. Ces expériences révèlent que 10% des cellules sont chargées de dextran-FITC après stimulation ultrasonore et que 40% des cellules sont viables (Fechheimer *et al.*, 1987). Plus tard en 1996, Kim *et al.*, sont les premiers à réaliser des expériences de transfert d'ADN plasmidique *in vitro* efficace par ultrasons. Ils ont utilisé l'expression de la β -galactosidase pour évaluer l'efficacité du transfert de gène et ont fait varier certains paramètres ultrasonores tel que la fréquence, la pression acoustique et le temps de stimulation (Kim *et al.*, 1996). Viennent ensuite les travaux de Bao (Bao *et al.*, 1997), de Greenleaf (Greenleaf *et al.*, 1998) et de Miller (Miller *et al.*, 1999) qui ont utilisé des agents de contraste ultrasonore comme vecteurs pour le transfert de gène.

2) METHODE

Il a été montré que le phénomène oscillatoire des microbulles décrit précédemment peut induire une perméabilisation membranaire sous l'effet d'une stimulation ultrasonore particulière et lorsqu'il est proche d'une membrane cellulaire. Cette perméabilisation membranaire transitoire permet l'entrée de molécules dans la cellule. Il faut distinguer deux types de transfert de molécules, le transfert des petites molécules et le transfert de grosses molécules.

1. TRANSFERT DE PETITES MOLECULES

Il semble bien admis que le transfert de petites molécules par sonoporation implique la formation de pores membranaires. L'entrée de la molécule à transférer se fait principalement par un phénomène de diffusion passive.

La taille des molécules transférée par sonoporation a été évaluée dans différentes études. Mehier-Humbert *et al.* ont montrés l'incorporation de nanosphères fluorescentes de 44nm dans des cellules MAT B III par cytométrie en flux après sonoporation (Mehier-Humbert *et al.*, 2005).

Récemment, les travaux de Meijering *et al.* sur la localisation de dextran de différentes tailles ont donné des résultats plus convaincants. Une localisation cellulaire taille dépendante des dextran-FITC a été observée après sonoporation. Les molécules de dextran de 4,4kDa sont retrouvées dans le cytoplasme et dans le noyau après 30 secondes de stimulation ultrasonore en présence de microbulles de gaz. Alors que les dextran-FITC de 70kDa sont cependant retrouvés uniquement dans le cytosol tandis que les dextran-FITC de 150 et 500kDa ne sont visibles que sous forme d'amas suggérant une accumulation dans des vésicules (Meijering *et al.*, 2009). Ces résultats montrent que l'entrée de molécules par sonoporation peut se faire de façon directe jusqu'à 70kDa. Une étude valide d'une autre façon ce phénomène de diffusion. Une diminution de l'intensité de fluorescence de cellules HeLa exprimant de façon stable l'eGFP après sonoporation a été observée (Kaddur *et al.*, 2010) impliquant une sortie de l'eGFP (27kDa). Ces résultats vont également dans le sens de la formation de pores membranaires transitoires par sonoporation.

Des études récentes ont montré une inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses en les perméabilisant par sonoporation afin de faciliter l'entrée des agents anticancéreux tels que la bléomycine, la doxorubicine ou le melphalan *in vitro* (Yoshida *et al.*, 2007) et *in vivo* (Iwanaga *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2011). La présence de microbulles est essentielle pour le transfert de ces molécules. En effet, aucune différence significative de prolifération cellulaire n'a été observée *in vitro* après stimulation ultrasonore de bléomycine par rapport à l'utilisation de la bléomycine seule (Iwanaga *et al.*, 2007). Pour limiter les effets secondaires *in vivo* et la dispersion des microbulles, l'injection des microbulles et de la drogue est réalisée directement dans la tumeur, ce type d'injection est difficilement applicable aux tumeurs profondes.

Afin de palier à ce problème, Lentacker *et al.* proposent de nouvelles entités composées de i) liposomes pegylés substitués par de la biotine dans lesquels la doxorubicine est encapsulée; ii) et de microbulles de gaz possédant également à leur surface des groupements PEG-biotine. L'ajout d'un groupement avidine permet ensuite de lier les deux structures présentant la biotine (microbulle et liposome) (Lentacker *et al.*, 2010). Les résultats montrent que l'utilisation de ces entités en présence d'ultrasons (1 MHz, 50% duty cycle, 2W/cm², 15 secondes) permet une amélioration de l'efficacité de toxicité d'au moins 2 fois des liposomes contenant la doxorubicine. Malgré ces résultats encourageants, ces structures sont trop complexes pour une exploitation aisée.

2. TRANSFERT DE GROSSES MOLECULES

C'est en 1997 que la première expérience de transfert de gène par ultrasons et microbulles de gaz a été réalisée, les auteurs y montrent l'importance des microbulles de gaz dans l'efficacité de transfert de gène (Bao *et al.*, 1997). Les microbulles de gaz sont indispensables à l'efficacité de transfert de gène à faible intensité ultrasonore. En effet, le transfert de gène observé à l'aide d'ultrasons sans microbulles de gaz s'est avéré très faible. De plus, des intensités ultrasonores plus importantes sont requises pour atteindre une bonne efficacité. Toutefois, le milieu soumis à ces intensités ultrasonores subit des modifications, les gaz dissous forment des bulles par cavitation acoustique ce qui peut entraîner un effet cytotoxique. La présence de microbulles de gaz dans le milieu permet donc de diminuer le seuil d'activation des microbulles puisque celles-ci ont été

introduites dans le milieu. Bien que ce phénomène ne soit observé que pour les régimes de MI élevé, le « micro-jet » est très efficace pour perforer la membrane cellulaire et ainsi permettre un transfert de molécules (Postema *et al.*, 2005; Prentice *et al.*, 2005). Cependant, une étude prouve que la formation de « micro-jet » n'est pas le phénomène majoritaire dans la sonoporation (Postema & Gilja, 2010) et n'a jamais été observé pour des valeurs de MI faibles (Postema *et al.*, 2005). En effet, les études de transfert de gène par sonoporation ont été effectuées le plus souvent avec des MI considérés comme faibles de l'ordre de 0,3. D'autres théories sont apparues pour démontrer la formation de pore membranaire sans « jetting ». La figure 3-6 présente de façon théorique les différents moyens d'obtenir un pore membranaire par sonoporation (Postema *et al.*, 2011).

Les mécanismes cellulaires de la sonoporation sont encore méconnus et plusieurs théories ont été émises. La première hypothèse avancée dans le mécanisme de sonoporation a été la formation de pores membranaire par lesquels les molécules à transférer transitent. Mehier-Humbert *et al.* ont estimé par microscopie électronique que le diamètre des pores induit par sonoporation est de l'ordre de 100nm (figure 3-6), aucun pore n'a été observé en absence de microbulles de gaz (Mehier-Humbert *et al.*, 2005). Ils ont également observé que les cellules étaient plus lisses et plus petites après sonoporation. Cependant, la formation des pores par sonoporation est un phénomène transitoire qui doit être difficile à observer, la visualisation de ces pores peut donc être un phénomène minoritaire correspondant aux effets cytotoxiques de la sonoporation (pore permanent). Les pores impliqués lors du processus de sonoporation sont probablement plus petits. Il est à noter qu'un ADN plasmidique non condensé de 5000pb mesurerait plus d'un micron. Cette information montre que l'implication directe des pores dans le transfert de gène ou de molécules de grosse taille (au dessus de 150kDa) est peu probable étant donné la taille et la durée d'ouverture du pore.

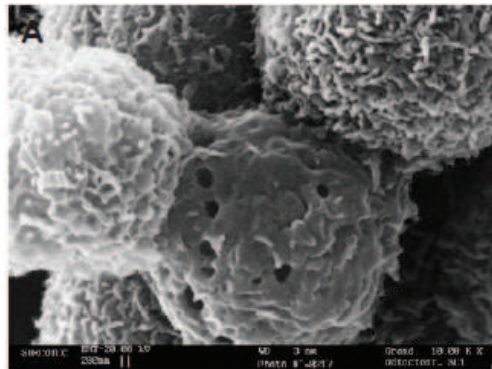


Figure 3-6. Observation en microscopie électronique de pores membranaires sur des cellules MAT B III après sonoporation à 570kPa à une fréquence de 2.25MHz (MI=0,38). Tiré de (Mehier-Humbert et al., 2005).

Récemment, une étude a montré l'importance de l'endocytose dans le phénomène de sonoporation. Meijering *et al.* ont montré l'influence de la taille de la molécule sur le transfert de celle-ci par sonoporation. Les auteurs ont observé qu'une diminution de l'entrée de dextran-FITC en fonction de leur taille a été obtenue en présence d'inhibiteurs d'endocytose. Ils en concluent que les molécules de petite taille (<70kDa) semblent entrer majoritairement par des pores tandis que les molécules de plus grande taille (>70kDa) entreraient majoritairement par endocytose (les trois voies seraient impliquées). Cette endocytose serait dépendante de la formation des pores membranaires. La présence des pores entraîne une entrée de calcium dans la cellule favorisant l'endocytose (Eliasson *et al.*, 1996; MacDonald *et al.*, 2005).

3) INTERACTION CELLULES-MICROBULLES ET ULTRASONS

Les microbulles de gaz sous l'effet des ultrasons vont induire un phénomène de massage cellulaire (van Wamel *et al.*, 2004), ces événements ont été enregistrés à l'aide d'une caméra ultra rapide permettant de capturer jusqu'à 1 million d'images par seconde (figure 3-7). Ce massage cellulaire va avoir pour effet de stimuler mécaniquement la membrane plasmique. Pour de plus fortes amplitudes ultrasonores, les microbulles vont former des micro-jets.

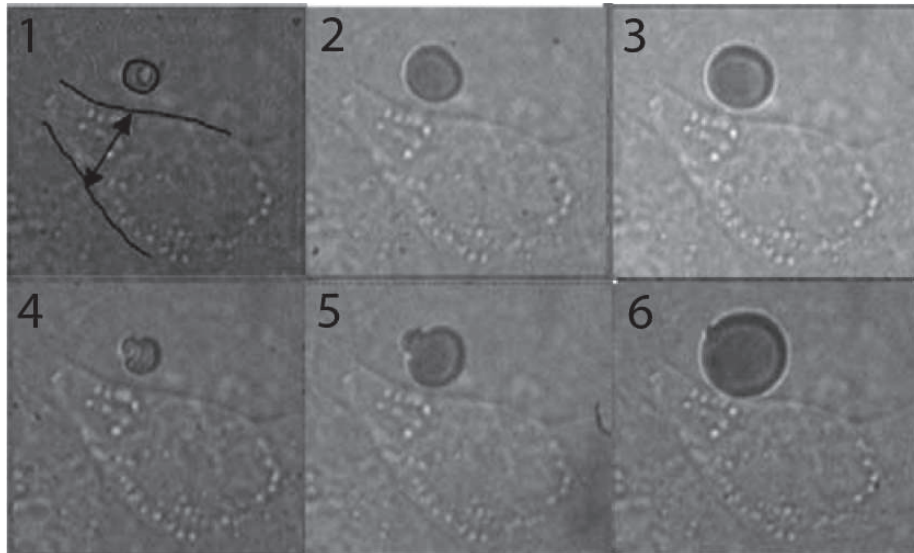


Figure 3-7. Sélection d'images successives illustrant une cinétique d'interaction entre une microbulle de gaz et une cellule. L'oscillation de la microbulle à proximité de la cellule induit un phénomène de « massage cellulaire » (van Wamel *et al.*, 2004).

La figure 3-8 résume de façon non exclusive et exhaustive les différentes façons dont les microbulles peuvent interagir avec les cellules en présence d'ultrasons.

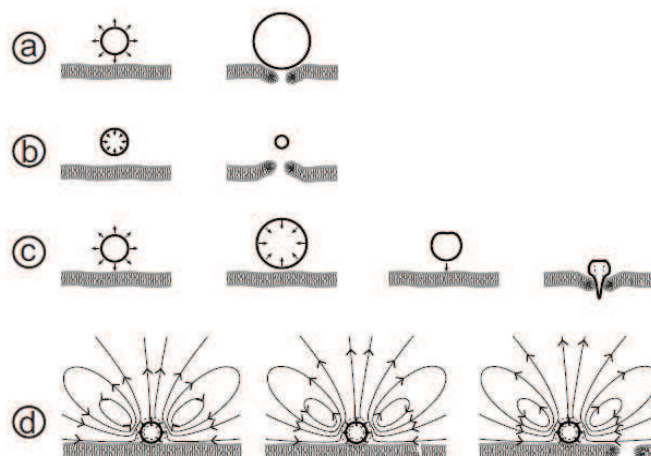


Figure 3-8. Mécanismes possibles de la sonoporation : a) poussée, b) étirement, c) jetting, d) forces de cisaillement. Tiré de (Postema *et al.*, 2011).

L'oscillation d'une microbulle à proximité d'une cellule va ainsi pouvoir pousser ou tirer la membrane plasmique, ce phénomène est appelé le massage cellulaire. Ceci pourrait avoir pour effet de créer un stress mécanique fragilisant la membrane plasmique et favorisant la création de pores

membranaires. Une seconde interaction possible entre les microbulles de gaz sous ultrasons et les cellules est la formation de micro-jets. Un micro-jet est une microbulle qui se projette très violemment sur une membrane (ou n'importe quel support). L'impact de la microbulle sur la membrane plasmique peut ainsi former des pores membranaires. Le micro-jet n'est observé que pour des régimes acoustiques très élevés. Enfin un troisième type d'interaction correspond aux forces de cisaillement. Ces forces sont induites par les flux générés par les oscillations des microbulles. Ces flux entraînent également une fragilisation de la membrane plasmique et un stress mécanique.

4) LE POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE LA SONOPORATION

La sonoporation est donc comme nous l'avons vu une technique dont le potentiel est énorme puisqu'elle permet d'allier une technique d'imagerie (l'échographie) et une technique de délivrance de molécules (la sonoporation). Cette technique est donc bimodale, nous pourrions imaginer de coupler une sonde ultrasonore d'échographie à une sonde ultrasonore thérapeutique. Les applications de cette technique sont le transfert de drogues (comme des anti-cancéreux) et d'acides nucléiques (ADNc, siRNA, oligonucléotides) pour la thérapie génique et la thérapie cellulaire.

L'exploitation de la sonoporation permet d'avoir une délivrance active car elle implique à la fois l'utilisation d'une formulation de microbulles contenant l'actif d'intérêt et une augmentation de la délivrance de celui-ci grâce à l'application ultrasonore.

La sonoporation offre une méthode de choix pour le transfert de gène, le transgène pourrait ainsi être vectorisé sur un agent de contraste ultrasonore ciblé. Cet agent de contraste pourrait être délivré par voie systémique, le tissu à traiter serait imagé par échographie, une modification des paramètres ultrasonores permettrait de délivrer les acides nucléiques qu'il contient et ainsi traiter majoritairement l'organe cible. Il serait intéressant de développer un appareillage capable de délivrer à la fois les deux types d'ultrasons (diagnostics et thérapeutiques).

IV) EFFETS CELLULAIRES DES ULTRASONS

Les ultrasons sont connus pour avoir des effets sur la biologie de la cellule. Précédemment, nous avons vu que les ultrasons ont des effets sur la réparation tissulaire. La physiothérapie ultrasonore induit au niveau de la cellule une transduction du signal mécanique en signal biologique, c'est la mécanotransduction. Ce phénomène implique différents senseurs cellulaires du stress mécanique tel que les canaux ioniques activés par l'étirement membranaire (SAC : stretch activated channel), les molécules du cytosquelette (Orr *et al.*, 2006), les intégrines et les jonctions gap ainsi que les MAPK. La mécano-transduction est cruciale pour la physiologie de différents organes telle que la migration cellulaire (Jaalouk & Lammerding, 2009; Wozniak & Chen, 2009) ainsi que la morphogenèse (Zhang *et al.*, 2011). L'effet des ultrasons sur les cellules peut s'apparenter à des stress mécaniques comme l'étirement ou la pression. Les études sur les voies de mécano-transduction sont nombreuses, elles ne sont pas directement reliées à la stimulation ultrasonore mais des parallèles peuvent être faits. Les études menées sur les forces de cisaillement sont consacrées majoritairement au flux sanguin. Il est intéressant de faire une conversion entre la pression artérielle mesurée dans le corps humain en millimètre de mercure (mmHg) en Pascal. Ainsi, il est nécessaire de convertir la valeur de pression artérielle de 140 mmHg (valeur commune) en unité de pression (Pa) afin de pouvoir comparer les effets, ce qui équivaut à une pression de 20 kPa environ. Cette valeur correspond à environ 10% de l'amplitude ultrasonore utilisée couramment pour la stimulation *in vivo* (Delalande *et al.*, 2010).

Le stress mécanique peut notamment induire :

- l'activation de canaux ioniques sensibles à l'étirement (SAC) et entraîner des modifications physiologiques et électrophysiologiques,
- la stimulation des intégrines et des connexines situées sur la membrane plasmique et le déclenchement de la voie des MAPK et FAK,
- des modifications de la concentration en calcium,
- la stimulation des protéines G.

Cette signalisation cellulaire entraîne différents effets tels que la prolifération cellulaire ou la synthèse de matrice extracellulaire dans les tissus conjonctifs. Les ultrasons sont également connus pour agir sur le cytosquelette et sur le stress oxydant. Tous ces effets sont dépendants des paramètres ultrasonores utilisés. La présence de microbulles peut également modifier les effets cellulaires.

1) PROLIFERATION CELLULAIRE

Doan *et al.* montrent sur des cultures cellulaires d'ostéocytes et de fibroblastes que l'application d'ultrasons accélère la prolifération cellulaire de 40 à 50% en fonction du protocole utilisé (Doan *et al.*, 1999). Une étude récente montre que les ultrasons de faible intensité stimulent la formation de colonies de fibroblastes à partir de cellules souches mésenchymateuses et augmente la prolifération cellulaire de ces fibroblastes (Choi *et al.*, 2011). La majeure partie des études sur les effets des ultrasons portent sur les tissus et cellules conjonctives (fibroblastes, ostéoblastes, chondrocytes). Un travail sur la réparation du tissu nerveux par ultrasons montre également *in vitro* que les ultrasons de faible intensité augmentent la prolifération des cellules de Schwann (Zhang *et al.*, 2009). Les effets sur la prolifération cellulaire s'expliquent par l'activation de voies de survie cellulaire.

2) MAPK ET FAK

Dans les cellules endothéliales bovines, un étirement cellulaire cyclique (≥ 1 Hz) entraîne *via* le cytosquelette une activation des voies MAPK JNK, ERK et p38 (Hsu *et al.*, 2010; Kito *et al.*, 2000). De la même façon, une stimulation ultrasonore induit la stimulation de la voie de signalisation ERK (Extracellular signal-regulated kinase) (Chen *et al.*, 2003). ERK est un membre de la famille des MAPK (mitogen-activated protein kinase) dont la fonction est de médier la transduction d'une stimulation mécanique en signaux intracellulaires permettant de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire (Gebken *et al.*, 1999; Wadhwa *et al.*, 2002). Les ultrasons stimulent également les kinases d'adhésion focale (FAK) entraînant une signalisation *via* la voie Akt (Tang *et al.*, 2006). Les voies de signalisation activées par les ultrasons stimulent la synthèse de matrice extracellulaire ainsi que la prolifération cellulaire.

3) H₂O₂ ET STRESS OXYDANT

La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est la conséquence du phénomène de cavitation, ce phénomène n'est observé que pour des pressions acoustiques élevées. La production de H₂O₂ est dépendante à la fois de la pression acoustique et de la présence de microbulles. Bao *et al.* montrent que la sonoporation induit une production de H₂O₂ de façon significative (environ 100nM) à partir de 400kPa en présence de microbulles de gaz Alunex (Bao *et al.*, 1997). Cette valeur est fortement augmentée à 800kPa (400nM) cependant à 200kPa aucune augmentation n'a été mesurée. Cette production de H₂O₂ reflète les dommages cellulaires engendrés par le processus de sonoporation. Juffermans *et al.* ont également mesuré une augmentation de la production d'H₂O₂ en présence de microbulles après sonoporation. Ils ont en plus mis en évidence un effet de l'H₂O₂ sur l'augmentation de calcium intracellulaire. En présence de catalase qui inhibe la production d'H₂O₂, l'augmentation

de calcium observée après sonoporation est inhibée de 50% (Juffermans *et al.*, 2006). La production d'H₂O₂ et l'augmentation de calcium intracellulaire semblent donc être liées.

4) LA SIGNALISATION CALCIQUE ET LES CANAUX IONIQUES

Les canaux ioniques sont des protéines transmembranaires permettant le passage plus ou moins sélectif d'ions, un canal possède 3 états, ouvert, fermé et inactivé. L'ensemble des canaux ioniques à la surface d'une cellule permet de maintenir le potentiel de membrane de repos de toutes cellules. Une fois le canal ouvert les ions le traverse de façon passive par diffusion. Il existe trois grandes familles de canaux ioniques : les canaux dont l'ouverture est voltage dépendante, les récepteurs-canaux dont l'ouverture est contrôlée par la fixation d'un ligand intra ou extracellulaire et les récepteurs sensibles à des stimuli mécaniques. C'est cette dernière famille de récepteur qui va nous intéresser. Les canaux sensibles aux stimuli mécaniques sont les SAC. Ces canaux ont été tout d'abord découvert sur le muscle squelettique (Guharay & Sachs, 1984) depuis ces canaux ont été mis en évidence dans de nombreux types cellulaires. Ces canaux ont des rôles physiologiques bien distincts tels que la transmission du son dans les cellules de la cochlée (Ohmori, 1984), dans la régulation du volume cellulaire et du pH (Hoffmann *et al.*, 1988), la régulation du flux sanguin (Naruse & Sokabe, 1993), ou encore dans les mécanorécepteurs responsables des sensations tactiles (Boulais *et al.*, 2009). Les SAC sont des canaux calciques, ce qui signifie que seul le calcium peut le traverser de façon passive. La concentration calcique intracellulaire est extrêmement régulée par les pompes à calcium du réticulum endoplasmique et de la membrane plasmique. Au repos, cette concentration est approximativement vingt mille fois plus faible que la concentration extracellulaire ($[Ca^{2+}]_i = 100 \text{ nM}$ contre $[Ca^{2+}]_e = 1,8 \text{ mM}$), l'ouverture d'un canal calcique membranaire induit donc une entrée rapide et massive de calcium dans le compartiment cytosolique. Ce fort gradient de concentration fait du calcium un excellent second messenger. Le calcium joue un rôle pivot dans la biologie de la cellule, il est le régulateur de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Giacomello *et al.*, 2007). La méthode d'investigation des courants ioniques, est le patch clamp en configuration rompu, elle permet de mesurer l'ensemble des courants ioniques de la cellule. Des études électrophysiologiques ont montré que la sonoporation induit une hyperpolarisation réversible et reproductible de la cellule, cette hyperpolarisation est observée uniquement en présence de microbulles (Deng *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2007). Celle-ci semble directement liée à la stimulation mécanique de la membrane plasmique puisqu'une hyperpolarisation comparable a été observée par massage cellulaire à l'aide d'une aiguille (Tran *et al.*, 2007). Cette hyperpolarisation est observée uniquement en présence de calcium extracellulaire (Deng *et al.*, 2004). Le calcium est le second messenger de nombreuses voies de signalisation. La figure 3-7 illustre l'effet de la stimulation ultrasonore sur l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire et ceci uniquement en présence d'ACU à partir d'un MI de 0,1 (Juffermans *et al.*, 2006; Juffermans *et al.*, 2009). Plusieurs autres études ont également démontré ce phénomène (Deng *et al.*, 2004; Fan *et al.*, 2010; Kumon *et al.*, 2009; Kumon *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2011). L'augmentation du calcium intracellulaire peut être amplifiée en activant des canaux calciques sensibles au calcium intracellulaire ou en activant la libération des stocks calcique du réticulum endoplasmique par phénomène de « calcium induced calcium release » (Jaffe, 2007). Deng *et al.* proposent que cette entrée de calcium est la conséquence directe de la formation de pores (Deng *et al.*, 2004). Tran *et al.* discutent un mécanisme différent, le massage cellulaire induit par les microbulles sous ultrasons activerait l'ouverture des SAC entraînant une augmentation de calcium intracellulaire. Ceci a pour conséquence d'activer les canaux potassiques sensibles au calcium intracellulaire BK_{Ca}, ces canaux potassiques induisent une hyperpolarisation en laissant entrer du potassium dans la cellule (Tran *et al.*, 2008). Ces études électrophysiologiques ont été réalisées sur différents types cellulaires : les cardiomyoblastes, les cellules endothéliales du cerveau, les CHO, l'œuf de xénope ou encore une lignée cellulaire du cancer du sein (MDA-MB231). Aucune étude n'a été réalisée sur les ténocytes alors que les fibroblastes (cellules d'origine mésenchymateuse proches des ténocytes) sont connus pour être des cellules senseurs des tensions mécaniques, la transduction de ce signal implique

l'actine et le calcium (Yang & Saif, 2007). Le calcium favorise la fermeture des pores membranaire (Deng *et al.*, 2004). Une augmentation du calcium intracellulaire peut également entraîner une augmentation du phénomène d'endocytose (Eliasson *et al.*, 1996; MacDonald *et al.*, 2005) ce qui est en adéquation avec les résultats obtenus par Meijering *et al.*, 2009.

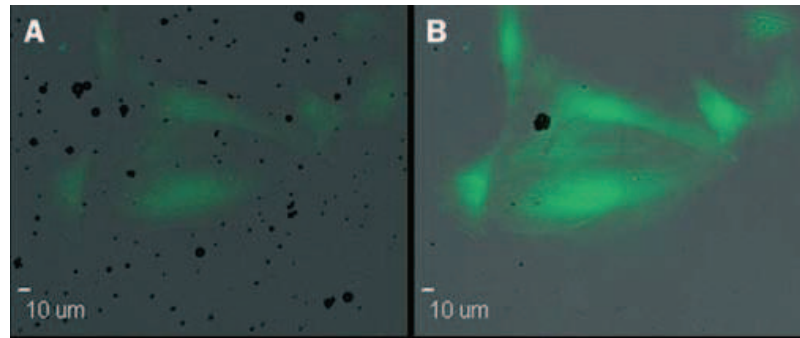


Figure 3-7. Cellules cardiomyoblastiques chargées avec la sonde calcique fluorescente Fluo4 en présence de microbulles. (A) avant stimulation ultrasonore, (B) après stimulation ultrasonore. Les cellules présentent un niveau de fluorescence plus élevé après stimulation ultrasonore. Figure tirée de (Juffermans *et al.*, 2009).

Nous aurons vu au cours de cette introduction la biologie du tendon d'Achille et comment il se comporte après une lésion. Nous avons ensuite vu le potentiel de la thérapie génique ainsi que les différentes méthodes en développement. Nous avons vu enfin en détail une méthode de transfert de gène, la sonoporation, l'effet des ultrasons et des microbulles sur la cellule et sur la biologie du tendon.

L'objectif de ma thèse sera donc de traiter les tendinopathies par transfert de gène, deux méthodes de transfert de gène ont été utilisées : l'utilisation de nanoparticules de silice mésoporeuses et la sonoporation. La sonoporation nous ayant apporté des résultats inattendus (expression stable du transgène durant 4 mois) nous avons ensuite étudié *in vitro* les mécanismes de cette méthode.

VI) REFERENCES

- Alexandrov, A. V., Molina, C. A., Grotta, J. C., Garami, Z., Ford, S. R., Alvarez-Sabin, J., et al. (2004). Ultrasound-enhanced systemic thrombolysis for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 351(21), 2170-2178.
- Anderson, C. R., Rychak, J. J., Backer, M., Backer, J., Ley, K., & Klibanov, A. L. (2010). scVEGF microbubble ultrasound contrast agents: a novel probe for ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis. *Investigative radiology*, 45(10), 579-585.
- Apfel, R. E., & Holland, C. K. (1991). Gauging the likelihood of cavitation from short-pulse, low-duty cycle diagnostic ultrasound. *Ultrasound Med Biol*, 17(2), 179-185.
- Azuma, Y., Ito, M., Harada, Y., Takagi, H., Ohta, T., & Jingushi, S. (2001). Low-intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus. *J Bone Miner Res*, 16(4), 671-680.
- Baker, K. G., Robertson, V. J., & Duck, F. A. (2001). A review of therapeutic ultrasound: biophysical effects. *Phys Ther*, 81(7), 1351-1358.
- Bao, S., Thrall, B. D., & Miller, D. L. (1997). Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 23(6), 953-959.
- Barnett, S. B., Ter Haar, G. R., Ziskin, M. C., Rott, H. D., Duck, F. A., & Maeda, K. (2000). International recommendations and guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound in medicine. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 26(3), 355-366.
- Becker, B. M., Helfrich, S., Baker, E., Lovgren, K., Minugh, P. A., & Machan, J. T. (2005). Ultrasound with topical anesthetic rapidly decreases pain of intravenous cannulation. *Acad Emerg Med*, 12(4), 289-295.
- Blomley, M., Claudon, M., & Cosgrove, D. (2007). WFUMB Safety Symposium on Ultrasound Contrast Agents: clinical applications and safety concerns. *Ultrasound Med Biol*, 33(2), 180-186.
- Bouakaz, A., & de Jong, N. (2007). WFUMB Safety Symposium on Echo-Contrast Agents: nature and types of ultrasound contrast agents. *Ultrasound Med Biol*, 33(2), 187-196.
- Boulais, N., Pennec, J. P., Lebonvallet, N., Pereira, U., Rougier, N., Dorange, G., et al. (2009). Rat Merkel cells are mechanoreceptors and osmoreceptors. *PloS one*, 4(11), e7759.
- British, S. U. M. (2000). *Guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound equipment*.
- Chen, Y. J., Wang, C. J., Yang, K. D., Chang, P. R., Huang, H. C., Huang, Y. T., et al. (2003). Pertussis toxin-sensitive Gα_i protein and ERK-dependent pathways mediate ultrasound promotion of osteogenic transcription in human osteoblasts. *FEBS letters*, 554(1-2), 154-158.
- Choi, W. H., Choi, B. H., Min, B. H., & Park, S. R. (2011). Low-Intensity Ultrasound Increased Colony Forming Unit-Fibroblasts of Mesenchymal Stem Cells During Primary Culture. *Tissue engineering. Part C, Methods*.
- Daffertshofer, M., & Hennerici, M. (2003). Ultrasound in the treatment of ischaemic stroke. *Lancet Neurol*, 2(5), 283-290.
- de Jong, N., Ten Cate, F. J., Lancee, C. T., Roelandt, J. R., & Bom, N. (1991). Principles and recent developments in ultrasound contrast agents. *Ultrasonics*, 29(4), 324-330.
- Delalande, A., Bureau, M. F., Midoux, P., Bouakaz, A., & Pichon, C. (2010). Ultrasound-assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy. *Ultrasonics*, 50(2), 269-272.
- Deng, C. X., Sieling, F., Pan, H., & Cui, J. (2004). Ultrasound-induced cell membrane porosity. *Ultrasound Med Biol*, 30(4), 519-526.
- Didenko, Y. T., McNamara, W. B., & Suslick, K. S. (1999). Hot spot conditions during cavitation in water. *Journal of the American Chemical Society*, 121(24), 5817-5818.
- Doan, N., Reher, P., Meghji, S., & Harris, M. (1999). In vitro effects of therapeutic ultrasound on cell proliferation, protein synthesis, and cytokine production by human fibroblasts, osteoblasts, and monocytes. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 57(4), 409-419.
- Duck, F. A. (1998). Radiation pressure and streaming. In e. Starrit E (Ed.), *Ultrasound in Medicine* (pp. 39–56). Bristol, United Kingdom: Institute of Physics Publishing.
- Eliasson, L., Proks, P., Ammala, C., Ashcroft, F. M., Bokvist, K., Renstrom, E., et al. (1996). Endocytosis of secretory granules in mouse pancreatic beta-cells evoked by transient elevation of cytosolic calcium. *The Journal of physiology*, 493 (Pt 3), 755-767.
- Ellegala, D. B., Leong-Poi, H., Carpenter, J. E., Klibanov, A. L., Kaul, S., Shaffrey, M. E., et al. (2003). Imaging tumor angiogenesis with contrast ultrasound and microbubbles targeted to alpha(v)beta3. *Circulation*, 108(3), 336-341.
- Fan, Z., Kumon, R. E., Park, J., & Deng, C. X. (2010). Intracellular delivery and calcium transients generated in sonoporation facilitated by microbubbles. *J Control Release*.

- Favaro-Pipi, E., Bossini, P., de Oliveira, P., Ribeiro, J. U., Tim, C., Parizotto, N. A., et al. (2010). Low-intensity pulsed ultrasound produced an increase of osteogenic genes expression during the process of bone healing in rats. *Ultrasound Med Biol*, 36(12), 2057-2064.
- Fechheimer, M., Boylan, J. F., Parker, S., Siskin, J. E., Patel, G. L., & Zimmer, S. G. (1987). Transfection of mammalian cells with plasmid DNA by scrape loading and sonication loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84(23), 8463-8467.
- Fellinger, K., & Schmidt, J. (1954). *Klinik and Therapies des Chronischen Elenkreumatismus* (Vol. 3). Vienna, Austria: Maudrich.
- Frinking, P. J., & de Jong, N. (1998). Acoustic modeling of shell-encapsulated gas bubbles. *Ultrasound Med Biol*, 24(4), 523-533.
- Gebken, J., Luders, B., Notbohm, H., Klein, H. H., Brinckmann, J., Muller, P. K., et al. (1999). Hypergravity stimulates collagen synthesis in human osteoblast-like cells: evidence for the involvement of p44/42 MAP-kinases (ERK 1/2). *J Biochem*, 126(4), 676-682.
- Giacomello, M., Drago, I., Pizzo, P., & Pozzan, T. (2007). Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell death and differentiation*, 14(7), 1267-1274.
- Greenleaf, W. J., Bolander, M. E., Sarkar, G., Goldring, M. B., & Greenleaf, J. F. (1998). Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol*, 24(4), 587-595.
- Guharay, F., & Sachs, F. (1984). Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *The Journal of physiology*, 352, 685-701.
- Hilger, I., Rapp, A., Greulich, K. O., & Kaiser, W. A. (2005). Assessment of DNA damage in target tumor cells after thermoablation in mice. *Radiology*, 237(2), 500-506.
- Hoffmann, E. K., Lambert, I. H., & Simonsen, L. O. (1988). Mechanisms in volume regulation in Ehrlich ascites tumor cells. *Renal physiology and biochemistry*, 11(3-5), 221-247.
- Holland, C. K., & Apfel, R. E. (1989). An improved theory for the prediction of microcavitation thresholds. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 36(2), 204-208.
- Hsu, H. J., Lee, C. F., Locke, A., Vanderzyl, S. Q., & Kaunas, R. (2010). Stretch-induced stress fiber remodeling and the activations of JNK and ERK depend on mechanical strain rate, but not FAK. *PloS one*, 5(8), e12470.
- Iwanaga, K., Tominaga, K., Yamamoto, K., Habu, M., Maeda, H., Akifusa, S., et al. (2007). Local delivery system of cytotoxic agents to tumors by focused sonoporation. *Cancer Gene Ther*, 14(4), 354-363.
- Jaalouk, D. E., & Lammerding, J. (2009). Mechanotransduction gone awry. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(1), 63-73.
- Jaffe, L. F. (2007). Stretch-activated calcium channels relay fast calcium waves propagated by calcium-induced calcium influx. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 99(3), 175-184.
- Juffermans, L. J., Dijkmans, P. A., Musters, R. J., Visser, C. A., & Kamp, O. (2006). Transient permeabilization of cell membranes by ultrasound-exposed microbubbles is related to formation of hydrogen peroxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 291(4), H1595-1601.
- Juffermans, L. J., Meijering, D. B., van Wamel, A., Henning, R. H., Kooiman, K., Emmer, M., et al. (2009). Ultrasound and microbubble-targeted delivery of therapeutic compounds: ICIN Report Project 49: Drug and gene delivery through ultrasound and microbubbles. *Neth Heart J*, 17(2), 82-86.
- Kabalinov, A., Klein, D., Pelura, T., Schutt, E., & Weers, J. (1998). Dissolution of multicomponent microbubbles in the bloodstream: 1. Theory. *Ultrasound Med Biol*, 24(5), 739-749.
- Kaddur, K., Lebegue, L., Tranquart, F., Midoux, P., Pichon, C., & Bouakaz, A. (2010). Transient transmembrane release of green fluorescent proteins with sonoporation. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 57(7), 1558-1567.
- Katz, N. P., Shapiro, D. E., Herrmann, T. E., Kost, J., & Custer, L. M. (2004). Rapid onset of cutaneous anesthesia with EMLA cream after pretreatment with a new ultrasound-emitting device. *Anesth Analg*, 98(2), 371-376, table of contents.
- Kennedy, J. E., Ter Haar, G. R., & Cranston, D. (2003). High intensity focused ultrasound: surgery of the future? *The British journal of radiology*, 76(909), 590-599.
- Kim, H. J., Greenleaf, J. F., Kinnick, R. R., Bronk, J. T., & Bolander, M. E. (1996). Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells. *Human Gene Therapy*, 7(11), 1339-1346.
- Kito, H., Chen, E. L., Wang, X., Ikeda, M., Azuma, N., Nakajima, N., et al. (2000). Role of mitogen-activated protein kinases in pulmonary endothelial cells exposed to cyclic strain. *J Appl Physiol*, 89(6), 2391-2400.

- Kumon, R. E., Aehle, M., Sabens, D., Parikh, P., Han, Y. W., Kourennyi, D., et al. (2009). Spatiotemporal effects of sonoporation measured by real-time calcium imaging. *Ultrasound Med Biol*, 35(3), 494-506.
- Kumon, R. E., Aehle, M., Sabens, D., Parikh, P., Kourennyi, D., & Deng, C. X. (2007). Ultrasound-induced calcium oscillations and waves in Chinese hamster ovary cells in the presence of microbubbles. *Biophys J*, 93(6), L29-31.
- Lentacker, I., Geers, B., Demeester, J., De Smedt, S. C., & Sanders, N. N. (2010). Design and evaluation of doxorubicin-containing microbubbles for ultrasound-triggered doxorubicin delivery: cytotoxicity and mechanisms involved. *Mol Ther*, 18(1), 101-108.
- Lindner, J. R., Song, J., Christiansen, J., Klibanov, A. L., Xu, F., & Ley, K. (2001). Ultrasound assessment of inflammation and renal tissue injury with microbubbles targeted to P-selectin. *Circulation*, 104(17), 2107-2112.
- MacDonald, P. E., Eliasson, L., & Rorsman, P. (2005). Calcium increases endocytotic vesicle size and accelerates membrane fission in insulin-secreting INS-1 cells. *Journal of cell science*, 118(Pt 24), 5911-5920.
- Maruani, A., Boucaud, A., Perrodeau, E., Gendre, D., Giraudeau, B., & Machet, L. (2010). Low-frequency ultrasound sonophoresis to increase the efficiency of topical steroids: a pilot randomized study of humans. *Int J Pharm*, 395(1-2), 84-90.
- Matsuo, M., Yamaguchi, K., Feril, L. B., Jr., Endo, H., Ogawa, K., Tachibana, K., et al. (2011). Synergistic inhibition of malignant melanoma proliferation by melphalan combined with ultrasound and microbubbles. *Ultrasonics sonochemistry*.
- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R. H. (2005). Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *J Control Release*, 104(1), 213-222.
- Meijering, B. D., Juffermans, L. J., van Wamel, A., Henning, R. H., Zuhorn, I. S., Emmer, M., et al. (2009). Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res*, 104(5), 679-687.
- Meltzer, R. S., Serruys, P. W., McGhie, J., Verbaan, N., & Roelandt, J. (1980). Pulmonary wedge injections yielding left-sided echocardiographic contrast. *Br Heart J*, 44(4), 390-394.
- Miller, D. L., Bao, S., & Morris, J. E. (1999). Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system. *Ultrasound Med Biol*, 25(1), 143-149.
- Mitragotri, S. (2005). Healing sound: the use of ultrasound in drug delivery and other therapeutic applications. *Nat Rev Drug Discov*, 4(3), 255-260.
- Naruse, K., & Sokabe, M. (1993). Involvement of stretch-activated ion channels in Ca^{2+} mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *The American journal of physiology*, 264(4 Pt 1), C1037-1044.
- Newman, C. M., & Bettinger, T. (2007). Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther*, 14(6), 465-475.
- Ng, C. O., Ng, G. Y., See, E. K., & Leung, M. C. (2003). Therapeutic ultrasound improves strength of achilles tendon repair in rats. *Ultrasound Med Biol*, 29(10), 1501-1506.
- Ng, G. Y., & Fung, D. T. (2007). The effect of therapeutic ultrasound intensity on the ultrastructural morphology of tendon repair. *Ultrasound Med Biol*, 33(11), 1750-1754.
- Ogura, M., Pahwal, S., & Mitragotri, S. (2008). Low-frequency sonophoresis: Current status and future prospects. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(10), 1218-1223.
- Ohmori, H. (1984). Studies of ionic currents in the isolated vestibular hair cell of the chick. *The Journal of physiology*, 350, 561-581.
- Orr, A. W., Helmke, B. P., Blackman, B. R., & Schwartz, M. A. (2006). Mechanisms of mechanotransduction. *Developmental cell*, 10(1), 11-20.
- Orsi, F., Arnone, P., Chen, W., & Zhang, L. (2010). High intensity focused ultrasound ablation: a new therapeutic option for solid tumors. *Journal of cancer research and therapeutics*, 6(4), 414-420.
- Park, J., Fan, Z., & Deng, C. X. (2011). Effects of shear stress cultivation on cell membrane disruption and intracellular calcium concentration in sonoporation of endothelial cells. *Journal of biomechanics*, 44(1), 164-169.
- Postema, M., Gilja, O., & van Wamel, A. (2011). CEUS and sonoporation. In M. Postema (Ed.), *Fundamentals of medical ultrasonics* (pp. 205-217). London: Spon press.
- Postema, M., & Gilja, O. H. (2010). Jetting does not cause sonoporation. *Biomed Eng*, 55(S1), 19-20.
- Postema, M., van Wamel, A., ten Cate, F. J., & de Jong, N. (2005). High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Med Phys*, 32(12), 3707-3711.
- Prentice, P., Cuschierp, A., Dholakia, K., Prausnitz, M., & Campbell, P. (2005). Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation. *Nature Physics*, 1(2), 107-110.

- Skauen, D. M., & Zentner, G. M. (1984). PHONOPHORESIS. *International Journal of Pharmaceutics*, 20(3), 235-245.
- Tang, C. H., Yang, R. S., Huang, T. H., Lu, D. Y., Chuang, W. J., Huang, T. F., et al. (2006). Ultrasound stimulates cyclooxygenase-2 expression and increases bone formation through integrin, focal adhesion kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and Akt pathway in osteoblasts. *Mol Pharmacol*, 69(6), 2047-2057.
- ter Haar, G. (2007). Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*, 93(1-3), 111-129.
- ter Haar, G. (2009). Safety and bio-effects of ultrasound contrast agents. *Med Biol Eng Comput*, 47(8), 893-900.
- Tran, T. A., Le Guennec, J. Y., Bougnoux, P., Tranquart, F., & Bouakaz, A. (2008). Characterization of cell membrane response to ultrasound activated microbubbles. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 55(1), 43-49.
- Tran, T. A., Roger, S., Le Guennec, J. Y., Tranquart, F., & Bouakaz, A. (2007). Effect of ultrasound-activated microbubbles on the cell electrophysiological properties. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 33(1), 158-163.
- Unger, E., Metzger, P., 3rd, Krupinski, E., Baker, M., Hulett, R., Gabaeff, D., et al. (2000). The use of a thrombus-specific ultrasound contrast agent to detect thrombus in arteriovenous fistulae. *Investigative radiology*, 35(1), 86-89.
- Van Liew, H. D., & Burkard, M. E. (1995). Bubbles in circulating blood: stabilization and simulations of cyclic changes of size and content. *J Appl Physiol*, 79(4), 1379-1385.
- van Wamel, A., Bouakaz, A., Versluis, M., & de Jong, N. (2004). Micromanipulation of endothelial cells: ultrasound-microbubble-cell interaction. *Ultrasound Med Biol*, 30(9), 1255-1258.
- Vinodgopal, K., Ashokkumar, M., & Grieser, F. (2001). Sonochemical degradation of a polydisperse nonylphenol ethoxylate in aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry B*, 105(16), 3338-3342.
- Wadhwa, S., Godwin, S. L., Peterson, D. R., Epstein, M. A., Raisz, L. G., & Pilbeam, C. C. (2002). Fluid flow induction of cyclo-oxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Bone Miner Res*, 17(2), 266-274.
- Weller, G. E., Lu, E., Csikari, M. M., Klibanov, A. L., Fischer, D., Wagner, W. R., et al. (2003). Ultrasound imaging of acute cardiac transplant rejection with microbubbles targeted to intercellular adhesion molecule-1. *Circulation*, 108(2), 218-224.
- Wood, R. W., & Loomis, A. L. (1927). The physical and biological effects of high-frequency sound-waves of great intensity. *Philosophical Magazine*, 4(22), 417-436.
- Wozniak, M. A., & Chen, C. S. (2009). Mechanotransduction in development: a growing role for contractility. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(1), 34-43.
- Yang, S., & Saif, M. T. (2007). Force response and actin remodeling (agglomeration) in fibroblasts due to lateral indentation. *Acta biomaterialia*, 3(1), 77-87.
- Yeung, C. K., Guo, X., & Ng, Y. F. (2006). Pulsed ultrasound treatment accelerates the repair of Achilles tendon rupture in rats. *J Orthop Res*, 24(2), 193-201.
- Yoshida, T., Kondo, T., Ogawa, R., Feril, L. B., Jr., Zhao, Q. L., Watanabe, A., et al. (2007). Combination of doxorubicin and low-intensity ultrasound causes a synergistic enhancement in cell killing and an additive enhancement in apoptosis induction in human lymphoma U937 cells. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Zhang, H., Landmann, F., Zahreddine, H., Rodriguez, D., Koch, M., & Labouesse, M. (2011). A tension-induced mechanotransduction pathway promotes epithelial morphogenesis. *Nature*, 471(7336), 99-103.
- Zhang, H., Lin, X., Wan, H., Li, J. H., & Li, J. M. (2009). Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the expression of neurotrophin-3 and brain-derived neurotrophic factor in cultured Schwann cells. *Microsurgery*, 29(6), 479-485.

RESULTATS. PARTIE 1 – TRANSFERT DE GENE PAR DES VECTEURS SYNTHETIQUES DANS LE TENDON D'ACHILLE

Comme nous l'avons précédemment décrit le processus de régénération tendineuse est très lent. La thérapie génique est une technique innovante offrant la possibilité d'accélérer ce processus en transférant des gènes codant des molécules actives dans la réparation. Ceci est réalisable facilement dans la mesure où la plupart des gènes impliqués dans le processus de réparation sont connus. L'avantage du transfert de gène par rapport à l'administration de protéines recombinantes est la production *in situ* et en continu de la molécule thérapeutique. Bien que l'administration de protéines recombinantes a été améliorée grâce à des méthodes d'encapsulation sous forme de nanoparticules ou de gels, le coût de la production et la durée de vie de ces molécules sont des limitations majeures à leur utilisation à grande échelle en clinique.

Dans cette partie, nous mettons en évidence la capacité qu'offrent les des nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN) MCM-41 modifiées à délivrer un gène *in vivo* dans le tendon d'Achille de rat.

Les nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN) sont des structures capables de complexer des molécules d'ADN. Ce type de nanoparticules n'a jamais été utilisé dans des protocoles de thérapie génique sur le tendon.

Malgré leur inefficacité à transfecter des cultures primaires de ténocytes, nous montrons qu'une injection de MSN couplées à un ADN plasmidique (pDNA) codant le gène reporteur de la luciférase, entraîne une expression prolongée de la luciférase qui perdure jusqu'à deux semaines post-injection. A contrario, l'activité luciférase dans des tendons transfectés par un plasmide nu décroît en fonction du temps pour n'être plus que difficilement détectable après 2 semaines. De manière intéressante nous ne détectons aucun signe d'inflammation ou de nécrose dans les tendons, les reins, le cœur et le foie chez les rats traités une fois par semaine et sur un mois et demi, par la formulation ADN/MSN. Les résultats principaux concernent l'accélération de la cicatrisation du tendon d'Achilles par le transfert du gène PDGF-B médié par les MSN. Les propriétés biomécaniques et les analyses histologiques indiquent clairement que les tendons traités par la formulation PDGF/MSN cicatrisent plus rapidement que des tendons non traités ou traités par le gène PDGF seul.

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'un article qui a été publié dans Biomaterials en 2010 : Suwalski, A.*, Dabboue, H.*, Delalande, A., Bensamoun, S. F., Canon, F., Midoux, P., Saillant, G., Klatzmann, D., Salvétat, J. P. and Pichon, C. (2010). Accelerated Achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles. Biomaterials **31** (19) : 5237-45.

* : co-premier auteurs.

PDGF GENE DELIVERY WITH MESOPOROUS SILICA NANOPARTICLES ACCELERATES ACHILLES TENDON HEALING.

Arnaud Suwalski^{*a}, Hinda Dabboue^{*b}, Anthony Delalande^a, Sabine Bensamoun^c, Francis Canon^c, Patrick Midoux^a, Gérard Saillant^d, David Klatzmann^d, Jean-Paul Salvétat^{b,e} and Chantal Pichon^{a,§}

^a Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR4301, Université d'Orléans and Inserm, rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 2, France

^b Centre de Recherche sur la Matière Divisée, CNRS UMR6619 and Université d'Orléans, 45071 Orléans Cedex 2, France

^c Laboratoire de BioMécanique et BioIngénierie, CNRS UMR6600, Centre de Recherche de Royallieu – G311 Université Technologique de Compiègne BP 20529, 60205 Compiègne Cedex, France

^d Laboratoire de biologie et thérapeutique des pathologies immunitaires (Université Pierre et Marie Curie/CNRS UMR 7087), Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, 83 Bd de l'hôpital, 75013 Paris, France

[§] Corresponding author: chantal.pichon@cnrs-orleans.fr

* These authors contributed equally to this work.

Fax number: +33 2 38 63 15 17

ABSTRACT

We report the ability of amino- and carboxyl-modified MCM-41 mesoporous silica nanoparticles (MSN) to deliver gene *in vivo* in rat Achilles tendons. Despite the weak interaction of these surface-modified MSN with plasmid DNA and their inefficiency to transfect cells in culture, we show that the luciferase activity lasted for at least 2 weeks in tendons injected with MSN and a plasmid DNA (pDNA) encoding the luciferase reporter gene. By contrast, in tendons injected with the naked plasmid, the luciferase expression decreased as a function of time and became hardly detectable after 2 weeks. Interestingly, there were neither signs of inflammation nor necrosis in tendon, kidney, heart and liver of mice weekly injected with pDNA/MSN formulation during 1.5 months. Our data concerns the acceleration of Achilles tendons healing by PDGF-B gene (pPDGF) transfer using MSN. Biomechanical properties and histological analyses clearly indicate that pPDGF/MSN treated-tendons healed significantly faster than those treated with naked pPDGF.

KEY WORDS:

silica nanoparticle, MCM-41; gene therapy; growth factor; tendon, non viral gene delivery

1. INTRODUCTION

Tendons have a crucial role in maintaining the body mechanics, as their main function is to connect muscles to bones. They are axial connective tissues that ensure transmission of the traction exerted by muscle to bone resulting in joint movements. Tendons are composed of a few cells and parallel arrays of collagen fibers. Their important mechanical function renders them liable to injury and rupture. In human, Achilles tendon is submitted to forces greater than 6-fold the bodyweight. Consequently, Achilles tendon injuries are one of the most common tendon disorders and concern a great part of population. They can be caused by different origins such as overuse that often occurs in sports, consequence of metabolic disease (gut) or age-related loss of elasticity. Tendon heals spontaneously but its regeneration is very difficult and requires a very long period - several months, even a year - which is physically disabling. Moreover, the return at the initial state of the biomechanical parameters is never reached.

Tendon regeneration proceeds in three stages: an inflammatory phase, a cell proliferation phase and a remodelling phase (Hildebrand *et al.*, 2004; Woo *et al.*, 2000). The inflammatory phase that occurs during the first days after the injury is characterized by fibrin clot formation followed by a mobilization of polymorphonuclear leucocytes as well as other cells involved in the inflammation process. These cells play a part in the cellular debris elimination and secretion of growth factors capable of promoting angiogenesis and tenocytes proliferation. During the proliferation phase, the revascularisation is set up and fibroblasts proliferation makes possible the production of extracellular matrix necessary to fill holes induced by lesions. The remodelling phase can last several months up to years. It is characterized by the reduction in the number of cells and a realignment of the matrix to allow a better response to tensions which the tissue can undergo. Unfortunately, healed tendons have altered biomechanical properties because of an increase of the water content and a decrease of the quantity and quality of collagen. So later, ruptures can occur and sometimes, a reduction in traction force (loading capacity) is observed due to the tendon tendency to form adhesions (Gelberman *et al.*, 1999; Manske, 1988). These last years, surgery, which consists in performing autografts, has been improved. However, non-invasive strategies that allow an acceleration of tendon tissues healing are still of interest and remain to be explored.

The mechanism of tendon remodelling and especially the molecular actors that govern its induction and its regulation are known (Molloy *et al.*, 2003). The process is strongly controlled by growth factors such as bFGF, PDGF and IGF-1 acting at distinct phases of regeneration (Chan *et al.*, 1997; Duffy *et al.*, 1995; Sciore *et al.*, 1998). Indeed, PDGF-BB (Platelet derived Growth Factor) has a mitogenic activity on fibroblasts and stimulates the collagen I synthesis making it a factor of choice to enhance tendon healing. For instance, a treatment of injured Achilles tendons with PDGF-BB recombinant protein had induced a clear improvement of their regeneration (Aspenberg & Virchenko, 2004). However, the chronic character of these pathologies requires repeated injections of a large quantity of recombinant proteins, which is expensive. Moreover, the short lifespan of these molecules makes that only a small quantity is delivered on the target and a large one is disseminated in an uncontrolled way causing adverse effects. Thus, the development of alternative methods that will permit a high *in situ* production of these active molecules, such as gene delivery, is strongly desirable.

Different systems including viral or synthetic vectors can be used to deliver genes into the cells. Viral vectors are the most efficient but still remain less safe than synthetic ones, immunogenic and expensive to produce (Giannoudis *et al.*, 2006). These last years, cationic lipids (Montier *et al.*, 2008), polymers (Midoux *et al.*, 2009), carbon nanotubes (Son *et al.*, 2007) and silica nanospheres (Slowing *et al.*, 2008) that form electrostatic complexes with a plasmid DNA (pDNA) have been extensively exploited as chemical vectors for delivering genes. Several studies have reported the use of nanoparticles as drug or gene delivery systems with a low toxicity, improved body distribution, high

biocompatibility and improved efficacy (Chung *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2003; Kneuer *et al.*, 2000; Slowing *et al.*, 2008; Vallet-Regi, 2006).

MCM-41 mesoporous silicas are inorganic materials that have a porous structure with hundreds of empty channels (mesopores) able to adsorb or encapsulate relatively large amounts of bioactive molecules. They have high surface area ($>900\text{m}^2/\text{g}$), a large pore volume ($>0.9\text{ cm}^3/\text{g}$) and pore size around 2 to 6 nm. Mesoporous silica nanoparticles (MSN) have been used as *in vitro* DNA vectors (Slowing *et al.*, 2008).

Here, we have used MSN to transfect *in vivo* rat Achilles tendon. For this purpose, MSN surface was modified with amino or carboxyl groups.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURES

2.1. MATERIALS

3-aminopropyltriethoxysilane (APTES, 99 %, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), toluene (for HPLC, 99.8 %, Carlo Erba, Val de reuil, France), succinic anhydride (99 %, Aldrich), anhydrous dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and absolute ethanol (99.7 %, Carlo Erba) were used as received. *p*-formaldehyde, glutaraldehyde, potassium hexacyanoferrate (III) and lead citrate were obtained from Sigma. Osmium tetroxide was purchased from Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA).

2.2. PLASMIDS

pNFCMV-luc was a homemade plasmid DNA of 7.5 kb that encodes the firefly luciferase gene under control of the strong cytomegalovirus (CMV) promoter. Five consecutive κB motifs (termed NF) that recognize the NF κB transcription factor have been inserted upstream of the promoter. pPDGF plasmid (pBLAST-PDGF-B, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) encodes the human PDGF-B gene under the ubiquitous EF1 strong promoter. Note that human and rat PDGF-B share more than 90 % of identity. Supercoiled pDNA was isolated from bacteria by the standard alkaline lysis method, and purification was carried out with the QIAGEN Mega Kit (QIAGEN, Courtabœuf, France).

2.3. SURFACE MODIFICATION OF MESOPOROUS SILICA NANOPARTICLES

MCM-41 type MSN was synthesized as described by Lelong *et al.* (Lelong *et al.*, 2008). The silica surface was substituted with amino groups by reaction at room temperature for 12 h of 73 mg of MSN with 2.5 mL of 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) in anhydrous toluene. Then, amine-functionalized mesoporous silica materials (MSN-NH₂) were filtered, washed with toluene and dried at 60°C for 12 h under vacuum. MSN-COOH particles were prepared as follows. Firstly, 40 mg of MSN-NH₂ were added to 20 mL of toluene and the solution was kept at 50°C until solubilisation. Then, 150 mg of succinic anhydride was allowed to react overnight at room temperature. MSN-COOH particles were separated from the reaction medium by filtration, washed several times with toluene and ethanol and then vacuum-dried. The different MSN were characterized by Fourier transform infrared (FTIR) and zeta potential measurements.

2.4. FTIR EXPERIMENT

FTIR spectra were collected on a Nicolet 710 FT-IR spectrophotometer with a resolution of 8 cm^{-1} by using the KBr method.

2.5. ZETA POTENTIAL MEASUREMENT

Measurements were carried out by electrophoretic mobility using a Zeta Sizer 3000 (Malvern Instruments, Orsay, France). The system was calibrated with the DTS 5050 standard beads from Malvern. Measurements were done 5 times with the zero field correction and performed in 10 mM

Hepes buffer, pH 7.4, with the following parameters: viscosity, 0.891 cP, dielectric constant, 79, temperature, 25°C, $F(Ka)$, 1.50 (Smoluchowsky), maximum voltage was 15 V. The zeta potential was calculated using the Smoluchowsky approximation, model Z (Malvern Instrument, Worcestershire, England).

2.6. pDNA/MSN FORMULATIONS

MSN nanoparticles at 10 mg/mL in distilled water were sonicated for 30 min before use. They were then added to 150 mM NaCl aqueous solution containing pDNA, and the mixture was kept for 30 min at room temperature before transfection. pDNA/MSN formulations (50 μ L final volume) were prepared at different weight ratios (μ g/ μ g) from 2: 0.6 to 2: 5. Formulations were freshly prepared before use.

2.7. TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY ANALYSIS

pDNA/MSN formulations were dropped onto the 400 mesh carbon surface of electron microscopy copper grids. After 2 min, the grids were stained for 1 min with 5% uranyl acetate and 0.4 % lead citrate and blotted dry. Samples were analysed using a transmission microscope CM20 (Philips) at 200 kV operating voltage.

2.8. ATOMIC FORCE MICROSCOPY (AFM)

The morphology of the pDNA/MSN was analysed by atomic force microscopy (Molecular Imaging Pico +). The samples were prepared by mixing 0.1 μ g of pDNA with various amounts of MSN. After 30 min incubation, samples were dropped on freshly cleaved mica surface and allowed to interact for 5 min and then blotted dry.

2.9. AGAROSE GEL ELECTROPHORESIS

MSN were mixed with pDNA at indicated weight ratio in 50 μ L of 10mM Hepes, pH 7.4. pDNA/MSN or pDNA alone were run on 0.8% agarose gel containing 0.6% ethidium bromide for 3h at 80 V. Images were taken using a UV transilluminator (Geneflash, Syngene Bio Imaging).

2.10. PRIMARY CULTURE OF TENOCYTES

Tenocytes were obtained from adult Achilles tendon explants. Adult Wistar rats (average weight of 250g, from Etablissement Dupré (Saint-Doulchard, France) were sacrificed and their tendons were harvested and cut in small pieces in Hank's Buffered Salt Solution pH 7.5 (HBSS). Then, small tendon pieces were placed in tenocytes' medium (DMEM 1% glutamate, 10% Fetal Calf Serum, 50mg/L ascorbic acid, 250U/ml penicillin, 250U/ml streptomycin, 0.2% fungizone) and cultured at 37°C under humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 10 days, first primary cells sprout out from the explants. They were harvested with trypsin, reseeded in 75 cm² flask and maintained in tenocytes' medium. Half of the medium volume was replaced every two days.

2.11. *IN VITRO* TRANSFECTION

Two days before experiment, tenocytes were seeded at 2×10^5 cells on 2 cm² well. Then, tenocytes were transfected with 2.5 μ g pNFCMV-luc mixed with MSN as described above. After 4 h, the medium was removed and cells were cultured for two days in tenocytes' medium. The transfection efficiency was determined by measuring the luciferase activity in cell lysates as follows. The culture medium was removed and cells were lysed on ice during 10 min in lysis buffer (1% Triton X-100, 25mM Tris-phosphate, 1mM DTT, 1mM EDTA, 15% glycerol, 1M MgCl₂, pH 7.8). *In vitro* luciferase substrate (beetle luciferin, Promega, Madison USA) was added to lysate supernatant in the presence of 1mM ATP. The Relative Light Units (RLU) produced was measured with a luminometer (Lumat LB9507, Berthold, Thoiry, France) and expressed as RLU per mg of proteins upon protein quantification using the BCA colorimetric assay.

2.12. *IN VIVO* TRANSFECTION

Adult Wistar rats were stored in CBM's animal house at 22°C and feed *ad libitum* for at least one week before experiments. Rats were anesthetized either with a mixture of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) in 0.9% NaCl by intraperitoneal injection or by isoflurane gaz system (Aerrane, Baxter, Maurepas, France). Rats' posterior legs were washed with Vétédine® (Centravet, Alfort, France) and shaved. Skin was incised on few millimeters in Achilles tendon region with a carbon steel surgical blade n°11 (Swann-Morton). Achilles tendon was then harmed along its total length three times using a carbon steel surgical blade n°12 (Swann-Morton). Fifty µL of pDNA/MSN containing 20 µg of pDNA were slowly injected in the middle section of Achilles tendon using a Hamilton PBS600 repeater delivery system (5 µL dose per injection). Finally, skin was sutured and rats were closely observed until their wake up. After surgery, animals were treated with subcutaneous injection of fynadine (250µl/kg) to relieve animals' pain.

The transfection efficiency of pNFCMV-luc treated rats was determined by measuring the luciferase activity in tendon as follows. Rats were euthanized by lethal CO₂ inhalation at day 1, 4, 6, 10 and 15 after surgery. Achilles tendons were harvested and maintained in PBS on ice. Tendons were crushed in liquid nitrogen with mortar and pestle. The powder was added in ice-cold lysis buffer (Luciferase Cell Culture Lysis, Promega, Madison USA) and the mixture was kept for 3 h on ice before luminescence measurement. The Relative Light Units (RLU) was measured with a luminometer after adding luciferase substrate (Luciferase Assay System, Promega, Madison, USA) to tendon lysates and expressed as RLU per mg of proteins.

2.13. *IN VIVO* TOXICITY ASSESSMENT

Experiments were carried out with 5 rats per group. Each group received a weekly injection during 6 weeks. The first group was injected with saline solution (150 mM NaCl), the second one with 50 µg MSN and the third one with 20 µg pDNA mixed with 50 µg MSN. Transfected rats were euthanized by lethal CO₂ inhalation. Liver, spleen, kidneys, tendons, and mesenteric lymph nodes were harvested and fixed in 10% *p*-formaldehyde at room temperature. Then organs were embedded in paraffin wax (Tissue Tek, Sakura Bayer Diagnostics), sliced in serial sections and stained with HES (hematoxyline eosine safranin) (Tissue Tek) and toxicity analyses were performed by Novaxia (St Laurent Nouan, France). Each slide was inspected microscopically by a pathologist to search for any evidence of damage such as adhesions, necrosis, cellular infiltration or hypervascularity.

2.14 BIOMECHANICAL TESTS

Control and transfected rats were euthanized by lethal CO₂ inhalation at indicated times. Achilles tendons were harvested and stored in PBS at -20°C before use. They were carefully dissected and cleaned to remove muscle tissues. The tendon extremities were glued with cellulose polyacetate and care was taken to prevent gel spreading over the tendon. Then the tendon was clamped between two metal jaws covered with rubber, and mounted vertically on a conventional mechanical test machine (MTS synergie 400). To strengthen the interface between the sample and the jaw, the tendon was surrounded with a piece of rubber. The tendon was preloaded with a velocity of 0.6 mm/min until the applied force reaches 0.1 N. The length (L₀) between both extremities of the tendon was measured and the tendon was preconditioned by a cyclic loading, stretching the tendon to 110% L₀ with a velocity of 0.6mm/min. After pre-conditioning, specimens were stretched to failure at the same rate and the force to failure was recorded. The maximal stress (Max. stress) was measured by the force divided by the tendon surface. In addition the Young's modulus (*E*) were also determined.

After mechanical tests, the tendons were fixed in fresh BOUIN's picroformol solution for up to 48h. Thereafter, tendons were embedded in paraffin and cross sections of 5 µm thickness were cut and stained with Van Gieson's trichrome. The surface of each tendon was manually evaluated from

tendon sections mounted on glass slides and analysed by optical microscope using QWIN Leica software. The stress was the force divided by the tendon surface. The following parameters were also measured: Young's modulus (E), maximal stress (Max. stress) and strain at failure (Max. strain).

2.15. HISTOLOGICAL ANALYSIS

To assess the healing effect of PDGF-B gene transfer, control and injured tendons were harvested at indicated times. They were fixed in 10% *p*-formaldehyde solution, paraffin embedded, sliced in serial sections (thickness: 4 μm), mounted on glass slides and counterstained with HES stain. Experiments were carried out and analysed by InCellArt (Nantes, France).

2.16. STATISTICAL ANALYSIS

Data were expressed by mean $\pm$ SD. Statistical differences were analyzed by a unilateral Mann–Whitney U -test using XLStat 2007 software, and significance was defined as p -value <0.05 .

3. RESULTS

3.1. MSN SURFACE MODIFICATIONS

MCM-41 mesoporous silica nanoparticles (MSN) were functionalised with amino or carboxyl groups as described in **Figure 1**. The global charges of MSN and modified MSN were assessed by measuring their zeta potential at different steps of functionalization procedure (Table I). Untreated MSN carried a net negative charge of -38.5 mV due to the ionisation of the surface hydroxyl groups. In contrast, the amine modified ones (MSN-NH₂) had a net positive surface charge of 18 mV as a consequence of the presence of amino groups on their surface. MSN-COOH exhibited a negative zeta potential of -49.6 mV resulting from the carboxyl groups created by reaction of amine groups of MSN-NH₂ with succinic acid molecules.

Silica surface modification was also monitored systematically through the different stages by FTIR spectroscopy (**Figure 2**). The unmodified MSN showed the typical vibration bands of siliceous materials, such as that of asymmetric stretching Si-O-Si at ca. 1085 cm^{-1} , symmetric stretching Si-O-Si at ca. 800 cm^{-1} , and stretching vibrations of Si-OH groups at ca. 960 cm^{-1} . (Bands located at 1630 and 3430 cm^{-1} come from adsorbed water.) The grafting of APTES in MSN-NH₂ samples was confirmed by the presence of adsorption bands at ca. 2900 cm^{-1} attributed to C-H stretching vibrations from propyl groups, and a broad band near 3300 cm^{-1} due to N-H stretching. After reaction with succinic anhydride, amide II band emerges near 1450 cm^{-1} , and amide I band increases intensity and width of 1650 cm^{-1} peak.

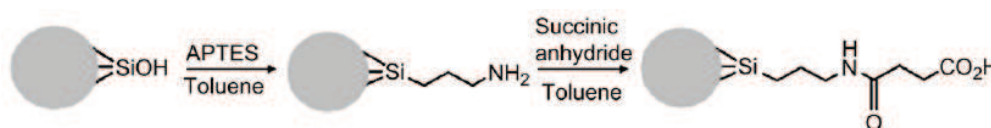


Fig. 1. Functionalization scheme of MCM-41. APTES: 3-aminopropyltriethoxysilane.

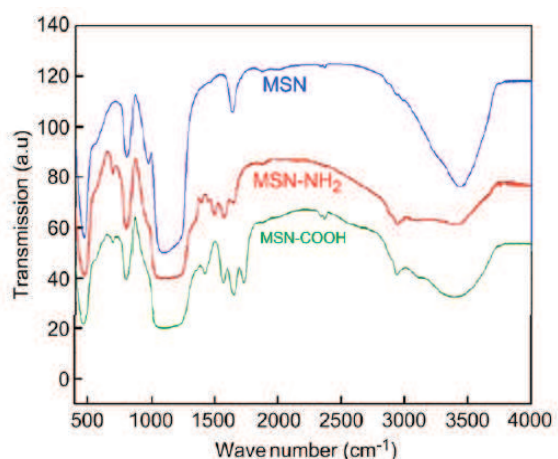


Fig. 2. Fourier-transform IR (FTIR) absorbance spectra of MSN and modified MSN.

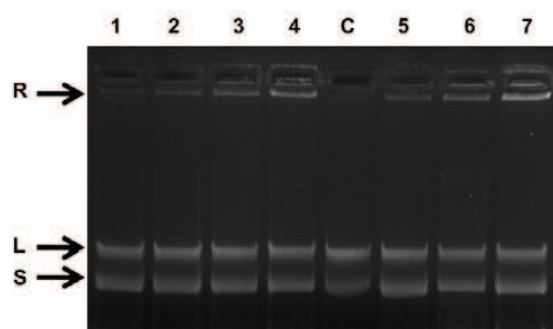


Fig. 3. pDNA/MSN interactions MSN-COOH and MSN-NH₂ were mixed with pDNA at a pDNA/MSN weight ratio ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$) of 2/0.6 (line 1), 2/1.25 (line 2 & 5), 2/2.5 (lines 3 & 6) and 2/5 (lines 4 & 7). Line C corresponds to pDNA alone. Agarose gel electrophoresis was carried out and DNA was revealed by Ethidium Bromide fluorescence upon DNA intercalation. Arrow: retarded DNA.

3.2. INTERACTIONS BETWEEN DNA AND SILICA NANOPARTICLES

MSN-NH₂ and MSN-COOH were mixed with a pDNA at various weight ratio and their interactions were investigated by zeta potential measurements and agarose gel electrophoresis. When mixed with pDNA, the global charge of MSN-NH₂ became negative (from +17.9 mV to -33.4 mV). This result suggests that the amino charges of MSN-NH₂ interacted electrostatically with the phosphate groups of pDNA (Table 1). In the case of MSN-COOH, the zeta potential in the presence of pDNA remained negative (-35.2 mV). Since, the number of amino groups of MSN-COOH was low compared to MSN-NH₂, pDNA was not expected to interact strongly with MSN *via* electrostatic interactions (Table 1). The interactions were also analysed by agarose gel electrophoresis (**Figure 3**). Whatever the amount of the two MSN types, the migration of pDNA was not completely retarded indicating that the interaction strength was weak. Only one part of pDNA was completely retarded with both MSN types and the amount increased with the pDNA/MSN weight ratio suggesting the presence of some pDNA/MSN complexes. Note that in the presence of MSN up to 100 μg , MSN/DNA interactions were not improved (not shown). TEM and AFM observations were performed to assess MSN/DNA association (**Figure 4**). TEM micrographs of silica nanoplexes made with the two types of MSN showed that nanoparticles are surrounded by loose strands of DNA. TEM and AFM showed, however, that a significant amount of DNA remains unbounded.

Table 1
Zeta-potential values of MSN and pDNA/MSN.

Zeta potential (mV)		
Materials	Without pDNA	With pDNA
MSN	-38,5	—
MSN-NH ₂	+17,9	-33,4
MSN-COOH	-49,6	-35,2

Zeta potential measurements of amino- or carboxy-modified MCN-41 silica particles before and after mixing with pDNA. All measurements were performed in 10 mM Hepes buffer, pH 7.4.

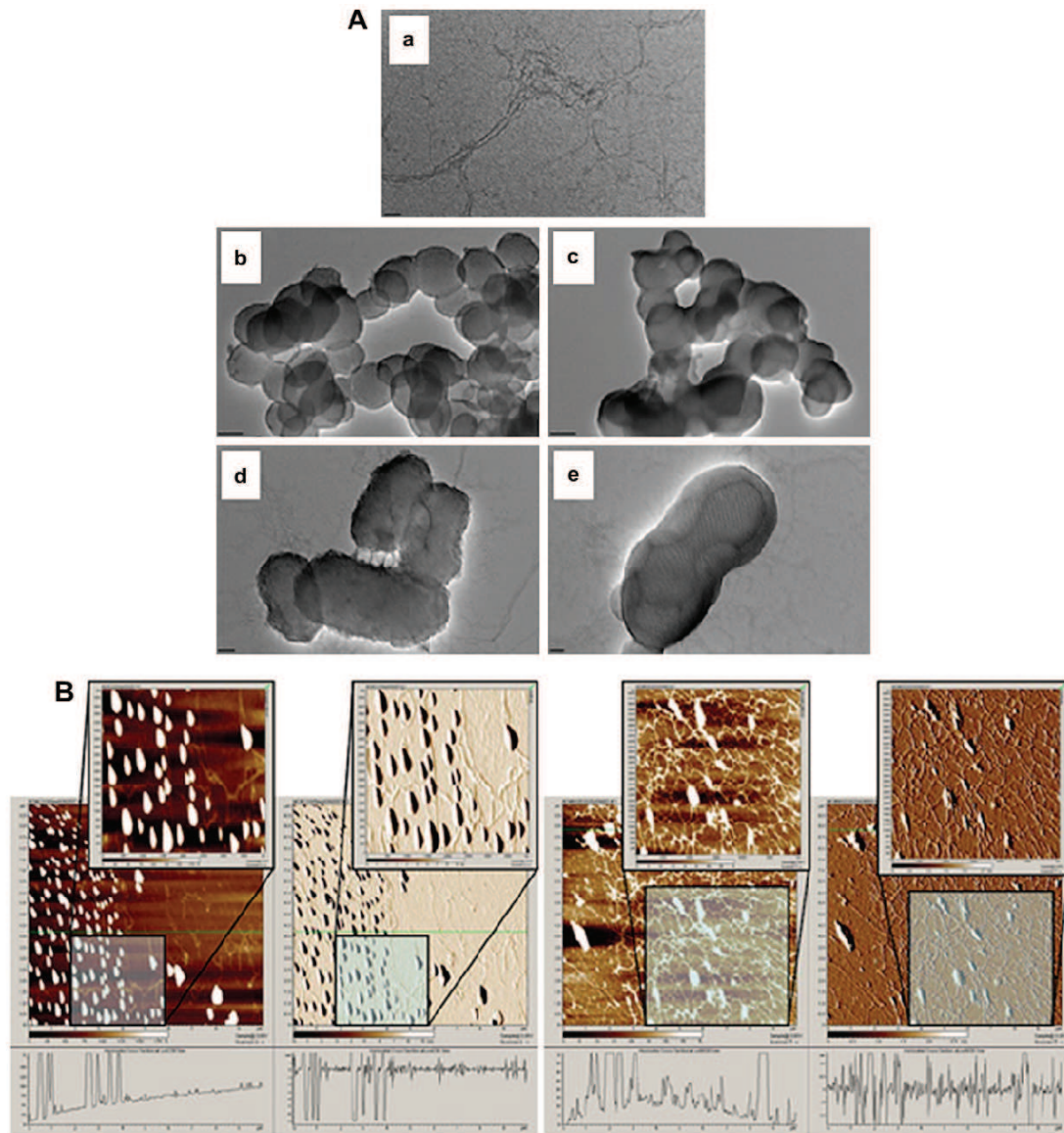


Fig. 4. TEM and AFM analyses. A. Representative Transmission Electron microscopy images of naked plasmid DNA (a), MSN-NH₂ (b), MSN-COOH (c), pDNA/MSN-NH₂ (d), pDNA/MSN-COOH (e). B. Intermittent mode AFM images of nanoplexes deposited on mica surface by blotting. Left: DNA/MSN-COOH 2:2.5 Right DNA/MSN-NH₂ 2:5. Images suggest that most nanoparticles are linked to DNA. When MSN were not mixed to DNA they did not bind to the mica surface, which confirms the attractive interaction between MSN and DNA.

According to agarose gel electrophoresis, TEM and AFM observations, pDNA was found to interact weakly with two types of MSN. It seems that the nature of the charge or functional group carried by MSN did not influence their capacity to interact with pDNA. The data suggest that pDNA may enwrap MSN *via* surface adsorption with some strand inserted inside pores. Indeed, MSN has a honeycomb-like structure with mesopores large enough to absorb a high amount of biomolecules (Chung *et al.*, 2007). The 3 nm pore size of our MSN is compatible with the diameter of a double stranded DNA molecule.

3.3. *IN VITRO* TRANSFECTION EFFICIENCY OF TENOCYTES

In vitro transfection efficiency of primary tenocytes was evaluated with a plasmid DNA (pDNA) encoding luciferase reporter gene (p-Luc) in the presence of various amount of MSN-NH₂ or MSN-COOH nanoparticles and Jet-PEITM was used as gold standard transfection reagent (Figure 5). The transfection efficiency with MSN-NH₂ and MSN-COOH at pDNA/MSN weight ratio of 2:5 and 2:10 was very low and similar to that obtained with naked pLuc. Comparatively, the luciferase activity

produced with Jet-PEI™ polyplexes was 100-fold higher than with bare pDNA. We found that these two types of MSN/pDNA formulations were also unable to transfect other cell types including human embryonic kidney (HEK293) cells, knowing to be easily transfected by most of transfection reagents (not shown). This absence of efficacy on cultured cells may be due to the weak interactions of pDNA with both MSN. It is known that pDNA compaction is usually required to avoid its degradation by serum nucleases in culture medium and to enhance its cellular uptake. Moreover, the negative zeta potential of pDNA/MSN probably did not favour their internalization by the cells. Indeed, when the tenocytes were incubated with MSN formulated with fluorescein-labelled pDNA, flow cytometry analysis showed that there was no difference between the cell-associated fluorescence intensities measured after 4°C and 37°C incubation (not shown). Accordingly with the above data, this result evidenced a very low pDNA uptake by tenocytes, and therefore it is not surprising that transfection was not efficient.

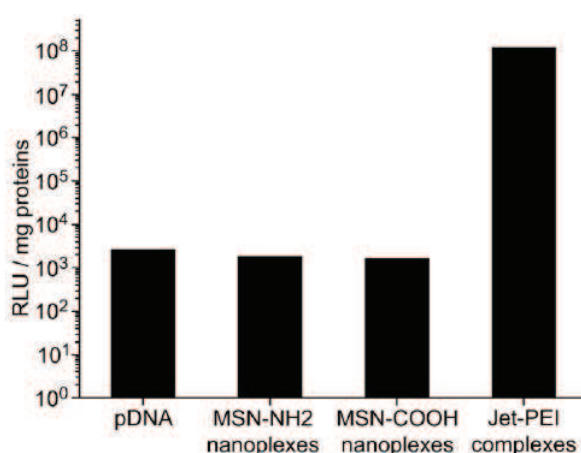


Fig. 5. *In vitro* transfection. Tenocytes were transfected with 5 µg of pDNA encoding luciferase gene (pLuc) alone or formulated with MSN-NH₂, MSN-COOH or Jet-PEI™. The luciferase activity (RLU/mg of proteins) was measured two days after transfection.

3.4. ACHILLES TENDONS TRANSFECTION

In spite of the absence of transfection of primary tenocytes, we tested the efficiency of these pDNA/MSN upon direct injection in rat Achilles tendons. In the first set of experiments, tendons were transfected with pLuc, and 3 days post-transfection the luciferase activity was evaluated. Surprisingly, the two MSN types were able to transfect efficiently tendons at a pLuc/MSN weight ratio of 2:2.5 (**Figure 6**). The efficacy at a pLuc/MSN weight ratio of 2:5 was not significantly different (not shown). It is worth to note that similar transfection efficacy was obtained on injured or healthy tendons (not shown). Although MSN-NH₂ was as efficient as MSN-COOH, we decided to use the latter because we thought that anionic silica nanoparticles will be less toxic than the amino ones and would lead to a better clearance. Indeed, it is known that positive charged particles could be stuck within negatively charged extracellular matrix components. Next, dose response experiments were carried out with 2.5, 5, 10 and 20 µg of pLuc formulated with MSN-COOH in tendons. **Figure 7** indicates that the gene expression was dependent on pLuc dose and a plateau was reached at 10 µg pDNA.

The kinetics of gene expression was performed with 20 µg pDNA (**Figure 8**). One day post-transfection, the luciferase activity obtained from lysates of tendons transfected with pLuc/MSN-COOH was not significantly different to that obtained with pLuc alone (10⁷ RLU/mg of proteins). Then, the luciferase activity decreased by at least 10-fold at day 3 for both conditions. The following days, the luciferase activity of tendons injected with pLuc alone still dropped down and became 5-fold less at day 6 compared to that of tendons injected with pLuc/MSN. This difference was sustained and was even higher (almost 10-fold) after 15 days.

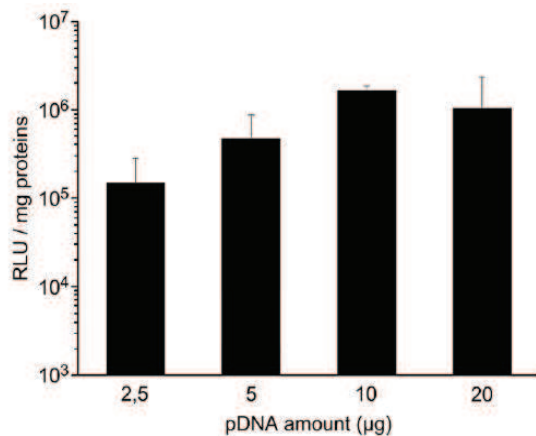


Fig. 6. *In vivo* dose response experiments. Rat Achilles tendon were injected with 2.5, 5, 10 and 20 µg of pDNA encoding luciferase gene mixed with MSN-COOH at weight ratio of 2:5. Rats were killed and tendons were harvested at day 3 post-injection. The luciferase activity (RLU/mg of proteins) was measured as described in Material and Methods. The number of animals per groups was at least $n = 4$. Values were mean $\pm$ SEM.

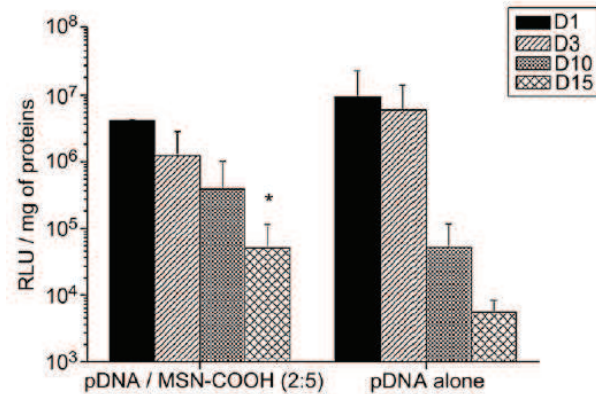


Fig. 7. Kinetics of transgene expression in Achilles tendon. Rat Achilles tendon were injected with 5 µg of pDNA encoding luciferase gene alone or mixed with 6.25 µg of MSN-COOH. Rats were killed and tendons were harvested at days 1, 3, 6 and 15 post-injection. The luciferase activity (RLU/mg of proteins) was measured as described in Material and Methods. The number of animals per groups was $n = 5$. Values were mean $\pm$ SEM. * significant difference ($p < 0.05$) between pDNA/MSN-COOH and pDNA alone.

3.5. MSN TOXICITY

Repeated injections (one per week during 6 weeks) of either free MSN-COOH or pDNA/MSN were done locally in rat Achilles tendons. Rats were checked up every day for close observations, and vital organs (liver, spleen, kidney, mesenteric lymph node and lung) as well as tendons were harvested after 6 weeks for histopathological analyses. As shown in **figure 8**, no histopathology changes in terms of inflammation, necrosis or structural tissue organization were observed in vital organs of treated groups *versus* untreated ones. It is worth to note that no signs of inflammation were observed in tendons after 3 days post-injection.

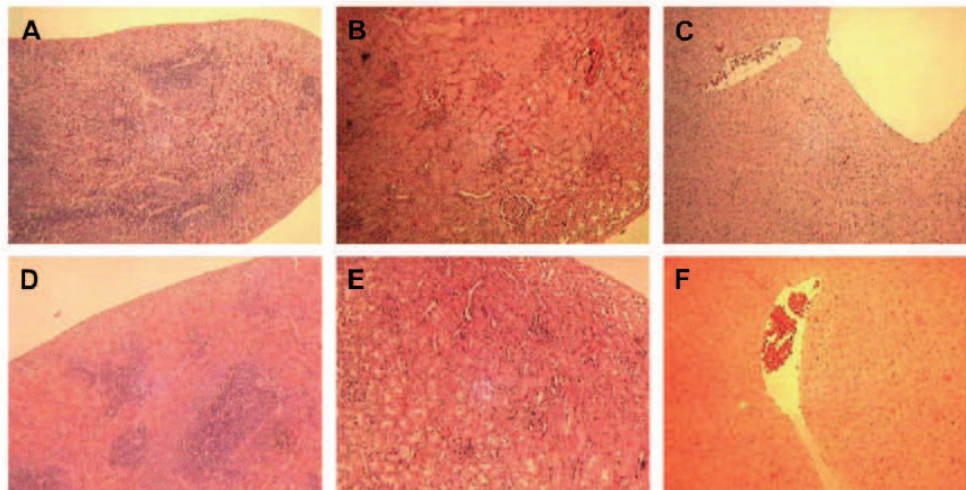


Fig. 8. Toxicity assessment. Shown are representative light micrographs of vital organs of rats treated with or without MSN-COOH/pDNA at weight ratio of 2:5. (A) control kidney, (B) pDNA/MSN-treated kidney, (C) control liver, (D) pDNA/MSN-treated liver, (E) control tendon and (F) pDNA/MSN-treated tendon. Each group received a weekly injection in tendon during 6 weeks before euthanasia. Vital organs were harvested and processed for histology experiments.

3.6. HEALING ACTIVITY OF PDGF GENE TRANSFER

The absence of toxicity upon pDNA/MSN transfection prompted us to evaluate their efficacy to transfer the PDGF-B gene for tendon healing. Rat Achilles tendons were injured and then treated or not with PDGF-B encoded plasmid (pPDGF). In control rats, tendons were injected with physiological serum or with a plasmid encoding luciferase gene. The benefit effect of the treatment was assessed by biomechanical tests and tendon histology. In terms of biomechanical properties, maximal stress or work at maximal load was significantly higher in pPDGF/MSN treated groups than in naked pPDGF treated or untreated groups (Table 2). Remarkably, maximal stress of healthy tendons and

pPDGF/MSN treated ones were not significantly different. By contrast, Young's modulus measuring how well the tissue withstands tension were both also significantly higher in pPDGF/MSN treated tendons than in those treated with naked pPDGF. Again, these parameters were not significantly different between healthy and pPDGF/MSN treated tendons.

Table 2
Biomechanical properties.

Populations	Maximal load (N)	Maximal stress (MPa)	Young's modulus (MPa)
Control (n=11)	31.58 ± 1.89 ^a	29.60 ± 2.54 ^a	96.25 ± 4.19 ^a
pPDGF (n=8)	32.52 ± 2.51 ^{a,b}	31.36 ± 3.84 ^{a,b}	88.79 ± 16.39 ^{a,b}
pPDGF/MSN (n=7)	34.58 ± 2.79 ^{a,b}	26.31 ± 3.63 ^{a,b}	96.57 ± 7.7 ^{a,b}
Untreated (n=12)	24.19 ± 1.96	20.18 ± 2.62	68.15 ± 7.63

Maximal load, maximal stress and Young's modulus obtained with the mechanical tests; control: healthy tendons, pPDGF: injured tendons injected with pPDGF alone, pPDGF/MSN: injured tendons treated with pPDGF/MSN-COOH, Untreated: injured tendons treated with saline. Values are mean ± standard error of the mean (SEM).

^a Significant statistical difference ($p < 0.05$) compared to untreated group.

^b No significant statistical difference compared to healthy group.

To improve the organization of tendon structure, we treated injured tendon with two injections of pPDGF spaced by one-week interval. Histological analyses at 14 and 21 days post-injury showed that a faster regenerating activity occurred in treated tendons than in the untreated groups. This was supported by the following observations: i) a higher number of fibroblasts was observed in untreated tendons than in tendons treated with pPDGF or pPDGF/MSN indicating that untreated tendons were still in proliferative phase after 2 weeks of injury and ii) treated tissues were nicely organized by contrast to those that were mock treated. More importantly, tendons that have been treated with pPDGF/MSN exhibited the highest structural organization with more aligned fibers compared to tendons treated with pPDGF alone.

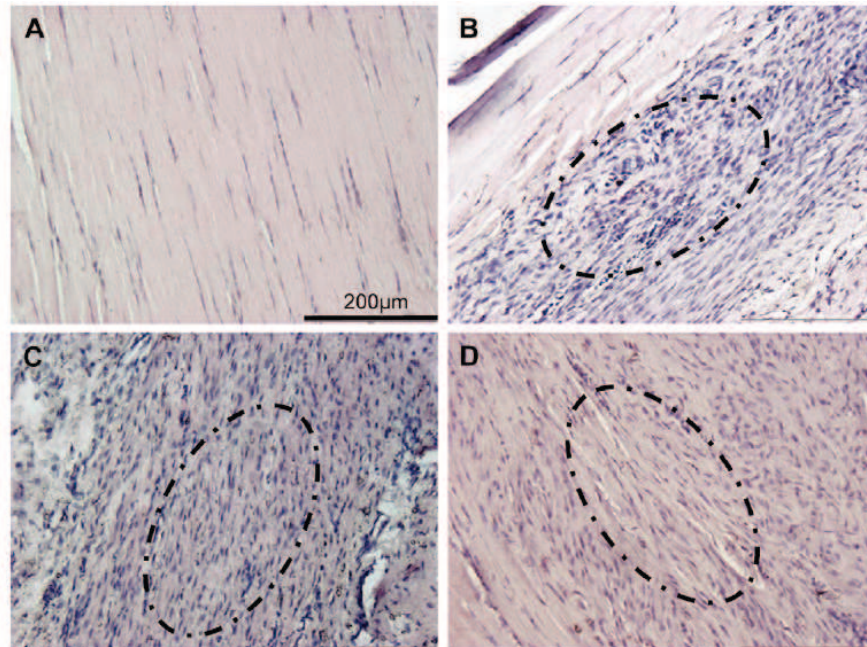


Fig. 9. Histological analyses of pDNA/MSN-treated Achilles tendons. Injured Achilles tendons were treated with pPDGF alone or formulated with MSN-COOH. Twenty days post-treatment healthy and treated tendons were harvested, fixed in 10% *p*-formaldehyde solution, paraffin-embedded, sliced in serial sections (4 μm), mounted on glass slides and HES counterstained. Images shown are representative sections (10 fold magnification) of at least 4 tendons from healthy tendon (A), non-treated tendon (B), pPDGF-treated tendon (C) and pPDGF/MSN-treated tendon (D). The delineated circle corresponds to injury area.

4. DISCUSSION

Several reports have shown that silica nanoparticles can be used as carrier to deliver gene *in vitro* (Slowing *et al.*, 2008). Silica nanoparticles are usually modified by various means to exhibit positive charges providing electrostatic binding with negatively charged DNA. In the present study, we provide evidences that mesoporous silica nanoparticles, substituted either with amino or carboxyl groups, can be used *in vivo* for gene delivery in rat Achilles tendons despite being inefficient *in vitro* on tenocytes.

Both MSN-NH₂/DNA and MSN-COOH/DNA nanoplexes exhibited a negative zeta potential of about -35 mV at pH=7.4. This suggests that direct electrostatic interaction is not the main driving force for adsorption of pDNA on MSN. It is probable that hydrogen bonding between silanol and phosphate groups plays an important role in pDNA-MSN interaction (Mao *et al.*, 1993; Murashov & Leszczynski, 1999). Our results could also suggest that segments of pDNA were inserted inside MSN pores. In the case of MSN-NH₂, a propyl group was used as spacer between the surface of MSN and the amino group. This was also the spacer used to prepare ORMOSIL amino silica nanoparticles (Roy *et al.*, 2005). In this case, pDNA/ORMOSIL interactions were also weak. Indeed, pDNA was not completely retarded under agarose gel electrophoresis. The propyl length may be too short to allow strong electrostatic interactions with pDNA due to screening effects. Conversely, it has been shown that a complete pDNA complexation can be obtained at a pDNA/MSN weight ratio of 1/5 (µg:µg) when a hexyl-amino-propyl spacer was used (Ravi Kumar *et al.*, 2004) as well as when MSN was capped with polyamidoamine dendrimer (Radu *et al.*, 2004). The absence of strong interactions between MSN and pDNA as well as the negative zeta potential of pDNA/MSN explain the absence of efficient transfection of cultured tenocytes as well as other cell lines *in vitro*. This result is coherent with previous reports clearly indicating that for *in vitro* transfection, positive complexes are required to get enhanced interactions with plasma membrane and high enough protection against extracellular degradation. In the case of silica nanoparticles Kneuer *et al.* (Kneuer *et al.*, 2000) have shown that a high weight ratio of silica pDNA/nanoparticles (1/30) was needed to get positive charged nanoplexes efficient for *in vitro* transfection. The use of such large amount of silica nanoparticles could induce biological side effects (see below) (Chang *et al.*, 2007). Of interest, our MSN are able to transfer gene efficiently *in vivo* in tendons. Such behavior has also been found for amphiphilic block copolymers such as Lutrol or Pluronic that are not efficient *in vitro* whereas they show high efficacy in skeletal muscle upon intramuscular injection or in lung upon intratracheal instillation (Bello-Roufai *et al.*, 2007; Desigaux *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2005). In our case, no transfection was observed upon intramuscular injection of pDNA/MSN formulations (supplementary data). The probable explanation could be that pDNA/MSN were able to diffuse upon injection in tendons allowing the transfection of a large area whilst they stuck at the site of injection and did not diffuse at all upon intramuscular injection (Pichon *et al.*, unpublished observations).

Our outstanding data concerns the acceleration of the regeneration activity by PDGF gene transfer with MSN. Tendons are viscoelastic tissues and therefore their internal organization mainly based on collagen I is crucial (Kirkendall & Garrett, 1997; Oxlund, 1986). In rat Achilles tenocytes, Wang *et al.* have shown that *in vitro* transfection of PDGF-B gene promotes a positive effect on collagen I production (Wang *et al.*, 2004). Note that the level of luciferase produced in tendons upon transfection was close to the active dose of recombinant PDGF-BB (related to the nanogram range). Our data clearly show a fast recovery of biomechanical property of pPDGF/MSN treated tendons which is sustained by a remarkable tissue organization. The structural organization of fibers was aligned along with the functional loading axis in pPDGF/MSN treated groups. By contrast, naked pPDGF treated tendons still exhibited areas of more disorganized collagen, i.e., collagen fibers diverging from the functional axis.

The adverse biological effects of nanomaterials such as silica nanoparticles raise safety concerns on their use. Several reports have assessed the biological side effects that could induce silica

nanoparticles. They have shown that silica nanoparticles can induce inflammatory (NF κ B activation) and oxidative stress responses both *in vivo* and *in vitro* (Kaewamatawong *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2008; Sayes *et al.*, 2007) but these effects were only observed at high concentrations (Chang *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007). Recent studies have demonstrated by comet assay that silica nanoparticles with size ranging from 20 to 400 nm, do not exert significant genotoxicity (Chang *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2007). The toxicity of our pDNA/MSN was addressed by investigating the chronic effect they could induce. Gross observations of tendon and histological analyses indicated that no local inflammation or necrosis was induced after several injections. Note that no acute inflammatory process was observed after one or 3 days post-injection (not shown). We are, however, conscious that before human application, a battery of standardized tests to quantify genetic aberrations must be performed to cover all potential forms of DNA damage that may be induced following the local injection of silica nanoparticles in Achilles tendons.

CONCLUSIONS

Results reported in this study clearly demonstrate that mesoporous silica nanoparticules can be exploited to efficiently deliver genes in Achilles tendons. The delivery of pDNA with MSN allows a sustained gene expression for at least 2 weeks. Our remarkable result concerns the improvement of healing of injured tendons by PDGF gene transfer. Nevertheless, co-transfection with other genes encoding factors involved in healing will be addressed to restore a tendon structure as aligned as in healthy tendons.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by AFM (Association Française contre les Myopathies) and French National Research Agency (ANR) Project Bionanocomp ANR-05-BLAN-0164.

The authors would like to acknowledge Fabienne Warmont, Loïc Lebegue and Cristine Gonçalves for their skilful technical help.

REFERENCES

- Aspenberg, P., & Virchenko, O. (2004). Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand*, 75(1), 93-99.
- Bello-Roufai, M., Lambert, O., & Pitard, B. (2007). Relationships between the physicochemical properties of an amphiphilic triblock copolymers/DNA complexes and their intramuscular transfection efficiency. *Nucleic Acids Res*, 35(3), 728-739.
- Chan, B. P., Chan, K. M., Maffulli, N., Webb, S., & Lee, K. K. (1997). Effect of basic fibroblast growth factor. An in vitro study of tendon healing. *Clin Orthop Relat Res*(342), 239-247.
- Chang, J. S., Chang, K. L., Hwang, D. F., & Kong, Z. L. (2007). In vitro cytotoxicity of silica nanoparticles at high concentrations strongly depends on the metabolic activity type of the cell line. *Environ Sci Technol*, 41(6), 2064-2068.
- Chung, T. H., Wu, S. H., Yao, M., Lu, C. W., Lin, Y. S., Hung, Y., et al. (2007). The effect of surface charge on the uptake and biological function of mesoporous silica nanoparticles in 3T3-L1 cells and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 28(19), 2959-2966.
- Desigaux, L., Gourden, C., Bello-Roufai, M., Richard, P., Oudrhiri, N., Lehn, P., et al. (2005). Nonionic amphiphilic block copolymers promote gene transfer to the lung. *Hum Gene Ther*, 16(7), 821-829.
- Duffy, F. J., Jr., Seiler, J. G., Gelberman, R. H., & Hergueter, C. A. (1995). Growth factors and canine flexor tendon healing: initial studies in uninjured and repair models. *J Hand Surg Am*, 20(4), 645-649.
- Gelberman, R. H., Boyer, M. I., Brodt, M. D., Winters, S. C., & Silva, M. J. (1999). The effect of gap formation at the repair site on the strength and excursion of intrasynovial flexor tendons. An experimental study on the early stages of tendon-healing in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 81(7), 975-982.
- Giannoudis, P. V., Tzioupis, C. C., & Tsiridis, E. (2006). Gene therapy in orthopaedics. *Injury*, 37 Suppl 1, S30-40.
- Hildebrand, K. A., Frank, C. B., & Hart, D. A. (2004). Gene intervention in ligament and tendon: current status, challenges, future directions. *Gene Ther*, 11(4), 368-378.
- Jin, Y., Kannan, S., Wu, M., & Zhao, J. X. (2007). Toxicity of luminescent silica nanoparticles to living cells. *Chem Res Toxicol*, 20(8), 1126-1133.
- Kaewamatawong, T., Shimada, A., Okajima, M., Inoue, H., Morita, T., Inoue, K., et al. (2006). Acute and subacute pulmonary toxicity of low dose of ultrafine colloidal silica particles in mice after intratracheal instillation. *Toxicol Pathol*, 34(7), 958-965.
- Kim, S. Y., Lee, Y. M., Baik, D. J., & Kang, J. S. (2003). Toxic characteristics of methoxy poly(ethylene glycol)/poly(epsilon-caprolactone) nanospheres; in vitro and in vivo studies in the normal mice. *Biomaterials*, 24(1), 55-63.
- Kirkendall, D. T., & Garrett, W. E. (1997). Function and biomechanics of tendons. *Scand J Med Sci Sports*, 7(2), 62-66.
- Kneuer, C., Sameti, M., Bakowsky, U., Schiestel, T., Schirra, H., Schmidt, H., et al. (2000). A nonviral DNA delivery system based on surface modified silica-nanoparticles can efficiently transfect cells in vitro. *Bioconjug Chem*, 11(6), 926-932.
- Lelong, G., Bhattacharyya, S., Kline, S., Cacciaguerra, T., Gonzalez, M. A., & Saboungi, M. L. (2008). Effect of surfactant concentration on the morphology and texture of MCM-41 materials. *Journal of Physical Chemistry C*, 112(29), 10674-10680.
- Lin, W., Huang, Y. W., Zhou, X. D., & Ma, Y. (2006). In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 217(3), 252-259.
- Manske, P. R. (1988). Flexor tendon healing. *J Hand Surg Br*, 13(3), 237-245.
- Mao, Y., Daniel, L. N., Whittaker, N., & Saffiotti, U. (1993, Aug 30-Sep 02). *DNA-BINDING TO CRYSTALLINE SILICA CHARACTERIZED BY FOURIER-TRANSFORM INFRARED-SPECTROSCOPY*. Paper presented at the Oxygen Radicals and Lung Injury Conference, Morgantown, Wv.
- Midoux, P., Pichon, C., Yaouanc, J. J., & Jaffres, P. A. (2009). Chemical vectors for gene delivery: a current review on polymers, peptides and lipids containing histidine or imidazole as nucleic acids carriers. *Br J Pharmacol*, 157(2), 166-178.
- Molloy, T., Wang, Y., & Murrell, G. (2003). The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33(5), 381-394.
- Montier, T., Benvegna, T., Jaffres, P. A., Yaouanc, J. J., & Lehn, P. (2008). Progress in cationic lipid-mediated gene transfection: a series of bio-inspired lipids as an example. *Curr Gene Ther*, 8(5), 296-312.
- Murashov, V. V., & Leszczynski, J. (1999). Adsorption of the phosphate groups on silica hydroxyls: An ab initio study. *Journal of Physical Chemistry A*, 103(9), 1228-1238.

- Oxlund, H. (1986). Relationships between the biomechanical properties, composition and molecular structure of connective tissues. *Connect Tissue Res*, 15(1-2), 65-72.
- Park, E. J., Choi, J., Park, Y. K., & Park, K. (2008). Oxidative stress induced by cerium oxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicology*, 245(1-2), 90-100.
- Radu, D. R., Lai, C. Y., Jeftinija, K., Rowe, E. W., Jeftinija, S., & Lin, V. S. (2004). A polyamidoamine dendrimer-capped mesoporous silica nanosphere-based gene transfection reagent. *J Am Chem Soc*, 126(41), 13216-13217.
- Ravi Kumar, M. N., Sameti, M., Mohapatra, S. S., Kong, X., Lockey, R. F., Bakowsky, U., et al. (2004). Cationic silica nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency in vitro and in vivo. *J Nanosci Nanotechnol*, 4(7), 876-881.
- Richard, P., Bossard, F., Desigaux, L., Lanctin, C., Bello-Roufai, M., & Pitard, B. (2005). Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum Gene Ther*, 16(11), 1318-1324.
- Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Bharali, D. J., Pudavar, H. E., Mistretta, R. A., Kaur, N., et al. (2005). Optical tracking of organically modified silica nanoparticles as DNA carriers: a nonviral, nanomedicine approach for gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(2), 279-284.
- Sayes, C. M., Reed, K. L., & Warheit, D. B. (2007). Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci*, 97(1), 163-180.
- Sciore, P., Boykiw, R., & Hart, D. A. (1998). Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of mRNA for growth factors and growth factor receptors from normal and healing rabbit medial collateral ligament tissue. *J Orthop Res*, 16(4), 429-437.
- Slowing, II, Vivero-Escoto, J. L., Wu, C. W., & Lin, V. S. (2008). Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Adv Drug Deliv Rev*, 60(11), 1278-1288.
- Son, S. J., Bai, X., & Lee, S. B. (2007). Inorganic hollow nanoparticles and nanotubes in nanomedicine Part 1. Drug/gene delivery applications. *Drug Discov Today*, 12(15-16), 650-656.
- Vallet-Regi, M. (2006). Ordered mesoporous materials in the context of drug delivery systems and bone tissue engineering. *Chemistry*, 12(23), 5934-5943.
- Wang, X. T., Liu, P. Y., & Tang, J. B. (2004). Tendon healing in vitro: genetic modification of tenocytes with exogenous PDGF gene and promotion of collagen gene expression. *J Hand Surg [Am]*, 29(5), 884-890.
- Woo, S. L., Debski, R. E., Zeminski, J., Abramowitch, S. D., Saw, S. S., & Fenwick, J. A. (2000). Injury and repair of ligaments and tendons. *Annu Rev Biomed Eng*, 2, 83-118.

RESULTATS. PARTIE 2 – TRANSFERT DE GENE PAR SONOPORATION *IN VIVO*, APPLICATION AU TENDON D'ACHILLE

Les tendons, ligaments et autres tissus conjonctifs sont continuellement soumis à des charges mécaniques de façon physiologique. Les cellules des tissus conjonctifs peuvent détecter et répondre à ces stimuli par de nombreuses voies mettant en jeu les canaux ioniques activés par l'étirement, les canaux calciques, les jonctions gap, les récepteurs purinergiques, les interactions intégrines-matrice extracellulaire et le cytosquelette. Comme mentionné précédemment, les ultrasons sont couramment utilisés en physiothérapie dans le cadre des lésions du tendon d'Achille. En médecine du sport, l'utilisation des ultrasons thérapeutiques pour traiter les tendinopathies est commune. Cependant, les mécanismes moléculaires mis en jeu sont peu connus. La « force de traction » de tendons d'Achille réparés chirurgicalement a été augmenté après stimulation ultrasonore (Enwemeka, 1989). La force de rupture de tendons d'Achilles de rat après rupture partielle du tendon d'Achille a été améliorée après stimulation ultrasonore (Frieder *et al.*, 1988; Jackson *et al.*, 1991). Un des mécanismes proposé pour ces effets est l'augmentation de la synthèse du collagène et des protéines en général dans les fibroblastes (Ramirez *et al.*, 1997). La méthode de sonoporation étant basée sur l'utilisation d'ultrasons dont les paramètres sont proches de ceux utilisés en physiothérapie, il serait possible de coupler les effets bénéfiques des ultrasons avec une méthode de transfert de gène pour accélérer la réparation tissulaire.

I) MISE AU POINT DE LA SONOPORATION *IN VIVO* DANS LE TENDON D'ACHILLE

1) INTRODUCTION

Dans la partie précédente nous avons travaillé sur la réparation tendineuse d'un modèle de lésion du tendon d'Achille de rat en utilisant des vecteurs synthétiques. Dans cette partie, nous avons mis au point une méthode de transfert de gène dans le tendon d'Achille de souris : la sonoporation. Cette méthode de transfert de gène est à l'heure actuelle peu utilisée. Cependant, les nombreuses possibilités de ciblage et sa simplicité d'utilisation font de la sonoporation une méthode prometteuse. Seulement quelques études de transfert de gène ont été réalisées *in vivo* dans le muscle principalement. De plus l'utilisation des ultrasons apporte un intérêt double, les paramètres ultrasonores utilisés pour la sonoporation sont dans la même gamme d'intensité que ceux utilisés en physiothérapie.

Les vecteurs synthétiques ont montré leur efficacité dans le transfert de gène dans le tendon d'Achille de rat lésé. L'efficacité de transfert de gène reste encore à être améliorée. Nous avons cherché à évaluer la possibilité d'appliquer la sonoporation au tendon d'Achille de souris. Pour cela, nous avons utilisé le plasmide optimisé pNFCMV-LucF+, celui-ci contient un promoteur fort auquel nous avons ajouté en amont 5 séquences consécutives consensus de reconnaissance du facteur de transcription NFκB. Cette optimisation permet d'augmenter par 6 le nombre de copies de plasmides retrouvées dans le noyau. Différents paramètres ultrasonores tels que la pression acoustique, le temps de stimulation ultrasonore, la quantité de microbulles ont été testés. L'efficacité de transfert de gène a été ensuite évaluée par bioluminescence *ex vivo* (à 5 jours après sonoporation) et *in vivo* (pour effectuer une cinétique d'expression). Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Ultrasonics* en 2010.

2) ARTICLE

Delalande A, Bureau MF, Midoux P, Bouakaz A, Pichon C - Ultrasound-assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy. *Ultrasonics*. 2010 Feb;50(2):269-72.

ULTRASOUND ASSISTED MICROBUBBLES GENE TRANSFER IN TENDONS FOR GENE THERAPY

Anthony Delalande^{1,3}, Michel-Francis Bureau², Patrick Midoux¹, Ayache Bouakaz³ and Chantal Pichon¹

1. Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301 CNRS, 45071 Orléans, France;

2. Laboratoire de Pharmacologie Chimique et Génétique - UMR8151CNRS, 75270 Paris, France;

3. INSERM U930 CNRS ERL 3106, Université François-Rabelais Tours, France

Corresponding author: Pichon Chantal, Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301 CNRS, 45071 Orléans, France
Phone number +33 238255595; Fax number +33 238631517; e-mail : chantal.pichon@cnrs-orleans.fr

ABSTRACT

Our study aimed at evaluating the use of ultrasound assisted microbubbles gene transfer in mice Achilles tendons. Using a plasmid encoding luciferase gene, it was found that an efficient and stable gene expression for more than two weeks was obtained when tendons were injected with 10 µg of plasmid in the presence of 5×10^5 BR14 microbubbles with the following acoustic parameters: 1MHz, 200kPa, 40% duty cycle and 10minutes of exposure time. The rate of gene expression was 100-fold higher than that obtained with naked plasmid injected alone without ultrasound or with ultrasound in absence of microbubbles. The long term expression of transgene obtained by ultrasound-assisted microbubble makes it a suitable method for gene therapy in tendons.

KEY WORDS: ultrasound, microbubbles, tendon, gene transfer, gene therapy.

1. INTRODUCTION

Tendons are axial connective tissue that ensures the transmission of the traction exerted by muscle to bone resulting to joint movement. Tissue degeneration is the common clinical feature found in tendon disorders due to tendon injuries caused by their overuse, the loss of elasticity due to ageing or as a consequence of inherited rare connective diseases like Ehlers-Danlos syndrome type III and Marfan syndrome (Callewaert *et al.*, 2008). Spontaneous tendon ruptures occur very often in these patients due to over elasticity of connective tissues. Absence of basal reparative ability and repetitive micro-traumatic processes overwhelm tendon cells to repair the damaged tissue. Tendons heal poorly because of their hypocellularity and hypovascularity (Sharma & Maffulli, 2005; Sharma & Maffulli, 2006). Tendon regeneration is difficult and requires a very long period. Moreover, the return at the initial state of biomechanical parameters is never reached. To date, the mechanism of tendons remodelling is known (Sharma & Maffulli, 2006). This process is controlled by growth factors acting at precise phases of regeneration. The development of non-invasive efficient therapy to enhance tendon regeneration as *in situ* delivery of active molecules by gene therapy could be useful (Evans, 1999; Hildebrand *et al.*, 2004; Majewski *et al.*, 2008; Thomopoulos *et al.*, 2007). Ultrasound that is routinely used for imaging is now exploited for therapeutic applications including drug delivery or gene transfer (Greenleaf *et al.*, 1998; Huber *et al.*, 2003; Newman & Bettinger, 2007; Pichon *et al.*, 2008; ter Haar, 2007; Unger *et al.*, 2002). Activation of microbubbles (MB) under specific ultrasound (US) beams induces a transient cell membrane permeabilization with a process known as sonoporation (Bao *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1999; Taniyama *et al.*, 2002). Physiotherapy ultrasound is used for the acceleration of wound healing and softening of scar tissue (Ng *et al.*, 2003).

The aim of this study is to evaluate ultrasound and microbubbles-mediated gene transfer as an alternative physical method for gene transfer in tendon. In addition to deliver genes that positively affects tendon healing; it will also offer the ultrasound stimulation effect reported as a physical therapy for tendinopathy.

2. EXPERIMENTAL METHODS

2.1. MICROBUBBLES AND ULTRASOUND SET-UP

BR14 microbubbles were generously provided by Bracco (Bracco Research, Geneva, Switzerland). They are composed of perfluorobutan gas encapsulated in a phospholipid shell. BR14 microbubbles have a mean diameter of 2.6 μm . The microbubbles suspension was prepared by injecting sodium chloride (0.9%) on BR14 powder giving approximately 2.10^8 microbubbles per milliliter. The experimental set up for tendon insonation is shown in Figure 1. Ultrasound waves were generated from a 0.5 inches transducer with 1 MHz frequency (IBMF-014, Sofranel, Sartrouville, France). The transducer was driven with an electrical signal generated by an arbitrary waveform generator (Agilent 33220A, Agilent technologies) and amplified with a power amplifier (ADECE, Artannes, France). Pulsed ultrasound (10 kHz) with a duty cycle of 40 % was used in this study. The negative peak acoustic pressures investigated were measured in a separate set-up with a calibrated PVDF needle hydrophone (diameter = 0.2 mm, Precision Acoustics Ltd., Dorchester, United Kingdom).

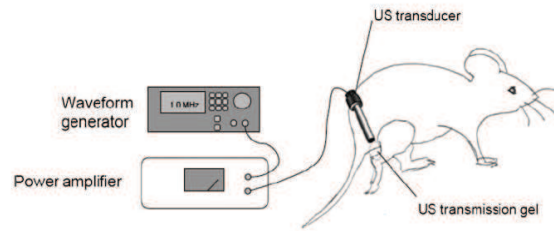


Fig. 1. Diagram of *in vivo* insonation set-up. Achilles tendons were insonified immediately after injection of pLuc alone or mixed with microbubbles. The ultrasound (US) transducer was placed on a layer of ultrasound transmission gel at 3 cm of mouse skin. The probe was connected to waveform generator and a power amplifier.

2.2. ANIMAL STUDIES

The animal study was carried out according to the guidelines of the French Minister of Agriculture for experiments with laboratory animals (law 87848, C. Pichon accreditation). Experiments were done on eight-week-old CD1 mice. They were housed in the animal facility of our institution and cared for in conformity with the guidelines of Ethics Committee. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of Ketamine (125 mg/kg Body Weight) and Xylazine (10 mg/kg Body Weight) solutions. Mice legs were depilated and Achilles tendons were transfected with plasmid DNA encoding luciferase (pLuc) as reporter gene. 10 μ l of plasmid DNA and microbubbles mix was injected in Achilles tendon area with a 29G syringe (Myjector, Terumo); ultrasound stimulation was performed immediately after injection. The transducer was put at the natural focal distance of the mouse skin. Five days after transfection animals were euthanatized and Achilles tendons were harvested, crushed and lysed. Luciferase activity of lysates was measured with a luminometer (Lumat LB9507, Berthold) after addition of luciferin (Luciferase Assay System, Promega, Madison, USA) and expressed as Relative Light Units (RLU). Proteins content of tendons were quantified by BCA reaction.

2.3. IN VIVO BIOLUMINESCENCE IMAGING AND QUANTIFICATION

Bioluminescence imaging was conducted using a cooled CCD camera mounted on a dark box chamber with a camera controller, a camera cooling system and a computer for data acquisition and analysis (Hamamatsu Photonics). Signal intensity was quantified after luciferin injection in the tendon area as the mean of photons per second of time exposure within a region of interest (ROI) prescribed over the tendon.

3. RESULTS

Different ultrasound parameters were tested to determine optimal acoustic settings for tendon gene transfer. The transfection efficiency was evaluated by measuring the luciferase activity per milligram of total protein as read out. In the first set of experiments, the following parameters were fixed: 1 MHz frequency, 40 % duty cycle, 10 μ g plasmid encoding luciferase reporter gene (pLuc) whilst acoustic pressure, number of microbubbles and US exposure time were varied to asses their influence on transfection efficiency.

Acoustic pressure was varied from 150 kPa to 400 kPa and was applied in the presence of 5×10^5 BR14 microbubbles during 2 minutes. The transfection efficiency was evaluated five days post transfection. Figure 2 shows that there is an impact of acoustic pressure on transfection efficiency. At 150 kPa and 200 kPa, the luciferase activity was almost 4-fold more than that obtained with pLuc injected alone (control). This beneficial effect was increased when 400 kPa was used; the efficiency was 11-fold higher in comparison to that of control (2.2×10^5 versus 2.44×10^6 RLU/mg proteins).

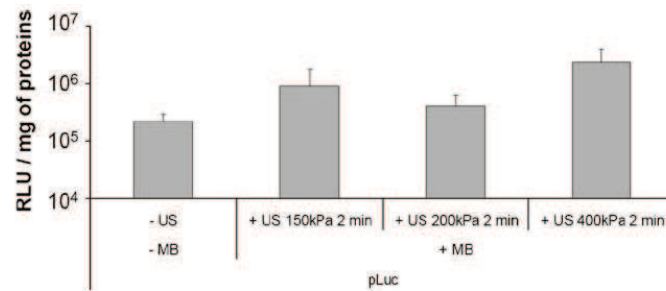


Fig. 2. Transfection efficiency *in vivo* as a function of applied acoustic pressure. Achilles tendons of mice were injected with 10 μ g of pLuc gene in the presence of 5×10^5 BR14 microbubbles. The insonification was performed at 1 MHz, at 40% duty cycle during 2 min; acoustic pressure was ranged from 150 to 400 kPa. Five days later, mice were sacrificed; their tendons were harvested and lysed. The luciferase activity is expressed as Relative Light Unit (RLU) per mg of total proteins. Values are means $\pm$ SEM of data with at least 3 mice per group. MB: microbubble; US: ultrasound; pLuc: plasmid encoding the luciferase reporter gene.

Next we explored the effect of microbubbles' number at 200 kPa. Microbubbles' number was varied from 10^5 to 10^6 and ultrasound insonation lasted for 2 minutes. We found that 5×10^5 BR14 microbubbles were sufficient to get a satisfactory transfection level (figure 3). Note that the efficiency of gene transfer was dependent on the presence of microbubbles because no significant increase was obtained when pLuc was insonified at the same condition without BR14 microbubbles (data not shown).

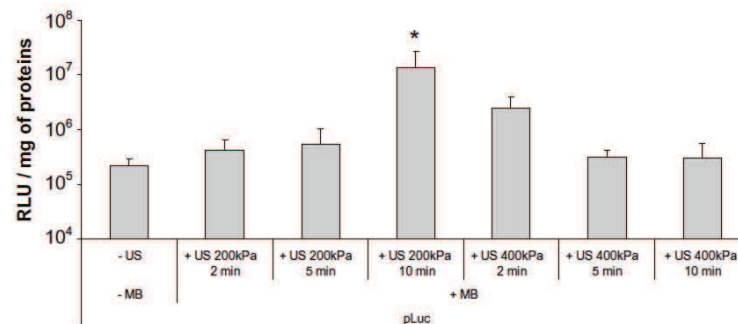


Fig. 3. Effect of ultrasound exposure time on transfection efficiency *in vivo*. Achilles tendons of mice were injected with 10 μ g of pLuc gene in the presence of 5×10^5 BR14 microbubbles. The insonation was performed at 1 MHz, 40% duty cycle during 2, 5 or 10 min with an acoustic pressure of 200 and 400 kPa. The luciferase activity was measured 5 days later as described in Fig. 2. Values are means $\pm$ SEM of data with at least 4 mice per group. No significant difference is found between sonoporated group and the control condition except for the group that has been treated at 200 kPa and 10 min US exposure (* p -value < 0.05).

Then 2, 5 and 10 minutes of US exposure were tested at 200 kPa and 400 kPa in the presence of 5×10^5 BR14 microbubbles. Our results indicate that the luciferase activity was dependent on exposure time. At 200 kPa, the transfection efficiency was increased with the exposure time. Ten minutes of insonation gave the highest luciferase activity which was almost 60-fold higher than that of control (figure 4). However, using 400 kPa acoustic pressure, the increase of exposure time led to a reduction of the luciferase activity which could be likely due to a toxic effect (figure 4).

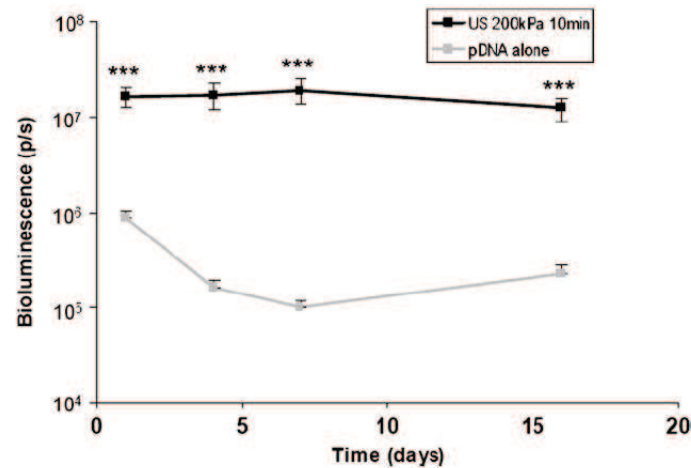


Fig. 4. Bioluminescent signal relative quantification. Mice were transfected with 10 µg pLuc alone (■) or pLuc mixed to 5×10^5 BR14 microbubbles followed by 10 min of ultrasound exposure at 1 MHz, 200 kPa, 40% duty cycle (■). Luciferase activity (p/s: photons per second) was followed from 1 to 16 days. Values are means $\pm$ SEM. Data are representative of two experiments with five mice per group. No significant difference is found between sonoporated group and the control condition except for the group that has been treated at 200 kPa and 10 min US exposure (***p-value < 0.0001). Bioluminescence corresponds to the luciferase activity detected in Achilles tendons following luciferin injection in the tendon area. Bioluminescence measurement was done as described in Section 2.

In a second set of experiments, a kinetic of gene expression was determined by *in vivo* bioluminescence imaging. Mice were injected with 10 µg of pLuc and ultrasound waves that provided the optimal gene transfer were obtained with 5×10^5 microbubbles. Data presented in figure 5 clearly show that the relative luciferase activity obtained with ultrasound and microbubbles was higher than that obtained with pLuc alone (at day 5: 1.72×10^7 versus 1.63×10^5 p/s; $p < 10^{-4}$). Most importantly, this activity was stable and sustained till 16 days (1.25×10^7 versus 2.23×10^5 p/s; $p < 10^{-4}$) post-injection whilst that produced with pLuc alone decreased almost 10-times after 5 days.

4. DISCUSSION

The goal of this study is to explore the use of ultrasound assisted microbubbles for *in vivo* gene transfer in Achilles tendon. These last years, this method has been exploited to transfect several types of organs except tendons. Here, we investigated the effect of several parameters to establish optimized parameters for effective gene expression in Achilles tendons. Data indicate that there is a clear influence of acoustic pressure and US exposure time on gene transfer efficiency. Efficient gene transfer can be obtained in tendons when they were insonified at 1 MHz pulsed ultrasound with 200 kPa of acoustic pressure, 40% DC and repetition rate of 10 kHz, and 10 min of exposure time in the presence of BR14 microbubbles. Because this is the first study reporting the use of ultrasound-assisted microbubbles for gene transfer in tendons, we can only compare our data to those obtained in muscles, another soft tissue as tendon (Li *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2005). US frequency, acoustic pressure and duty cycle used for muscles gene transfer are in the same range (1 MHz, 2-3 W/cm², 20-50 % duty cycle) of those efficient in tendons. However, the influence of US exposure time has not been assessed in those *in vivo* studies performed on muscles. Most of the time, it does not exceed 2 min. In our case, we observed that 2 min of US exposure led to 4-fold and 11-fold enhancement of luciferase activity at acoustic pressure of 200 and 400 kPa, respectively. When the exposure time was increased up to 10 min, the gain is much higher and our bioluminescence data indicate that this allows a stable gene expression that can last up to 16 days. The presence of BR14 microbubbles is a prerequisite to get this efficacy. These bubbles have also been shown to effectively enhanced sonoporation-based gene transfection into hepatic cancer implant in mice (Sakakima *et al.*, 2005) and into saphenous vein graft in porcine (Akowuah *et al.*, 2005). This effect is attributed to BR14 destruction. Their collapse can produce microstreaming that

could enhance the permeability of tenocytes, resulting in sonoporation. *In vitro*, BR14 microbubbles were destroyed in less than 2 min during insonation at similar acoustic parameters (Kaddur *et al.*, submitted 2009). Recently, Kinoshita and Hynynen (Kinoshita & Hynynen, 2007) have interestingly pointed out that the presence of standing wave has a great impact on sonoporation efficiency. Tendons being structures close to bone, a standing wave can be indeed produced during their insonation. Thereby, the effectiveness of this method in tendons could be due to this fact. Noteworthy, it is hard to know the exact acoustic power that exactly applied to tendons because of the standing wave and this could explain the need of long exposure time as 10 min to achieve high and sustained tendon gene transfer.

5. CONCLUSION

Overall, our data clearly demonstrate that the transfection efficiency was dependent on acoustic pressure, microbubbles' number and exposure time. Optimal ultrasound parameters are 1MHz, 200 kPa, 40% duty cycle and 10 minutes of exposure time in the presence of 5×10^5 BR14 microbubbles. The long term expression of transgene obtained by ultrasound assisted microbubble makes it a suitable method for gene therapy in tendons. On going experiments concern the transgene localization in the nucleus to determine if episomal or integrated forms are detected by Southern blot and PCR. Moreover, histological analyses are also in progress to assess the safety of this method before using it for tendon healing. The efficacy of this method to transfer therapeutic genes will be evaluated on injured tendons and on transgenic mice model.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge Bracco Research Geneva for supplying BR14 contrast agent. The authors are grateful to Conseil Regional for A. Delalande's fellowship. We also wish to thank Loïc Lebegue for skilful help on several experiments.

REFERENCES

- Akowuah, E. F., Gray, C., Lawrie, A., Sheridan, P. J., Su, C. H., Bettinger, T., et al. (2005). Ultrasound-mediated delivery of TIMP-3 plasmid DNA into saphenous vein leads to increased lumen size in a porcine interposition graft model. *Gene Ther*, 12(14), 1154-1157.
- Bao, S., Thrall, B. D., & Miller, D. L. (1997). Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 23(6), 953-959.
- Callewaert, B., Malfait, F., Loeys, B., & De Paepe, A. (2008). Ehlers-Danlos syndromes and Marfan syndrome. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 22(1), 165-189.
- Enwemeka, C. S. (1989). The effects of therapeutic ultrasound on tendon healing. A biomechanical study. *Am J Phys Med Rehabil*, 68(6), 283-287.
- Evans, C. H. (1999). Cytokines and the role they play in the healing of ligaments and tendons. *Sports Med*, 28(2), 71-76.
- Frieder, S., Weisberg, J., Fleming, B., & Stanek, A. (1988). A Pilot Study: The Therapeutic Effect of Ultrasound following Partial Rupture of Achilles Tendons in Male Rats. *J Orthop Sports Phys Ther*, 10(2), 39-46.
- Greenleaf, W. J., Bolander, M. E., Sarkar, G., Goldring, M. B., & Greenleaf, J. F. (1998). Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol*, 24(4), 587-595.
- Hildebrand, K. A., Frank, C. B., & Hart, D. A. (2004). Gene intervention in ligament and tendon: current status, challenges, future directions. *Gene Ther*, 11(4), 368-378.
- Huber, P. E., Mann, M. J., Melo, L. G., Ehsan, A., Kong, D., Zhang, L., et al. (2003). Focused ultrasound (HIFU) induces localized enhancement of reporter gene expression in rabbit carotid artery. *Gene Ther*, 10(18), 1600-1607.
- Jackson, B. A., Schwane, J. A., & Starcher, B. C. (1991). Effect of ultrasound therapy on the repair of Achilles tendon injuries in rats. *Med Sci Sports Exerc*, 23(2), 171-176.
- Kinoshita, M., & Hynynen, K. (2007). Key factors that affect sonoporation efficiency in in vitro settings: the importance of standing wave in sonoporation. *Biochem Biophys Res Commun*, 359(4), 860-865.
- Li, T., Tachibana, K., Kuroki, M., & Kuroki, M. (2003). Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice--initial results. *Radiology*, 229(2), 423-428.
- Lu, Q. L., Liang, H. D., Partridge, T., & Blomley, M. J. (2003). Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther*, 10(5), 396-405.
- Majewski, M., Betz, O., Ochsner, P. E., Liu, F., Porter, R. M., & Evans, C. H. (2008). Ex vivo adenoviral transfer of bone morphogenetic protein 12 (BMP-12) cDNA improves Achilles tendon healing in a rat model. *Gene Ther*, 15(16), 1139-1146.
- Miller, D. L., Bao, S., & Morris, J. E. (1999). Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system. *Ultrasound Med Biol*, 25(1), 143-149.
- Newman, C. M., & Bettinger, T. (2007). Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer. *Gene Ther*, 14(6), 465-475.
- Ng, C. O., Ng, G. Y., See, E. K., & Leung, M. C. (2003). Therapeutic ultrasound improves strength of achilles tendon repair in rats. *Ultrasound Med Biol*, 29(10), 1501-1506.
- Pichon, C., Kaddur, K., Midoux, P., Tranquart, F., & Bouakaz, A. (2008). Recent advances in gene delivery with ultrasound and microbubbles. *Journal of Experimental Nanoscience*, 3(1), 17-40.
- Ramirez, A., Schwane, J. A., McFarland, C., & Starcher, B. (1997). The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. *Med Sci Sports Exerc*, 29(3), 326-332.
- Sakakima, Y., Hayashi, S., Yagi, Y., Hayakawa, A., Tachibana, K., & Nakao, A. (2005). Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents. *Cancer Gene Ther*, 12(11), 884-889.
- Sharma, P., & Maffulli, N. (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am*, 87(1), 187-202.
- Sharma, P., & Maffulli, N. (2006). Biology of tendon injury: healing, modeling and remodeling. *J Musculoskelet Neuronal Interact*, 6(2), 181-190.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., et al. (2002). Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, 105(10), 1233-1239.
- ter Haar, G. (2007). Therapeutic applications of ultrasound. *Prog Biophys Mol Biol*, 93(1-3), 111-129.
- Thomopoulos, S., Zaegel, M., Das, R., Harwood, F. L., Silva, M. J., Amiel, D., et al. (2007). PDGF-BB released in tendon repair using a novel delivery system promotes cell proliferation and collagen remodeling. *J Orthop Res*, 25(10), 1358-1368.

- Unger, E. C., Matsunaga, T. O., McCreery, T., Schumann, P., Sweitzer, R., & Quigley, R. (2002). Therapeutic applications of microbubbles. *Eur J Radiol*, 42(2), 160-168.
- Wang, X., Liang, H. D., Dong, B., Lu, Q. L., & Blomley, M. J. (2005). Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology*, 237(1), 224-229.

II) APPLICATION DE LA SONOPORATION A UN MODELE DE SOURIS KO

1) INTRODUCTION

Après avoir optimisé les paramètres ultrasonores nécessaire à un transfert de gène efficace dans le tendon d'Achille, nous avons poussé plus loin notre étude de l'utilisation de cette méthode. La localisation des microbulles, la toxicité de la méthode, la cinétique d'expression du transgène ont été explorés. Ayant détecté une expression stable du transgène durant 4 mois en bioluminescence, nous avons appliqué la sonoporation à un modèle de souris knock out.

2) PUBLICATION

Les résultats obtenus dans cette partie ont fait l'objet d'un article actuellement soumis dans Molecular Therapy.

ULTRASOUND ASSISTED-MICROBUBBLES GENE DELIVERY IN ACHILLES TENDONS: LONG LASTING GENE EXPRESSION AND RESTORATION OF FIBROMODULIN NULL PHENOTYPE.

Anthony Delalande^{1,2}, Ayache Bouakaz², Gilles Renault^{3,4}, Flore Tabareau⁵, Patrick Midoux¹, Brigitte Arbeille⁶, Rustem Uzbekov^{6,7}, Shukti Chakravarti⁸, Michiel Postema⁹, Chantal Pichon^{1*}

¹ Centre de Biophysique Moléculaire UPR 4301 CNRS, rue Charles Sadron 45071 Orléans Cedex 2-France.

² INSERM U930 CNRS ERL 3106, Université François-Rabelais Tours, France.

³ Institut Cochin, Université Paris Descartes, CNRS (UMR 8104), Paris, France.

⁴ Inserm, U1016, Paris, France.

⁵ CHR, Service d'anatomie et cytologie pathologiques, avenue de l'Hôpital, Orléans, France.

⁶ Département des Microscopies, Université François Rabelais, Tours, France.

⁷ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, 119991, Moscow State University, Moscow, Russia.

⁸ Department of Medicine, Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD21205, USA.

⁹ University of Bergen, Institute of Physics and Technology, Allégaten 55, 5007 Bergen, Norway.

*corresponding author: chantal.pichon@cnrs-orleans.fr

ABSTRACT

This study aims at exploiting ultrasound (US) and microbubbles for gene delivery in Achilles tendons. The rationale is to combine US-assisted delivery (sonoporation) and the beneficial US stimulation of protein expression. We found that mice tendons injected with 10µg of plasmid encoding luciferase gene in the presence of 5×10^5 BR14 microbubbles, exposed with US at 1MHz, 200kPa, 40% duty cycle during 10 minutes were efficiently transfected without toxicity. The rate of luciferase expression was 100-fold higher than that obtained with the plasmid injected alone. Remarkably, the luciferase transgene was stably expressed for up to 108 days. DNA extracted from these sonoporated tendons was efficient in transforming competent *E. coli* bacteria, indicating that persistent intact pDNA was responsible for this long lasting gene expression. We used this approach to restore expression of the fibromodulin gene (*Fmod*) in gene-targeted fibromodulin null mice. A significant *Fmod* expression was detected by quantitative PCR one week post-injection. Interestingly, ultrastructural analysis of these tendons revealed that collagen fibrils diameter distribution and circularity were similar to the wild type mice. Altogether, our results suggest that this gene delivery method is promising for clinical applications aimed at modulating healing or restoration of a degenerative tendon.

1. INTRODUCTION

Gene delivery by non-viral methods is still a major challenge nowadays. It offers great promise for gene therapy because of its safety compared to their viral counterparts.

However, a major limiting factor for efficient non-viral gene therapy remains the lack of a suitable and efficient vector for gene delivery. A decade ago, a new delivery method based on ultrasound (US) stimulation coupled to gaseous microbubbles (MB) has been proposed. Upon US exposure, MBs can be expanded, moved and even destroyed (Postema & Gilja, 2007) and can modify the cell membrane permeability with a process known as sonoporation (Bao *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 1999; Taniyama *et al.*, 2002). These properties offer the opportunity of site-specific local delivery of drug or gene. Although the mechanism of membrane permeabilization has not been clearly elucidated, the main hypothesis assumes the formation of transient pores in the plasma membrane as a consequence of interaction of oscillating microbubbles with the cell membrane (Mehier-Humbert *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 1999; Taniyama *et al.*, 2002). Transient pores formed at the plasma membrane are supposed to be responsible for the intracellular delivery of molecules but also the outward transport of intracellular molecules (Kaddur *et al.*). Recently, one study has shown that endocytosis process could also be involved in the sonoporation mechanism for large molecules (Meijering *et al.*, 2009).

In the field of gene transfer, several studies have reported an improvement of gene delivery by US assisted MB (Wang *et al.*, 2005). Numerous studies on sonoporation and its exploitation for gene transfer have been reported (Mehier-Humbert *et al.*, 2005; Pichon *et al.*, 2008). This physical method has been applied to transfect several organs including muscle and bone but its application in tendons has not been reported yet (Duvshani-Eshet & Machluf, 2007; Hauff *et al.*, 2005; Hayashi *et al.*, 2009; Koike *et al.*, 2005; Manome *et al.*, 2000; Sakakima *et al.*, 2005; Sheyn *et al.*, 2008; Taniyama *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2004).

This study has been designed to show its applicability *in vivo* in Achilles tendons and gives some proof of concept data about the efficacy of this delivery method to restore expression of a “knocked out” gene.

Tendons are essential for joint movement because they are ensuring the transmission of the traction exerted by muscle to bone. As musculoskeletal diseases, tendons defects constitute one of major public health issues in different countries. They result in lost work productivity, a reduced quality of life and therefore a significant cost to individuals and society.

Gene transfer approaches have been tested in tendons. The growing number of publications related to gene transfer applied to pathologies related to tendons shows and consolidates the potentiality of gene therapy application in these tissues (Hildebrand *et al.*, 2004; Hou *et al.*, 2009). Published studies include the use of adenoviral vectors (Lou, 2000; Wang *et al.*, 2005), Haemagglutinin Japan Virus based-liposomes (Nakamura *et al.*, 1998; Ozkan *et al.*, 1999) and electroporation (Jayankura *et al.*, 2003). Adenoviral vector-mediated gene transfer has shown expression of the β -galactosidase gene lasting for 75 days in tendons (Lou, 2000). Jayankura and colleagues have investigated whether electrotransfer could improve gene transfer into mice or rat patellar tendons injected with pDNA alone (Jayankura *et al.*, 2003). They have found that under specific conditions (200 V for 10 ms or 1200 V for 100 ms) gene expression could be improved by 50% compared to pDNA injection. However, there was a gradual decrease and subsequent loss in gene expression by 42 days as was the case for naked pDNA injection.

In addition to sonoporation, therapeutic ultrasound has been claimed to promote protein synthesis in various tissues including in tendons (Enwemeka *et al.*, 1990; Qin *et al.*, 2006; Walsh *et al.*, 2007). In these studies, low intensity pulsed ultrasound (LIPUS) was used periodically to stimulate the tissue

remodelling or regeneration. LIPUS generally entails a 20 min treatment per day of 1MHz US waves repeating at 1kHz frequency with an average intensity of 30 mW/cm².

Having this in mind, we sought to combine this beneficial US stimulation and the possibility of transferring a gene of interest. This work is a follow up study of our recent report in which we have determined the potential use of sonoporation for gene transfer in Achilles tendons (Delalande *et al.*). Here, we extend our work and demonstrate that our optimal acoustic condition permits a localized and prolonged gene expression in Achilles tendons without inflammation or necrosis. We further show the use of this method to restore expression of the *Fmod* gene in a fibromodulin-deficient mouse model highlighting the potentiality of this emerging gene delivery method for clinical gene transfer applications.

2. RESULTS

2.1. OPTIMAL ACOUSTIC PARAMETERS FOR EFFICIENT GENE TRANSFER IN ACHILLES TENDONS

We have tested several conditions to determine the optimal acoustic parameters at 1 MHz US that allow an efficient gene transfer in wild type mice Achilles tendons (Delalande *et al.*). The transfection efficiency was evaluated with a plasmid DNA encoding the luciferase reporter gene (pLuc), and luciferase activity was used as a read out. Figure 1 summarizes the luciferase activities obtained in tendons that have been sonoporated 5 days before at 1 MHz, 200kPa or 400 kPa, 40% duty cycle during 2, 5 or 10 minutes exposure time in the presence or absence of BR14 bubbles. Two min of US exposure at 200kPa, 40% duty cycle in the presence of 5×10⁵ BR14 MB did not enhance the luciferase expression compared to the control condition consisting of injection of pLuc alone. Increasing the exposure time to 5 minutes did not have any significant effect. However, 10 minutes of exposure time with the same acoustic condition gave rise to the highest luciferase activity (6.27×10⁷ RLU/mg proteins *versus* 4.72×10⁵ RLU/mg proteins) which is 132-fold more compared to that obtained with pLuc injected alone. This enhancement was dependent on the presence of microbubbles because no significant increase in gene expression was found at the same acoustic condition without BR14 microbubbles. Moreover, there was no positive effect of US alone on the gene transfer efficiency whatever the duration of exposure time.

At 400 kPa, the resulting trend was quite different. When the tendon was US-exposed for 2 min in the presence of MB, there was an increase of the gene expression as found for 200 kPa. The efficiency of gene transfer was 80-fold more than that of pLuc alone. However, a reduction of the luciferase activity occurred for 5 or 10 minutes of exposure time.

These unwarranted effects, we first checked if this acoustic pressure could induce a degradation of pDNA as shows agarose gel electrophoresis of pDNA that has been exposed at 200 kPa or 400 kPa during 10 min in the presence of BR14 microbubbles (**Fig S1**). Whatever the acoustic pressure used, pDNA samples were still resolved in 2 bands corresponding to the supercoiled and the circular pDNA forms similar to those seen in the non-treated pDNA (the control sample). No smears were observed indicating the absence of degradation. Consequently, the reduced gene expression at 400 kPa was not due to pDNA degradation. We then assessed if this decreased gene expression could be a cytotoxicity effect of this applied US condition. Histological analysis of US exposed tendons was performed to determine if this could happen. As depicted in Figure 2, the examination of hematoxylin-eosin and safranin staining sections clearly indicates that tendons exposed to US at 400 kPa showed specific changes compared to untreated tendons. We saw a large area of inflammation characterized by the presence of a high number of lymphocytes and plasmocytes surrounding the tendon particularly in the musculo-tendinous junction. However, the tendon itself seemed to be unaltered. Moreover, the observed inflammation was enhanced when the US exposure was performed in the presence of MB. Acute inflammatory lesions rich in polynuclear neutrophils were seen and muscle necrosis at the musculo-tendinous junction was observed (**Figs 2c and 2e**).

Although not as extensive, inflammation was evident in tendons exposed at 400 kPa for 2 min (not shown). This condition gave a 10-fold more gene expression in tendons compared to the control (pDNA alone) as seen in Figure 1. By contrast, no significant histopathological changes were seen after sonoporation at 200 kPa in the presence or not of microbubbles, the architecture of tendons was preserved and no inflammatory infiltrates were detected.

2.2. KINETIC OF TRANSGENE EXPRESSION

The next step of our study was to determine the kinetics of gene expression at the optimal US condition by *in vivo* bioluminescence imaging. But before performing these experiments, we sought to make sure about the location and the stability of microbubbles following the injection in Achilles tendons area. High-resolution ultrasound imaging was performed to visualize the tendon area (**Fig 3**). After injection, a hyper-echogenic structure limited to the tendon area which induces shadowing artifacts can be observed indicating that the sample was concentrated at the site of injection as desired. After 1 MHz insonation, the same very bright structure was still seen, although its size and localization had changed, as assessed comparing 3D B mode images of the tendon. To make sure that the remaining structures were indeed microbubbles, we used the contrast imaging mode in destructive mode. The ability of this mode to destroy some parts of the remaining bright structure indicates that there are still microbubbles after insonation at 1 MHz.

In vivo bioluminescence imaging was then done on mice injected with 10 µg of pLuc alone or mixed with 5×10^5 microbubbles (**Fig 4**). In these experiments, the contralateral tendons of treated mice were used as control. At the indicated times, mice were imaged and the cooled charge-coupled device signal depicted was quantitatively analyzed to give the gene expression profile shown in Figure 4. From day 1 to day 25, the relative luciferase activity exhibited in tendons treated with US at 200kPa and microbubbles during 10 min was 10-fold higher than that obtained with tendons injected with pLuc alone (at day 25, it was 1.25×10^7 versus 1.63×10^5 p/s; *p-value* < 0.001). For the following days, the level of luciferase activity in tendons injected with pLuc alone decreased gradually as function of time and became very low 40 days post-treatment ($\sim 10^3$ p/s). It is worthwhile to note that the luminescence measured in tendons treated with US alone was quite similar to that of those injected with pLuc alone. This is in agreement with the *ex vivo* measurement of luciferase activity shown in figure 1. Remarkably, the activity of luciferase measured in tendons injected with pLuc in the presence of BR14 at 200kPa, 40% duty cycle during 10 min, was stable as shown by the plateau which lasts over 100 days time course (**Fig 4b**).

2.3. ASSESSMENT OF INTACT PLASMID RESCUE ASSAY

The long lasting gene expression obtained at optimal sonoporation parameters could be achieved by the maintenance of intact pDNA extra-chromosomally. To assess this possibility, we conducted a plasmid rescue assay. The pDNA extracted from sonoporated tendons at optimal acoustic conditions and control tendons were used to transform *E. coli*. **Figure 5** shows that only DNA extracted from sonoporated tendons was able to transform *E. coli*. Even though the number of colonies obtained was low, this result indicates that an intact form of pLuc could be recovered from these tendons which were not the case for those injected with pLuc alone.

2.4. RESTORATION OF FIBROMODULIN GENE EXPRESSION IN FMOD KO MICE

The last step of our study was to test if the optimal sonoporation condition could permit an efficient restoration of a knocked out gene in Achilles tendons. This investigation was carried out in fibromodulin-deficient mice (Chakravarti, 2002). This mice model has been generated to better understand the role of fibromodulin (Fmod), a small leucin-rich repeat proteoglycan. *Fmod* is abundantly expressed in tendons and it is known to act on collagen fibril assembly and maturation.

Compared to the wild type mice, the average diameter of collagen fibrils of *Fmod* KO mice are lower due the higher number of small diameter fibrils (Svensson *et al.*, 1999).

The Achilles tendons of these mice were sonoporated as described above with pDNA encoding fibromodulin gene (pFmod). We quantified the sonoporation efficiency by measuring the *Fmod* gene expression by quantitative RT-PCR. Tendons were harvested and their total RNA was extracted 7 days post-sonoporation. In tendons that have been sonoporated, the relative expression of *Fmod* mRNA was 40-fold more than that of GAPDH housekeeping gene whilst no significant increase was obtained in contralateral tendons injected with pFmod and exposed to US (**Fig 6**).

A second series of experiments were performed to evaluate by transmission electron microscopy if this high expression of *Fmod* gene will have an impact on collagen fibrils organization of *Fmod*-null mice tendons. In Figure 7 shown are representative ultrastructural analyses of collagen fibrils of Achilles tendons from wild type, non treated *Fmod*-null mice, and *Fmod*-null mice that were treated either with pFmod alone, pFmod and US or pFmod+MB and US. Collagen fibrils of *Fmod* null mice exhibit an abnormal disorganized structure and irregular shape (**Fig 7b**) compared to those of wild type which are smooth and regular (**Fig 7a**) as previously shown [36]. These differences were validated by the analysis of collagen fibril diameter distributions of each sample and their Uzbekov index (U index) which indicates the level of fibril circularity (**Fig 8b**). Among the different conditions used, it can be seen that sonoporation of *Fmod* gene resulted to a dramatic improvement of fibrils homogeneity and shape of collagen fibrils (**Fig 8a**). Their ultrastructural organization is similar to that of collagen fibrils from wild type mice. Injection of pFmod followed by US application seemed to induce a slight improvement of collagen fibrils ultrastructure which are more regular but the frequency of thinner fibrils was still high (**Fig 7d**). By contrast, injection of pFmod alone did not significantly improved collagen fibrils albeit there is some slight difference between them and those of *Fmod*-null mice. Despite being preliminary in terms of gene restoration, data from figures 7 and 8 are encouraging and indicate without ambiguity the potentiality of the sonoporation method for gene restoration. We are aware that more experiments are required to establish a robust protocol but this is beyond the scope of the present study.

3. DISCUSSION

This study shows the potentiality of US assisted delivery to efficiently transfer gene in Achilles tendon without noticeable toxicity. Our results firmly indicate that MBs were essential in this US-facilitated gene delivery. We show the influence of microbubbles, acoustic pressure and ultrasound exposure time on gene transfer efficiency. Plasmid with MBs alone did not produce any enhancement suggesting the crucial effect of US trigger. Altogether our data indicate that 1 MHz US exposure at 200 kPa, 40% duty cycle for 10 min was the optimal parameters resulting a stable and efficient gene delivery in tendons.

At 200 kPa, gene transfer efficiency was dependant on time exposure with a maximum at 10 min whereas at 400 kPa we saw a decrease of gene transfer efficiency when stimulating more than 2 minutes. Several explanations could be drawn based on these effects. In the 200 kPa acoustic regime, BR14 bubbles larger than 1 μm should be destroyed within few cycles (Postema & Schmitz, 2005), leaving the remaining small bubbles to act towards cells, owing to primary Bjerknes forces (Kotopoulos & Postema) *i.e.* micro-streaming effect of oscillating gas MB. In the 400 kPa acoustic regime, the vast majority of the BR14 bubbles should be destroyed (Postema & Schmitz, 2005), whereas cavitation-related bioeffects might occur (Postema & Gilja, 2007). Consequently, this additional US effect might be responsible for the inflammation infiltrates that are observed in tendons insonated at this acoustic regime. US alone at this regime induced also an inflammation albeit with a lesser extent. Thermal and mechanical effects of US could be the cause of this inflammation. The thermal effect generally distinguished as mainly due to continuous US might also occur with pulsed US even though with a lower impact (Baker *et al.*, 2001). The extent of tissue

heating could be dependent on a number of variables, such as, the US intensity and tissue properties. Therefore, the right acoustic parameters in terms of acoustic pressure and duration of US exposure time must be found to reduce this side effect of insonation without compromising the efficiency of gene delivery.

Damaged muscle fibers have also been observed following *in vivo* sonoporation of mouse skeletal muscles (Chen *et al.*). In the aforementioned study, the extent of damaged muscles area was also significantly increased in the presence of Optison microbubbles with or without P85, a block copolymer used as an adjuvant.

We found that 10 min of US exposure time was required to get our optimal gene transfer efficiency. Similar long US exposure time has been reported by Sheyn *et al.* (Sheyn *et al.*, 2008) who have transfected mice skeletal muscle by US assisted with Optison bubbles. Their data indicate that luciferase transgene delivery was optimal with the following US parameters: 1MHz, 5W/cm², 50% duty cycle during 10 min. The luciferase activity which peaked around one week becomes undetectable at day 19 post-sonoporation. As our data in Achilles tendons, any effect of US alone on gene transfer in muscles was seen. This absence of US effect is not commonly observed. Indeed, the expression of transgene in muscles can be enhanced by 1 MHz US exposure alone at 2.5 W/cm² (Taniyama *et al.*, 2002) and 3 W/cm² (Lu *et al.*, 2003). The discrepancy between these different studies could be due to the differences in the acoustic set up and in the applied acoustic conditions used and/or the age of animals used for the experiments. Indeed, Lu *et al.* (Lu *et al.*, 2003) have found that the effect of US alone on gene transfer in muscles was age-dependent.

Taken together, our data shown in Figures 4 and 5 indicate that our sonoporation condition was successful in delivering sufficient pDNA and maintained in an intact form for a long period of time leading to sustained gene expression. It worth noticing that this stable gene expression could be also related to the fact that tenocytes due to their low proliferative index may retain introduced pDNA for long time as skeletal muscle cells. Compared to data reported in the literature, the gene transfer efficiency of this method (around 100 days) is comparable to that obtained in tendons transduced with adenoviral vectors (75 days).

In the acoustic regime used in our study, oscillations of MBs are likely inducing a mechanical stress on the plasma membrane. Mechanical stress is known to induce some metabolic activities including gene expression and the mechanism through which US facilitates tissue repair is likely related to the mechanical effects of US waves (Dinno *et al.*, 1989; Karnes & Burton, 2002). These effects have been shown to produce a change in the membrane permeability and to stimulate the transport of second messenger substances, such as calcium across the cell membrane (Dinno *et al.*, 1989; Mortimer & Dyson, 1988). It has been observed that exposure to ultrasonic energy stimulates the proliferation of fibroblasts (Ramirez *et al.*, 1997; Young & Dyson, 1990) and increases their metabolic activity (Harvey *et al.*, 1975; Kobayashi *et al.*, 2009; Ramirez *et al.*, 1997; Young & Dyson, 1990). Previous study has also reported that cell survival can be even increased at low duty cycle after sonoporation (Pan *et al.*, 2005). One can propose that such effects could be also involved during our experiments. In our case, a long lasting gene expression occurred only after 10 min US exposure and this could be owed by MB activation which somehow amplifies the mechanical effects of US.

Based on the last three figures (**Figs.6, 7 and 8**) obtained with *Fmod* null mice, this gene delivery method looks also promising to restore missing gene or malfunctioning gene that is observed in severe tendons diseases. The potentiality of this method is clearly validated by the improvement of collagen fibrils phenotype that was observed 10 days post-treatment. The therapeutic benefit of this gene expression has to be validated also by the determination of biomechanical parameters. Experiments are in progress to define the kinetic of *Fmod* gene expression and to determine a robust protocol of gene restoration. Accordingly, this delivery system could be applied to transfer therapeutic genes to accelerate tendon healing or to restore degenerative tendons.

4. MATERIALS AND METHODS

4.1. REAGENTS

All reagents used in this study were purchased from SIGMA-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA) unless otherwise stated.

4.2. PLASMIDS

A 7.5 kb homemade reporter plasmid that encoded the firefly luciferase gene (pLuc) under the control of the strong cytomegalovirus promoter was used. Five consecutive NF κ B motifs that recognized the NF κ B transcription factor were inserted upstream of the promoter (Suwalski *et al.*). A second plasmid which encodes the human fibromodulin was used pCEP₄-FBM (pFmod) (Geng *et al.*, 2006).

Supercoiled plasmid was isolated from *Escherichia coli* DH5 α bacteria cultures using the standard alkaline lysis method. Purification was carried out using a QIAGEN Mega Kit (QIAGEN, Courtabœuf, France).

4.3. MICROBUBBLES AND ULTRASOUND SET-UP

BR14 (Bracco research, Geneva, Switzerland) and Micromarker[®] (VisualSonics, La Frette S/seine, France) microbubbles were used. Both contrast agents contain a perfluorobutane (C₄F₁₀) gas encapsulated by a phospholipid shell and have a median diameter of 2.3 to 2.9 μ m. Both contrast agents were resuspended according to manufacturer's protocol, the BR14 suspension contained approximately 2.10^8 MB.ml⁻¹ whereas the Micromarker[®] contained 2.10^9 MB.ml⁻¹. The experimental set up for tendon insonation was done as described as in Delalande *et al.* (Delalande *et al.*). US was generated from a 0.5" diameter, IBMF-014 transducer with a center frequency of 1 MHz (Sofranel, Sartrouville, France). A signal consisting of 40 cycles with a centre frequency of 1.0 MHz and a pulse repetition frequency of 10 kHz, i.e., a duty cycle of 40%, was generated by a 33220A arbitrary function generator (Agilent technologies, Les Ulis, France) and amplified by a RF power amplifier (ADECE, Artannes, France) was used as the input for the transducer. The transducer was calibrated in a Perspex container using an HGL-200 PVDF bullet type hydrophone (Onda, Sunnyvale, CA). Peak negative pressures of 200 kPa and 400 kPa were used corresponding to an MI of 0.2 and 0.4 respectively.

4.4. ANIMAL STUDIES

The animal studies were carried out according to the guidelines of the French Ministry of Agriculture for experiments with laboratory animals (law 87848, C. Pichon accreditation). Mice were housed in the animal facility of our institution and cared for in conformity with the guidelines of Ethics Committee. Experiments were done on six to eight week old wild type (WT) CD1 mice and fibromodulin knock-out mice (*Fmod KO*).

Mice were anesthetized using 2-3.5% isoflurane inhalation. The posterior legs of the mice were shaved and washed with Vetedine[®] (Centravet, Alfort, France).

A 10 μ l solution containing 10 μ g of pDNA and 5×10^5 MB was injected into the Achilles tendon area using a 29G Myjector syringe (Terumo France SA, Guyancourt, France). US stimulation was performed immediately after injection. Control experiments were performed using 10 μ l of pDNA alone on a separate mouse or on the other posterior leg. The transducer was positioned as so its natural focus coincided with the mouse skin.

The presence of MB close to the tendon was assessed using high-resolution ultrasound imaging. Images of the tendon and surrounding muscle tissue were captured using a RMV-708 probe of a VEVO770 (Visualsonics) ultrasound biomicroscope.

US images with a 40µm axial resolution were captured before and after injection of 10µl solution containing 5×10^5 BR14 microbubbles.

MB were displayed as highly echogenic areas. Additional images of the tendon and leg were acquired to assess if any microbubbles remained after sonoporation.

4.5. LUCIFERASE ASSAY

Mice were euthanized by lethal CO₂ 5 days after sonoporation. Achilles tendons were harvested and frozen in liquid nitrogen before lysis could occur. Then the tendons were crushed in liquid nitrogen using a mortar and pestle. The powder was added into a ice cold luciferase Cell Culture Lysis buffer (Promega, Madison, WI) and the mixture was kept for 3 hours on ice before luminescence measurement. The Relative Light Units (RLU) was measured using a Lumat LB9507 luminometer (Berthold, Wildbarch, Germany) after adding 100 µl of Luciferase assay system substrate (Promega) to 20 µl of tendon lysates. Luciferase activity was expressed as RLU per mg of proteins. The tendon protein content was quantified by bicinchoninic acid assay (Smith *et al.*, 1985).

4.6. HISTOLOGICAL ANALYSIS

The sonoporation cytotoxicity was evaluated by histological examination of the tendon tissue. The Achilles tendons were insonified after injection of 10µg pLuc solution with or without BR14 microbubbles at 200kPa and 400kPa for 10 minutes. The tendons were harvested at day 7 after insonation and were fixed in 4% formaldehyde solution, paraffin embedded, sliced in serial sections (2 µm), mounted on glass slides and counterstained using Hematoxylin-Eosin-Safranin (HES). The tendons sections were analyzed by a pathologist and cytotoxicity was evaluated according to the presence and extent of inflammatory infiltrates and necrosis.

4.7. IN VIVO BIOLUMINESCENCE IMAGING AND QUANTIFICATION

Bioluminescence imaging was captured using a cooled CCD camera mounted in a dark box chamber with a camera controller, a camera cooling system and a computer for data acquisition and analysis (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu City, Japan). Signal intensity was recorded 2 minutes after 100 µg luciferin injection in the tendon area and quantified as the mean of photons per second of time exposure within the region of interest (ROI) over the tendon.

4.8. DNA EXTRACTION, PLASMID RESCUE ASSAY AND QUANTIFICATION

Mice were euthanatized 25 and 108 days after insonation there Achilles tendons were harvested and lysed using a modified Hirt method which preferentially extracts circular DNA (Hirt, 1967). Tendons were lysed in 300 µl 10% Chelex solution and 30 µl of proteinase K (working concentration: 100 µg/ml) at 56°C for 2 hours. DNA was ethanol-precipitated and re-dissolved in 300 µl of TE buffer. Two phenol chloroform extraction steps followed by ethanol precipitation of the DNA was then carried out. The final pellet was dissolved in 60 µl TE buffer containing RNase (50 µg/ml). The DNA quantity was evaluated using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fischer, Illkirch, France). The high efficiency *E. coli* Dh5α competent bacteria (New England Biolabs, Ozyme, St Quentin en Yveline, France) were transformed with 150 ng of extracted DNA. Plasmid DNA was extracted from transformed colonies and put on agarose gel.

4.9. RNA EXTRACTION OF FMOD KO MICE AND QPCR

Seven days post-treatment, *Fmod* KO mice tendons and control wild type tendons were harvested and frozen immediately in liquid nitrogen and then stored at -80°C. Tendons were thawed only once to preserve the RNA. The tendons were crushed in liquid nitrogen using a mortar and a pestle (average mass 10 mg). Sample RNA extractions were performed using an RNA II NucleoSpin® mini kit

(Machery-Nagel EURL, Hoerd, France) which includes a DNase treatment. In order to insure there was enough RNA material, every extraction was done with a pool of 2 tendons (10 ng/μl, for a total mass of 600 ng of RNA). The RNA quantification was performed using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fischer). The RNA integrity was checked using a BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies) was acceptable when RNA integrity number was more than 7 (Schroeder *et al.*, 2006). For all experiments, 100 ng of RNA was used for reverse transcription using 200 units of M-MLV Reverse Transcriptase (New England Biolabs) for 1 hour at 37°C. The *Fmod* gene expression was evaluated from 100 ng of cDNA by qPCR using a Light Cycler II 480 (Roche Applied Science, Meylan, France) with 0.1 μM of *Fmod* specific primers (forward: 5'-CCCTCCAGATCCCCGCGACT-3', reverse: 5'-CGGGAGGGAACGAAGGGCAG-3') and compared to GAPDH housekeeping gene expression (detected transcript: NM_008084, QIAGEN). The *Fmod* primers were specific to the human fibromodulin cDNA inserted into the pFmod plasmid.

4.10. ELECTRON MICROSCOPY

Ultrastructural analysis was done on Achilles tendons of 3 groups of Fmod KO mice and compared to untreated wild type mice, untreated Fmod KO mice. The 1st group was injected with 10 μg of pFmod alone, the 2nd group was injected with pFmod and insonified (1 MHz, 200 kPa, 40 % duty cycle, 10 min) and the 3rd group was injected with pFmod and MB and insonified (1 MHz, 200 kPa, 40 % duty cycle, 10 min).

Achilles tendons from the controls and treated mice were harvested 10 days after treatment and fixed in 4% paraformaldehyde and 1 % glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 48 h. The specimens were post-fixed in 2% osmium tetroxide for 1 h (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA) and dehydrated in a graded series of ethanol solutions (from 50% to 100%) and propylene oxide. The samples were then embedded in Epoxy resin LX 112 (Fluka, Germany), incubated for 24 h at 37°C and the resin was polymerised for 48 h at 60°C. Sixty micrometers sections were cut transversely using a Ultracut UCT ultramicrotome (Leica) with respect to the main axis of collagen fibers, stained with 5% uranyl acetate, and placed on electron microscopy one-slot grids coated with Formvar film. The sections were then observed at 100 kV with a Jeol 1011 transmission electron microscope (JEOL Ltd, Tokyo, Japan) connected to a Gatan digital camera driven by Digital Micrograph software (Gatan, Pleasanton, CA). Fibril size analyses was done with NIS-Elements D software (Nikon, Japan). Surface, perimeter and diameter of at least 200 fibres were measured for each group. The level of fibre circularity was determined by the Uzbekov index (U index) calculated by the following equation:

$$U = \frac{P}{2\sqrt{\pi \times S}} ,$$

where P is perimeter and S is the surface area of fibrils on perpendicular sections. A U index of 1 corresponds to a perfect circle.

4.11. STATISTICAL ANALYSIS

Data was expressed as mean ± SEM or SD. Statistical differences between groups was analyzed by the unilateral Mann–Whitney *U*-test test using XLStat 2007 software (Addinsoft, Paris, France), and the significance was defined as a *p*-value ≤ 0.05.

FUNDING

This work was supported by the Region Centre and the CNRS (Centre National de Recherche Scientifique). A.D. received a Ph.D. fellowship from the Region Centre and the AFSED (Association Française des Syndromes Ehlers-Danlos).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Bracco Research (Geneva, Switzerland) for BR14 bubbles, Loïc Lebegue for his skilful technical help and Dr Frédéric Maitre (Centre Hospitalier Régional d'Orléans, France) for histological analyses. They are grateful to Dr Åke Oldberg (Lund University, Sweden) for providing *Fmod null* mice.

5. FIGURES

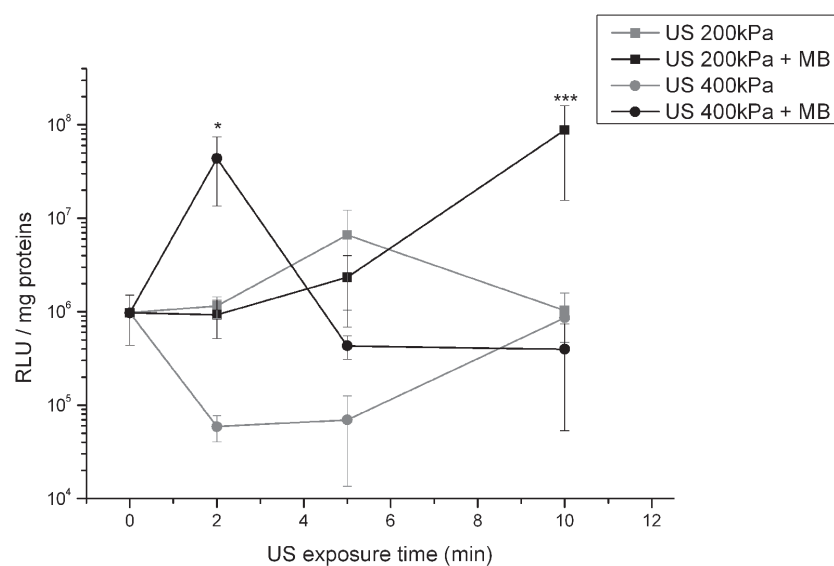


Figure 1: Sonoporation in mice Achilles tendon: optimal parameters determination.

Ten μg of plasmid encoding luciferase gene (pLuc) in the absence (grey curve) or the presence (black curve) of $5 \cdot 10^5$ BR14 MB in 20 μl final volume were injected at mid region of Achilles tendons that has been shaved. After, injection, tendons were exposed either to 1 MHz US at 200kPa (square) or 400kPa (circle) during 2, 5 or 10 minutes. Tendons were harvested 5 days post-sonoporation and the luciferase activity was measured and expressed as Relative Light Units per mg of proteins (RLU/mg proteins). Values are means $\pm$ SEM of least 4 tendons.

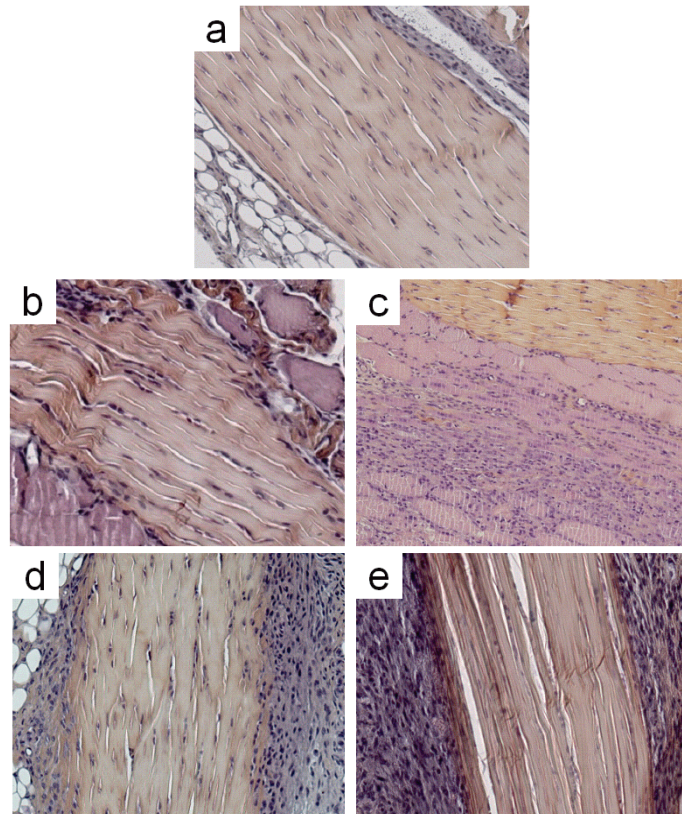


Figure 2: Histopathological analyses of sonoporated mice Achilles tendons.

Achilles tendons were harvested 7 days post sonoporation, fixed in 4 % formaldehyde solution, paraffin embedded, sliced in serial sections (2 μ m), mounted on glass slides and HES counterstained. Shown are representatives of images of control tendons (a); tendons injected with pLuc followed by a sonoporation at 200kPa for 10 minutes without MB (b) or with MB (d); tendons injected with pLuc followed by sonoporation at 400kPa for 10 minutes in absence (c) or in presence of MB (e).

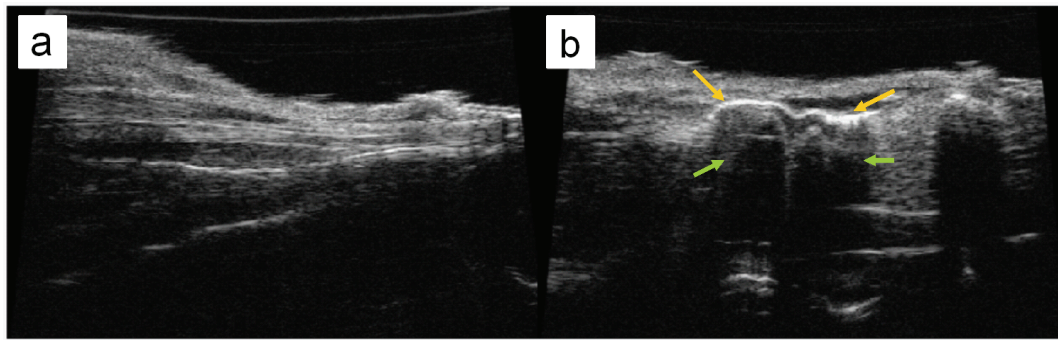


Figure 3: Microbubble localization by ultrasound.

Mice Achilles tendons were immediately using a high resolution Vevo 770 ultrasound machine before (a) and after (b) injection of 5.10^5 BR14 MB. Mice tendons were imaged to find microbubbles location after injection. Immediately, after injection by the brighter echo image corresponds to MB. Orange arrows indicate the hyper-echogenic structure consisting of MB. Green arrows show the strong attenuation induced by the high concentration of MB (shadowing artifact).

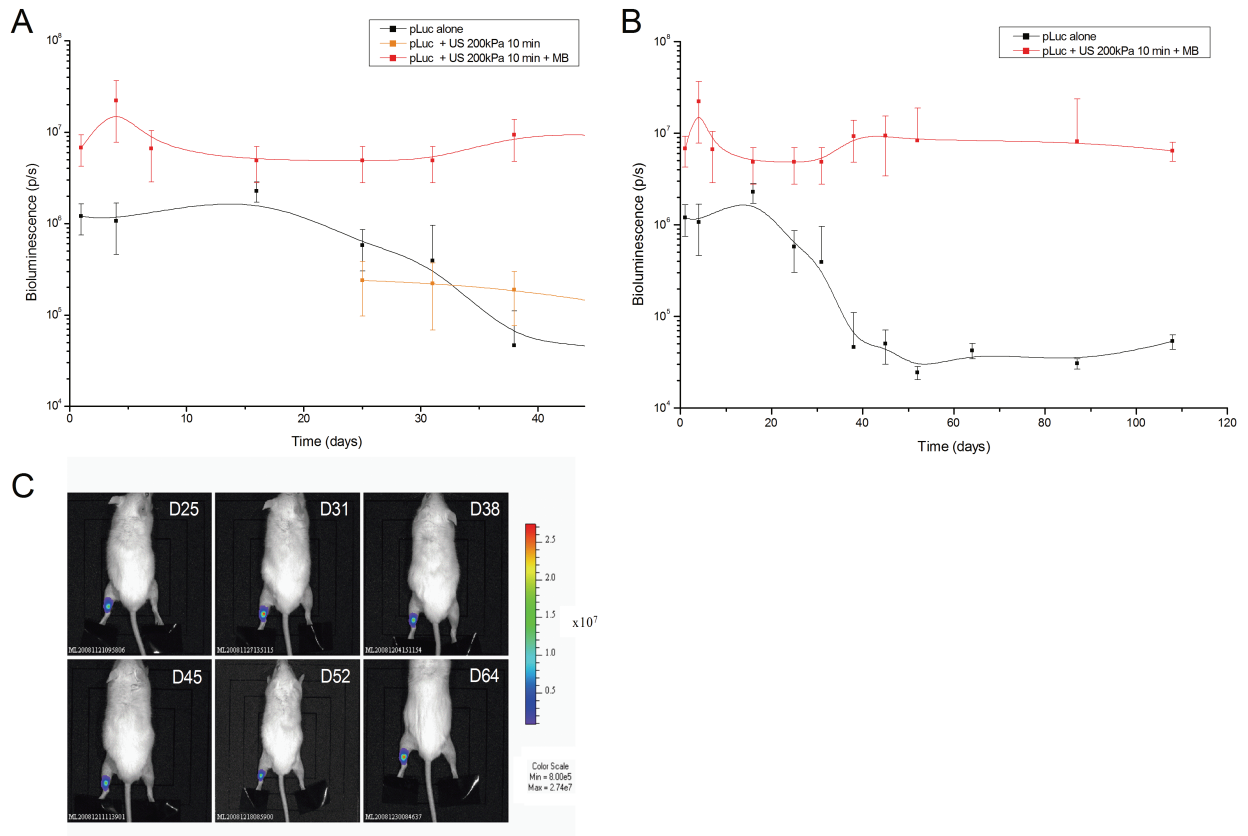


Figure 4: Kinetic of luciferase gene expression.

Mice Achilles tendons were injected either with 10 μ g pLuc only or 10 μ g pLuc mixed or not with 5×10^5 of BR14 MB followed by US exposure at 1 MHz, 200 kPa, 40% duty cycle during 10 min. Bioluminescence signals (expressed in p/s: photons per second) that correspond to the luciferase activity were measured after luciferin injection in the tendon area. (a) and (b): Luciferase gene expression profile of mice groups injected with either pLuc only (black curve), pLuc mixed with MB and exposed to US (red curve) or pLuc without MB and exposed to US (orange curve). Values are means $\pm$ SEM. Data are representative of two experiments with five mice per group. (***: p-value < 0.001). (c) Representative CCD images showing luciferase expression in tendons injected with pLuc mixed with MB and US exposed (left tendon) or pLuc without MB and not US exposed (right tendon). Images were recorded at day (D) 25, 31, 38, 45, 52 and 64 post-injection.

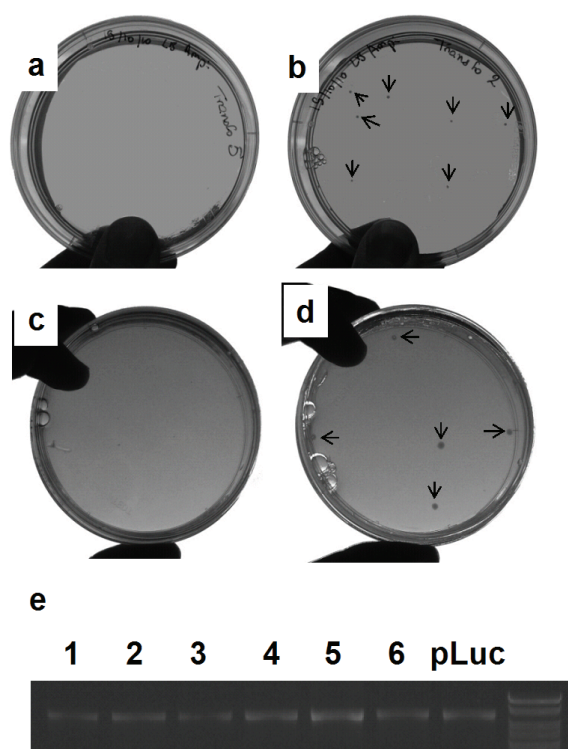


Figure 5: Plasmid rescue assay.

Mice Achilles tendons were treated as described in figure 4. They were harvested at day 25 (a and b) or at day 108 (c and d) post-injection. Then, a modified Hirth method was performed to extract circular DNA. The resulting DNA was used to transform *E. Coli* bacteria. Shown are representative images obtained from the different samples. (a and c): tendons injected with pLuc without sonoporation; (b and d): tendons sonoporated with pLuc (pLuc+US+BR14). (e): Agarose gel electrophoresis of minipreps (lanes 1 to 6) made from six transformed bacterial colonies (arrows in b and d), lane 7: pLuc ; lane 8: DNA ladder.

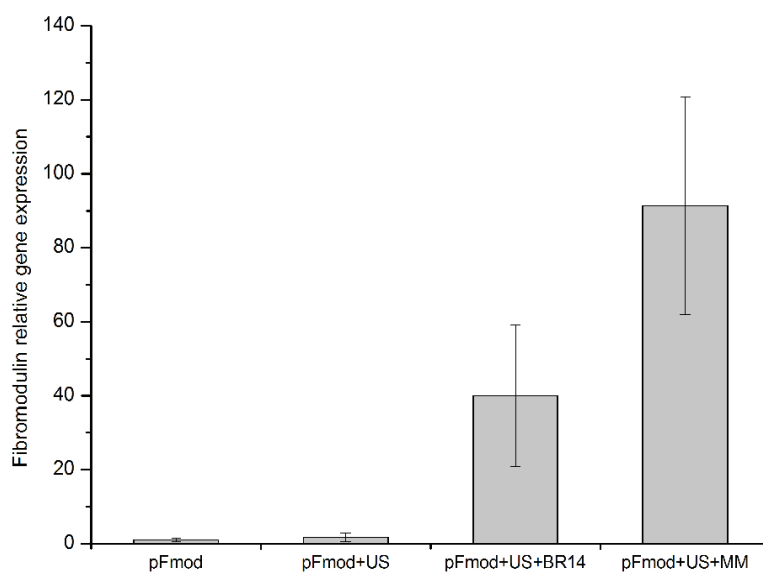


Figure 6: *Fmod* gene expression relative to GAPDH.

Achilles tendons of *FmodKO* mice were injected with 10 μ g of plasmid encoding for fibromodulin gene (pFmod) with US exposure in the absence (pFmod+US) or in the presence of BR14 and MM MB (pFmod+US+BR14 and pFmod+US+MM) at optimal acoustic parameters. Achilles tendons were harvested 7 days post-injection and the total RNA was extracted. The relative *Fmod* gene expression was determined by quantitative qPCR as compared to that of GAPDH housekeeping gene and the untreated *Fmod-null* mouse tendons are considered as calibrator tissue. Values shown are means $\pm$ SD of 4 tendons.

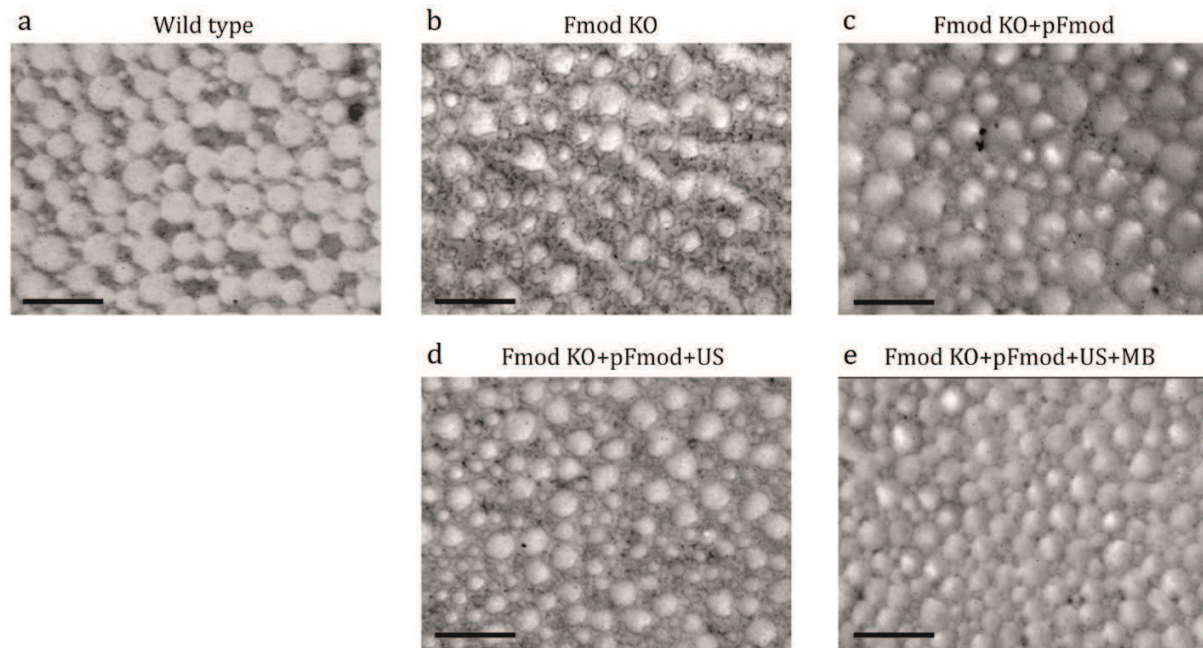


Figure 7: Effect of Fmod gene expression on collagen fibrils ultrastructure.

Shown are representative transmission electron micrographs of transverse sections from tendon of wild type (a), tendon of *Fmod-null* (b), tendons of *Fmod-null* injected with pFmod alone (c), tendon of *Fmod-null* injected with pFmod and US application (d) and sonoporated (pFmod+MB+US) *Fmod-null* tendons (e). Magnification 50000X, scale bar 500nm.

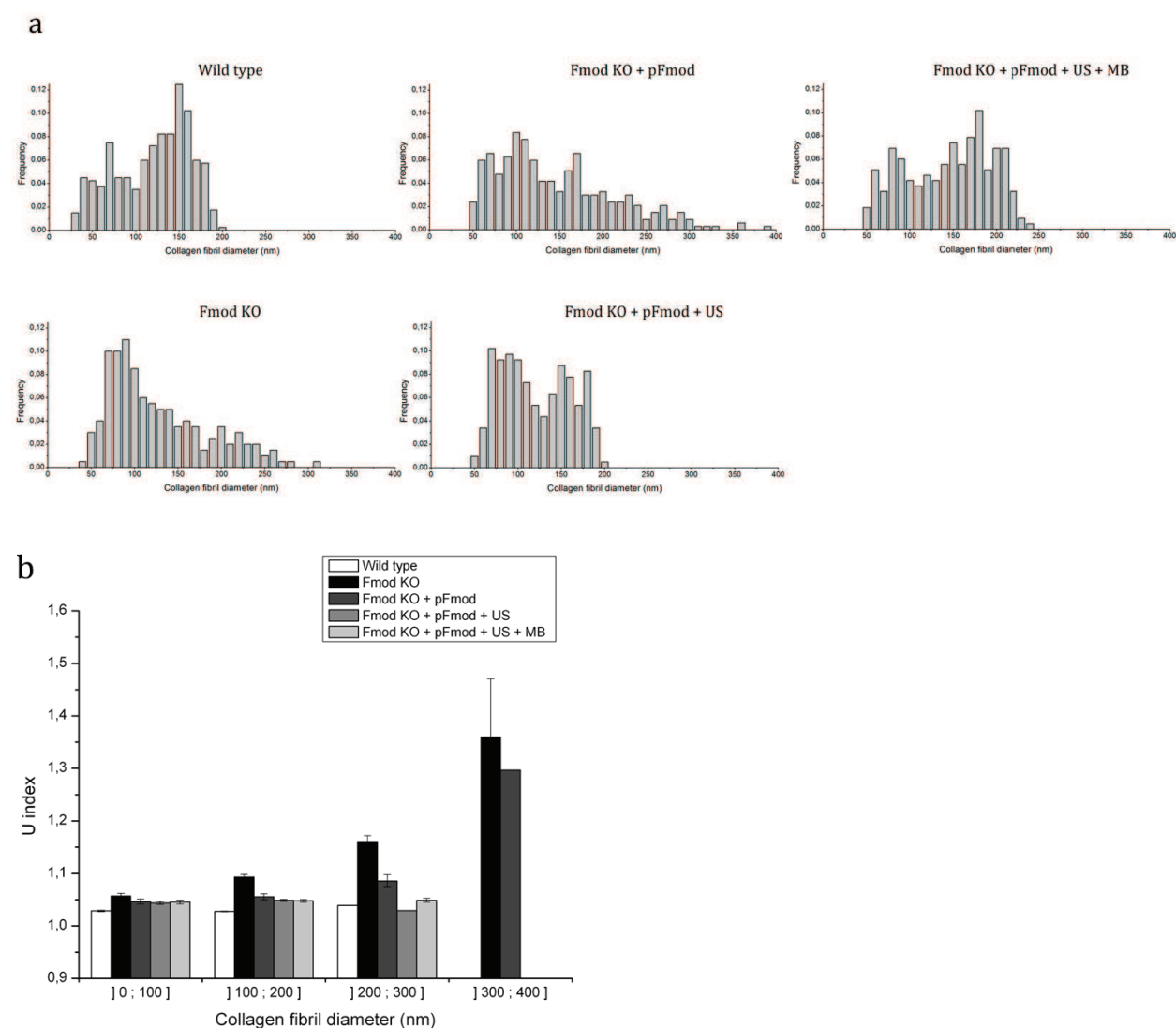


Figure 8: Ultrastructural analysis of collagen fibrils.

Collagen fibril diameter distributions are presented as histograms for wild-type, *Fmod* null mice, *Fmod*-null injected with pFmod alone and US application, and sonoporated (pFmod+MB+US) *Fmod*-null tendons (a). The level of fiber circularity of collagen fibrils from different samples was evaluated by calculating the Uzbekov index (b).

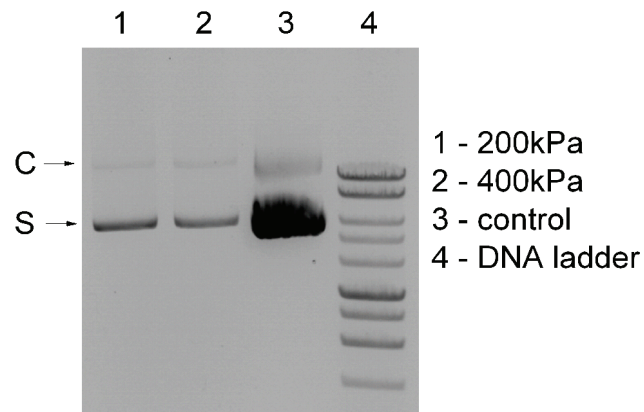


Figure S1: US exposure did not affect pDNA integrity.

pDNA (10 μ g in 1.5 ml of medium) was US exposed at 1MHz of frequency, 200 or 400 kPa, 40% duty cycle for 10 min in presence of 5.10^5 BR14 MB. Following extraction and precipitation, the pDNA pellet was dissolved in TE buffer and analyzed on 0.6% agarose gel electrophoresis in the presence of ethidium bromide. Lane 1: 200kPa, lane 2: 400 kPa, lane 3: Control, lane 4: DNA ladder. C: circular form of pDNA; S: supercoiled form of pDNA.

6. REFERENCES

- Baker, K. G., Robertson, V. J., & Duck, F. A. (2001). A review of therapeutic ultrasound: Biophysical effects. *Physical Therapy*, 81(7), 1351-1358.
- Bao, S., Thrall, B. D., & Miller, D. L. (1997). Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 23(6), 953-959.
- Chakravarti, S. (2002). Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J*, 19(4-5), 287-293.
- Chen, Y. C., Jiang, L. P., Liu, N. X., Wang, Z. H., Hong, K., & Zhang, Q. P. P85, Optison microbubbles and ultrasound cooperate in mediating plasmid DNA transfection in mouse skeletal muscles in vivo. *Ultrason Sonochem*, 18(2), 513-519.
- Delalande, A., Bureau, M. F., Midoux, P., Bouakaz, A., & Pichon, C. Ultrasound-assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy. *Ultrasonics*, 50(2), 269-272.
- Dinno, M. A., Dyson, M., Young, S. R., Mortimer, A. J., Hart, J., & Crum, L. A. (1989). The significance of membrane changes in the safe and effective use of therapeutic and diagnostic ultrasound. *Phys Med Biol*, 34(11), 1543-1552.
- Duvshani-Eshet, M., & Machluf, M. (2007). Efficient transfection of tumors facilitated by long-term therapeutic ultrasound in combination with contrast agent: from in vitro to in vivo setting. *Cancer Gene Ther*, 14(3), 306-315.
- Enwemeka, C. S., Rodriguez, O., & Mendosa, S. (1990). The biomechanical effects of low-intensity ultrasound on healing tendons. *Ultrasound Med Biol*, 16(8), 801-807.
- Geng, Y., McQuillan, D., & Roughley, P. J. (2006). SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol*, 25(8), 484-491.
- Harvey, W., Dyson, M., Pond, J. B., & Grahame, R. (1975). The stimulation of protein synthesis in human fibroblasts by therapeutic ultrasound. *Rheumatol Rehabil*, 14(4), 237.
- Hauff, P., Seemann, S., Reszka, R., Schultze-Mosgau, M., Reinhardt, M., Buzasi, T., et al. (2005). Evaluation of gas-filled microparticles and sonoporation as gene delivery system: feasibility study in rodent tumor models. *Radiology*, 236(2), 572-578.
- Hayashi, S., Mizuno, M., Yoshida, J., & Nakao, A. (2009). Effect of sonoporation on cationic liposome-mediated IFN β gene therapy for metastatic hepatic tumors of murine colon cancer. *Cancer Gene Ther*, 16(8), 638-643.
- Hildebrand, K. A., Frank, C. B., & Hart, D. A. (2004). Gene intervention in ligament and tendon: current status, challenges, future directions. *Gene Ther*, 11(4), 368-378.
- Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol*, 26(2), 365-369.
- Hou, Y., Mao, Z., Wei, X., Lin, L., Chen, L., Wang, H., et al. (2009). Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol*.
- Jayankura, M., Boggione, C., Frisen, C., Boyer, O., Fouret, P., Saillant, G., et al. (2003). In situ gene transfer into animal tendons by injection of naked DNA and electrotransfer. *J Gene Med*, 5(7), 618-624.
- Kaddur, K., Lebegue, L., Tranquart, F., Midoux, P., Pichon, C., & Bouakaz, A. Transient transmembrane release of green fluorescent proteins with sonoporation. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 57(7), 1558-1567.
- Karnes, J. L., & Burton, H. W. (2002). Continuous therapeutic ultrasound accelerates repair of contraction-induced skeletal muscle damage in rats. *Arch Phys Med Rehabil*, 83(1), 1-4.
- Kobayashi, Y., Sakai, D., Iwashina, T., Iwabuchi, S., & Mochida, J. (2009). Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation, proteoglycan synthesis and expression of growth factor-related genes in human nucleus pulposus cell line. *Eur Cell Mater*, 17, 15-22.
- Koike, H., Tomita, N., Azuma, H., Taniyama, Y., Yamasaki, K., Kunugiza, Y., et al. (2005). An efficient gene transfer method mediated by ultrasound and microbubbles into the kidney. *J Gene Med*, 7(1), 108-116.
- Kotopoulos, S., & Postema, M. Microfoam formation in a capillary. *Ultrasonics*, 50(2), 260-268.
- Lou, J. (2000). In vivo gene transfer into tendon by recombinant adenovirus. *Clin Orthop Relat Res*(379 Suppl), S252-255.
- Lu, Q. L., Liang, H. D., Partridge, T., & Blomley, M. J. (2003). Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage. *Gene Ther*, 10(5), 396-405.
- Manome, Y., Nakamura, M., Ohno, T., & Furuhashi, H. (2000). Ultrasound facilitates transduction of naked plasmid DNA into colon carcinoma cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther*, 11(11), 1521-1528.

- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R. H. (2005). Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *J Control Release*, 104(1), 213-222.
- Meijering, B. D., Juffermans, L. J., van Wamel, A., Henning, R. H., Zuhorn, I. S., Emmer, M., et al. (2009). Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res*, 104(5), 679-687.
- Miller, D. L., Bao, S., & Morris, J. E. (1999). Sonoporation of cultured cells in the rotating tube exposure system. *Ultrasound Med Biol*, 25(1), 143-149.
- Mortimer, A. J., & Dyson, M. (1988). The effect of therapeutic ultrasound on calcium uptake in fibroblasts. *Ultrasound Med Biol*, 14(6), 499-506.
- Nakamura, N., Shino, K., Natsuume, T., Horibe, S., Matsumoto, N., Kaneda, Y., et al. (1998). Early biological effect of *in vivo* gene transfer of platelet-derived growth factor (PDGF)-B into healing patellar ligament. *Gene Ther*, 5(9), 1165-1170.
- Ozkan, I., Shino, K., Nakamura, N., Natsuume, T., Matsumoto, N., Horibe, S., et al. (1999). Direct *in vivo* gene transfer to healing rat patellar ligament by intra-arterial delivery of haemagglutinating virus of Japan liposomes. *Eur J Clin Invest*, 29(1), 63-67.
- Pan, H., Zhou, Y., Izadnegahdar, O., Cui, J., & Deng, C. X. (2005). Study of sonoporation dynamics affected by ultrasound duty cycle. *Ultrasound Med Biol*, 31(6), 849-856.
- Pichon, C., Kaddur, K., Midoux, P., Tranquart, F., & Bouakaz, A. (2008). Recent advances in gene delivery with ultrasound and microbubbles. *Journal of Experimental Nanoscience*, 3(1), 17-40.
- Postema, M., & Gilja, O. H. (2007). Ultrasound-directed drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol*, 8(6), 355-361.
- Postema, M., & Schmitz, G. (2005). Ultrasonic fragmentation of microbubbles: a theoretical approach of the flash in flash-echo. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 4(1), 4023-4026.
- Qin, L., Lu, H., Fok, P., Cheung, W., Zheng, Y., Lee, K., et al. (2006). Low-intensity pulsed ultrasound accelerates osteogenesis at bone-tendon healing junction. *Ultrasound Med Biol*, 32(12), 1905-1911.
- Ramirez, A., Schwane, J. A., McFarland, C., & Starcher, B. (1997). The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation *in vitro*. *Med Sci Sports Exerc*, 29(3), 326-332.
- Sakakima, Y., Hayashi, S., Yagi, Y., Hayakawa, A., Tachibana, K., & Nakao, A. (2005). Gene therapy for hepatocellular carcinoma using sonoporation enhanced by contrast agents. *Cancer Gene Ther*, 12(11), 884-889.
- Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., et al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*, 7, 3.
- Sheyn, D., Kimelman-Bleich, N., Pelled, G., Zilberman, Y., Gazit, D., & Gazit, Z. (2008). Ultrasound-based nonviral gene delivery induces bone formation *in vivo*. *Gene Ther*, 15(4), 257-266.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
- Suwalski, A., Dabboue, H., Delalande, A., Bensamoun, S. F., Canon, F., Midoux, P., et al. Accelerated Achilles tendon healing by PDGF gene delivery with mesoporous silica nanoparticles. *Biomaterials*, 31(19), 5237-5245.
- Svensson, L., Aszodi, A., Reinholt, F. P., Fassler, R., Heinegard, D., & Oldberg, A. (1999). Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem*, 274(14), 9636-9647.
- Taniyama, Y., Tachibana, K., Hiraoka, K., Namba, T., Yamasaki, K., Hashiya, N., et al. (2002). Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound. *Circulation*, 105(10), 1233-1239.
- Walsh, W. R., Stephens, P., Vizesi, F., Bruce, W., Huckle, J., & Yu, Y. (2007). Effects of low-intensity pulsed ultrasound on tendon-bone healing in an intra-articular sheep knee model. *Arthroscopy*, 23(2), 197-204.
- Wang, X., Liang, H. D., Dong, B., Lu, Q. L., & Blomley, M. J. (2005). Gene transfer with microbubble ultrasound and plasmid DNA into skeletal muscle of mice: comparison between commercially available microbubble contrast agents. *Radiology*, 237(1), 224-229.
- Wei, W., Bian, Z. Z., Wu, Y. J., Yan, L. F., & Miao, Y. L. (2004). A novel approach to quantitative ultrasonic naked gene delivery and its non-invasive assessment. *Ultrasonics*, 43(2), 69-77.
- Young, S. R., & Dyson, M. (1990). The effect of therapeutic ultrasound on angiogenesis. *Ultrasound Med Biol*, 16(3), 261-269.

RESULTATS. PARTIE 3 – ÉTUDES DU MÉCANISME DE TRANSFERT DE GÈNE PAR SONOPORATION

I) INTERACTION ENTRE MICROBULLES DE GAZ ET CELLULES SOUS ULTRASONS.

1) INTRODUCTION

Afin de mieux comprendre le mécanisme impliqué dans la sonoporation nous avons travaillé sur le comportement des microbulles ainsi que sur le devenir du plasmide et des microbulles utilisées lors de la technique de sonoporation. Tout d'abord deux dispositifs expérimentaux ont été mis au point pour étudier la sonoporation *in vitro*. Un premier dispositif a été créé pour le transfert de gène par sonoporation sur des cellules adhérentes, le second a été créé pour visualiser les cellules et les microbulles en temps réel sous un microscope de fluorescence confocal.

2) PUBLICATION

L'ensemble des résultats obtenus dans cette partie ont fait l'objet d'une publication à paraître dans Bubble Science, Engineering and Technology.

- Delalande A, Kotopoulis S, Rovers T, Pichon C, Postema M - Sonoporation at a low mechanical index. Bubble Science, Engineering and Technology. 2011 3(1).

SONOPORATION AT A LOW MECHANICAL INDEX

Anthony Delalande¹, Spiros Kotopoulos², Tijs Rovers³, Chantal Pichon¹, Michiel Postema^{1, 2, 3, 4*}

1. *Centre de Biophysique Moléculaire, UPR 4301 CNRS affiliated to the University of Orléans, rue Charles Sadron, 45071 Orléans CEDEX 2, France*
2. *Department of Engineering, The University of Hull, Cottingham Road, Kingston upon Hull HU6 7RX, United Kingdom*
3. *Emmy Noether Research Group, Institute of Medical Engineering, Department of Electrical Engineering and Information Sciences, Ruhr-Universität Bochum, ID 04/24, 44780 Bochum, Germany*
4. *Department of physics and technology, University of Bergen, Allégaten 55, 5007 Bergen, Norway*

* Corresponding author

ABSTRACT

Purpose: The purpose of this study was to investigate the physical mechanisms of sonoporation, in order to understand and improve ultrasound-assisted drug and gene delivery. Sonoporation is the transient permeabilisation and resealing of a cell membrane with the help of ultrasound and/or an ultrasound contrast agent, allowing for the trans-membrane delivery and cellular uptake of macromolecules between 10 kDa and 3MDa.

Methods: We studied the behaviour of ultrasound contrast agent microbubbles near cancer cells at low acoustic amplitudes. After administering an ultrasound contrast agent, HeLa cells were subjected to 6.6-MHz ultrasound with a mechanical index of 0.2 and observed with a high-speed camera.

Results: Microbubbles were seen to enter cells and rapidly dissolve. The quick dissolution after entering suggests that the microbubbles lose (part of) their shell whilst entering.

Conclusions: We have demonstrated that lipid-shelled microbubbles can be forced to enter cells at a low mechanical index. Hence, if a therapeutic agent is added to the shell of the bubble or inside the bubble, ultrasound-guided delivery could be facilitated at diagnostic settings. In addition, these results may have implications for the safety regulations on the use of ultrasound contrast agents for diagnostic imaging.

Keywords: Sonoporation, Low mechanical index, Microbubbles, Ultrasound contrast agent, HeLa cells, Cell penetration

INTRODUCTION

Sonoporation is the transient permeabilisation and resealing of a cell membrane with the help of ultrasound and/or an ultrasound contrast agent, allowing for the trans-membrane delivery and cellular uptake of macromolecules between 10 kDa and 3MDa (Postema & Gilja, 2007). Many studies have demonstrated increased drug and gene uptake of sites under sonication. These studies presumed, that a physical membrane disruption mechanism, *i.e.*, sonoporation, caused the increased uptake, as opposed to naturally occurring active uptake processes, such as endocytosis, that are controlled by the system biology (Bao *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2003; Greenleaf *et al.*, 1998; Kondo *et al.*, 2004; Kudo *et al.*, 2009; Lindner & Kaul, 2001; Tachibana *et al.*, 1999; Tinkov *et al.*, 2009). Although mechanical disruption with the aid of ultrasound has been attributed to violent side effects of inertial cavitation and microbubble fragmentation, most notably, the increased uptake has also been observed at low acoustic amplitudes, *i.e.*, in acoustic regimes where inertial cavitation and microbubble fragmentation are not to be expected. An ultrasound contrast agent microbubble might act as a vehicle to carry a drug or gene load to a perfused region of interest. If the same ultrasound field that has been implicated in the sonoporation process can cause release of the therapeutic load, this load could be delivered into cells. Apart from plainly mixing ultrasound contrast agents with therapeutic agents, several schemes have been proposed to incorporate therapeutic loads to microbubbles. These include loads to the microbubble shell (Klibanov, 1999), therapeutic gases inside the microbubble (Postema *et al.*, 2006), gas-filled lipospheres containing drugs (Shortencarier *et al.*, 2004), and drug-filled antibubbles (Postema *et al.*, 2007). To understand and ameliorate ultrasound-assisted drug and gene delivery, the physics of controlled release and of sonoporation have been under investigation. That objective also forms the focus for this paper. Moreover, we studied the behaviour of ultrasound contrast agent microbubbles near cancer cells deliberately at low acoustic amplitudes in order to probe whether sonoporation in this regime was possible; and if so, to ascertain what the microscopic mechanism might entail; and finally, to assess and scrutinise the safety aspects of ultrasound exposure in this regime.

MECHANICAL INDEX

The mechanical index (MI) gives an indication of mechanical damage of tissue due to inertial cavitation. It is defined by:

$$MI = \frac{p^-}{\sqrt{f_c}} (1),$$

where p^- is the maximum value of peak negative pressure anywhere in the ultrasound field, measured in water but reduced by an attenuation factor equal to that which would be produced by a medium having an attenuation coefficient of $0.3 \text{ dB.cm}^{-1}.\text{MHz}^{-1}$, normalised by 1MPa, and f_c is the centre frequency of the ultrasound normalised by 1MHz. For $MI < 0.3$, the acoustic amplitude is considered low. For $0.3 > MI > 0.7$, there is a possibility of minor damage to neonatal lung or intestine (Society, 2000). These are considered moderate acoustic amplitudes. For $MI > 0.7$, there is a risk of cavitation if an ultrasound contrast agent containing gas microspheres is being used, and there is a theoretical risk of cavitation without the presence of ultrasound contrast agents (ter Haar, 2009). The risk increases with MI values above this threshold. These are considered high acoustic amplitudes. On commercial scanners, the MI has been limited to 1.9 for medical imaging (Voigt, 2009). At low MI, microbubbles pulsate linearly, whereas at high MI, their greater expansion phase is followed by a violent collapse. During the collapse phase, when the kinetic energy of the bubble surpasses its surface energy, a bubble may fragment into a number of smaller bubbles. Fragmentation has been exclusively observed with contrast agents with thin, elastic shells. Fragmentation is the dominant disruption mechanism for these bubbles (Postema & Schmitz, 2007). Although the fragmentation of therapeutic load-bearing microbubbles must release their loads, the

actual drug or gene delivery is in this case a passive process, dependent on diffusion rate and proximity to the target cells. Fragmenting microbubbles may not create pores in cells, since fragmentation costs energy. However, if a microbubble collapses near a free or a solid boundary, the retardation of the liquid near the boundary may cause an asymmetry. This asymmetry causes differences in acceleration on the bubble surface. During further collapse, a funnel-shaped jet may protrude through the microbubble, shooting liquid to the boundary (Philipp & Lauterborn, 1998). The pore size created by a jet has been empirically related to the microbubble expansion (Kodama & Takayama, 1998). If jets could be directed to cell layers, in case of a microbubble carrying a therapeutic load, the load could be delivered into cells. The jet formation is effected by the cavitation topology, synergistically interacting with local fluid dynamics arising through the bubble's expansion and contraction due to the ultrasound field. However, as the fluid forming the microjet is just the bulk fluid which carries no therapeutic agent, then there is no guarantee that, even with the formation of a sonopore due to jet impact with the cell membrane, therapeutic agent will enter the cell. It needs to be dislodged and mobilised from the bubble first. Furthermore, jetting has not been observed at low or moderate MI (Postema *et al.*, 2005), so that fragmentation is likely to occur before any delivery takes place. By pushing the loaded microbubbles towards the vessel wall using primary radiation forces (Dayton *et al.*, 2002), release can take place closer to target vessels. In a recent study, Caskey *et al.* pushed bubbles into tissue-mimicking gels at MI=1.5 (Caskey *et al.*, 2009). We previously studied how microclusters consisting of lipid-encapsulated microbubbles can be formed using primary and secondary radiation forces, and how these clusters can be pushed towards vessel walls (Kotopoulos & Postema). We found that, even at MI<0.15, microbubble clusters can be formed and pushed within seconds.

SONOPORATION

There are five non-exclusive hypotheses for explaining the sonoporation phenomenon. These have been summarised in Figure 1: push, pull, jetting, shear, and translation (Postema *et al.*, 2011). It has been hypothesised that expanding microbubbles might push the cell membrane inward, and that collapsing bubbles might pull cell membranes outward (van Wamel *et al.*, 2006). These mechanisms require microbubbles to be present in the close vicinity of cells. A separate release mechanism should then ensure localised delivery. Although jetting only occurs in a high-MI regime, it is very effective in puncturing cell membranes. Jetting has been observed through cells using ultrasound contrast agent microbubbles. However, the acoustic impedance of the solid cell substratum formed the boundary to which the jetting took place, not the cell itself (Prentice *et al.*, 2005). Also, there has not been any proof yet of cell survival after jetting. In a separate study, we excluded the role of jetting as a dominant mechanism in sonoporation (Postema & Gilja, 2010). If a microbubble is fixed to a membrane, the fluid streaming around the oscillating bubbles creates enough shear to rupture the membrane (Marmottant & Hilgenfeldt, 2003). Here again, separate release mechanism should then ensure localized delivery. Finally, it has been speculated that lipid-encapsulated microbubbles, in compressed phase, translate through cell membranes or channels in the cell membrane. In case of therapeutic loading, the load would be delivered directly into the target cell. The main advantage of the latter mechanism is that microbubble translation by means of ultrasonic radiation forces requires very low acoustic pressures. Hence, and potential damaging bioeffects due to inertial cavitation can be ruled out.

MATERIALS AND METHODS

SONOPORATION CONFIGURATION

In previous studies, increased gene uptake was demonstrated at MI<0.3 (Delalande *et al.*; Kaddur *et al.*). We used a similar sonoporation configuration for our experiments. An overview of the experimental setup is shown in Figure 2. A signal consisting of 50 cycles with a centre frequency of

6.6MHz and a pulse repetition frequency of 10 kHz, *i.e.*, a duty cycle of 7.5%, was generated by an AFG3102, dual channel arbitrary function generator (Tektronix, Inc., Beaverton, OR, USA), amplified by a 150A250 radio-frequency (RF) amplifier (Amplifier Research, Souderton, PA, USA) set to maximum gain, and fed to a custom-built 6.6MHz ultrasound transducer with a hexagonal lithium niobate γ -36° cut active element with a maximum width of 25mm (Kotopoulos *et al.*, 2010). The peak-negative acoustic pressure was measured to be 0.5MPa in a separate tank and in the sonication chamber itself. This corresponds to an MI of 0.2. The transducer was placed in a custom-built, 260x160x150 mm³ perspex sonication chamber, in which an OptiCell® cell culture chamber (Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Germany) was placed. One side of the cell culture chamber contained a monolayer of 1.6×10^6 HeLa cells that had been cultured in MEM with Earl's salts medium (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) supplemented with 10% v/v heat-inactivated fetal calf serum, GlutaMAX (Life Technologies Gibco, Paisley, Renfrewshire, UK), 1% v/v of non-essential amino-acids (PAA), penicillin (100 units.ml⁻¹) and streptomycin (100 µg.ml⁻¹) (PAA), at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The cells were used when there was 60–80% confluency. Ultrasound contrast agent was injected into the cell culturing chamber before each experiment. Several lipid-shelled ultrasound contrast agents were tested in this study. In this paper, we present results of a 3.33% dilution of MicroMarker® (VisualSonics B.V., Amsterdam, Netherlands), a lipid-shelled agent with a mean diameter of 2.5µm. A customised BXFM-F microscope unit with an LCach N 20X/0.40 PhC (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) and a LUMPlanFL 60X/0.90 water-immersion objective (Olympus) was placed on top of the sonication chamber. The colour charge coupled device (CCD) of a PHOTRON FastCam MC-2.1 high-speed camera (VKT Video Kommunikation GmbH, Pfullingen, Germany) was connected to the microscope. The sensor was rotated to make sure that in all recorded movies, the ultrasound is directed from the left to the right of the frame.

FLUORESCENCE CONFIGURATION

An overview of the setup used for the fluorescence experiments is shown in Figure 3. It is almost identical to the setup described in the previous section. However, here, the signal consisting of 40 cycles with a centre frequency of 6.6MHz and a pulse repetition frequency of 10 kHz, *i.e.*, a duty cycle of 6.1%, was amplified using a 2100L, +50 dB RF amplifier (Electronics & Innovation, Rochester, NY, USA) and fed to our custom-built 6.6-MHz ultrasound transducer (Kotopoulos *et al.*, 2010). Prior to injection in the OptiCell®, the MicroMarker® contrast agent was labelled using a DiD (DiI_{C18}(5)) lipophilic fluorescent probe (Vybrant, Molecular probes, Invitrogen, San Diego, CA, USA). A ratio of 1µl of DiD to 40 µl MicroMarker® was homogenised by pipetting and incubating for 5 minutes at room temperature. Figure 4 shows how the DiD fluorescent probe bonded to the phospholipid (Livanec & Dunn, 2008). Emitted λ =649–703nm fluorescence was localised on the microbubble shell when exciting at λ =633 nm. A custom-made aluminium sonication chamber with internal dimensions of 130x170x35 mm³ was locked into to the xy-stage of a 200M inverted confocal microscope (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) coupled with a LSM Axiovert 510 scanning device (Carl Zeiss), using an EC Plan-Neofluar 40x/1.30. Oil DIC M27 objective (Carl Zeiss AG), with automated z-stack functionality. The peak-negative acoustic pressure was measured at the objective's field of view and corresponded to MI = 0.2. To ensure that the microbubbles were not naturally attracted to the cells, 30 µl MicroMarker R was diluted into 700 µl of distilled water and tested for electrophoretic mobility (ζ -potential) using a Zetasizer 3000 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, United Kingdom). To measure the thickness of the cultured cells 10^5 HeLa cells were seeded into an OptiCell®. The cell plasma membrane was labelled with DiD lipophilic fluorescent probe (VybrantTM, Molecular probes) according to the manufacturers protocol. The membrane fluorescence was measured using a 200M confocal microscope. Cell thickness was calculated from the difference between the upper and lower slices where fluorescence was seen. We recorded 23 movies under 6.6-MHz sonication at frame rates between 500 and 2000 frames per second, representing 15

minutes of real-time exposure. Of these, 11 movies were recorded using fluorescence. In addition we recorded 10 control movies, with a total duration of 22 minutes.

RESULTS AND DISCUSSION

Throughout this section, the optical z-axis is defined from distal-to-focus (negative) to proximal-to-focus (positive), with $z = 0$ as the focal plane. Figure 5 shows z-stacks of fluorescence emitted by the DiD dye attached to the membranes of four typical HeLa cells, representing the cell geometry. In total, the thicknesses of 42 cells were measured. The cultured cells were found to be $13 \pm 2 \mu\text{m}$ thick. Clearly, these cells had thicknesses much greater than ultrasound contrast agent microbubble oscillations amplitudes at $MI=0.2$. We analyzed our optical system and compared our results to bubbles and cells that were slightly out of focus, to rule out that the movement of the bubble takes place in a plane different from that of the cell. Figure 6 shows a z-stack of two ultrasound contrast agent microbubbles, similar to Figure 10 of Postema *et al.* (Postema *et al.*, 2003). Proximal-to-focus Airy disks can be seen around the bubbles, whereas distal-to-focus the bubble boundaries are blurred. Note that the boundary contrast is maximal just proximal-to-focus (Postema *et al.*, 2003). At a centre frequency of 6.6MHz, we recorded 17 events of microbubbles entering HeLa cells. After entering, the microbubbles were observed to quickly dissolve. As an example, Figure 7 shows an event resampled at 3.4Hz and 40Hz, respectively, where two bubbles were pushed to a cell during 11s of sonication. A microbubble “A” of 4- μm diameter entered the cell and dissolved, whereas a microbubble “B” of 2- μm diameter stuck to the cell membrane. Figures 8 and 9 show two similar events, where fluorescence-coated microbubbles were used. The left panels show a microbubble apparently penetrating through the cell membrane in optical focus. Approximately 70ms after the ultrasound has been switched on a microbubble is seen to penetrate through the cell membrane in Figure 8. In Figure 9 the microbubble is seen to penetrate through the cell membrane approximately 24 ms after the ultrasound has been switched on. The right panels show a z-stack through the entire cell, to record whether the apparent microbubble entry is actually into the cell. For both events, Figure 10 shows average fluorescent intensities in two regions of interest, one inside the cell, and one control region. In both events, most fluorescence from apparent microbubble entry can be observed within 5 μm proximal to optical focus, thus well within the cells themselves. Figure 11 shows frames in optical focus from the events in Figures 8 and 9, before sonication and approximately 8 minutes after sonication. Clearly, fluorescence has transferred into the cells and remained inside the cells long after sonication. At these low acoustic amplitudes, inertial cavitation, fragmentation, and jetting should not occur. Hence, as a mechanism in sonoporation at low MI, these phenomena might justifiably be neglected. Our observations do not explain why some microbubbles enter a cell and others don't. The quick dissolution after entering suggests that the microbubble loses (part of) its shell whilst entering. The ζ -potential measurements showed that the microbubble shells had a charge of $-43.9 \pm 2.4\text{mV}$. As cells have a natural negative charge (Ehrenberg *et al.*, 1988; Takahashi *et al.*, 1993), the ultrasound contrast agent should be repelled by the cells, in our recordings we see that, once the ultrasound was turned on, the microbubbles would be attracted to the closest cell, independent of the direction of the sound field. This supports the recent finding that cell membranes can be acoustically active (Krasovitski *et al.*), and therefore interact with microbubbles. Other cell types than HeLa cells must be used in follow-up studies, to investigate differences in bubble-cell interaction.

CONCLUSIONS

We have demonstrated that lipid-shelled microbubbles can be forced to enter cells at a low MI. Hence, if a therapeutic load is added to the bubble, ultrasound-guided delivery could be facilitated at diagnostic settings. In addition, these results may have implications for the safety regulations on the use of ultrasound contrast agents for diagnostic imaging.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by DFG Emmy Noether Programme Grant 38355133 and EPSRC Grant EP/F037025/1. The authors are grateful to Conseil Regional for A. Delalande's fellowship.

LIST OF FIGURES

1. Possible mechanisms of sonoporation: a) push, b) pull, c) jetting, d) shear, e) translation. Based on Figure 9.2 in Postema *et al.* (Postema *et al.*, 2011).
2. Experimental setup (*top*) and a close-up of the sonoporation configuration (*bottom*).
3. Experimental setup (*top*) and a close-up of the fluorescence configuration (*bottom*).
4. Schematic representation of DiD (DiI_{C18}(5)) lipophilic fluorescent probe bonding to phospholipid (Livanec & Dunn, 2008).
5. z-stacks of fluorescence emitted by the DiD dye attached to the membranes of four typical HeLa cells, representing the cell geometry.
6. z-stack of two ultrasound contrast agent microbubbles. Proximal-to-focus Airy disks can be seen around the bubbles, whereas distal-to-focus the bubble boundaries are blurred. Microbubble A has a diameter of 2 μm , whereas microbubble B has a diameter of 3 μm . Each frame corresponds to a $11 \times 11 \mu\text{m}^2$ area.
7. A sonoporation event including microbubble dissolution during 11 s of sonication (*left*) and selected frames of the microbubble entering a cell (*right*). Microbubble "A" entered the cell and dissolved, whereas microbubble "B" stuck to the cell membrane. Each frame corresponds to a $23 \times 23 \mu\text{m}^2$ area.
8. Microbubble of 5- μm diameter apparently penetrating through the cell membrane in optical focus (*left*); z-stack through the entire cell, to record whether the apparent microbubble entry is actually into the cell (*right*). Areas (A) and (C) are regions of interest inside and outside the cell, respectively. Each frame corresponds to a $76 \times 76 \mu\text{m}^2$ area.
9. Microbubble of 4- μm diameter apparently penetrating through the cell membrane in optical focus (*left*); z-stack through the entire cell, to record whether the apparent microbubble entry is actually into the cell (*right*). Areas (A) and (C) are regions of interest of high fluorescence and low fluorescence, respectively, inside the cell. The white dotted line in the upper left frame of the right panel indicates the cell membrane. Each frame corresponds to a $52 \times 52 \mu\text{m}^2$ area.
10. Average fluorescent intensities in the regions of interest (ROI) of Figures 8 (*left*) and 9 (*right*). Bold lines represent ROI (A) inside the cells, whereas hairlines represent ROI (C) the control regions. The dotted line represents the cell boundary contrast. Note that the cell boundary contrast is maximal just proximal-to-focus.
11. Columns (a) and (b) represent frames in optical focus from the events in Figures 8 and 9, respectively, before sonication and approximately 8 minutes after sonication. The white dotted lines in the right frames indicate the cell membrane boundary. The left frames correspond to $76 \times 76 \mu\text{m}^2$ areas, whereas the right frames correspond to $45 \times 45 \mu\text{m}^2$ areas.

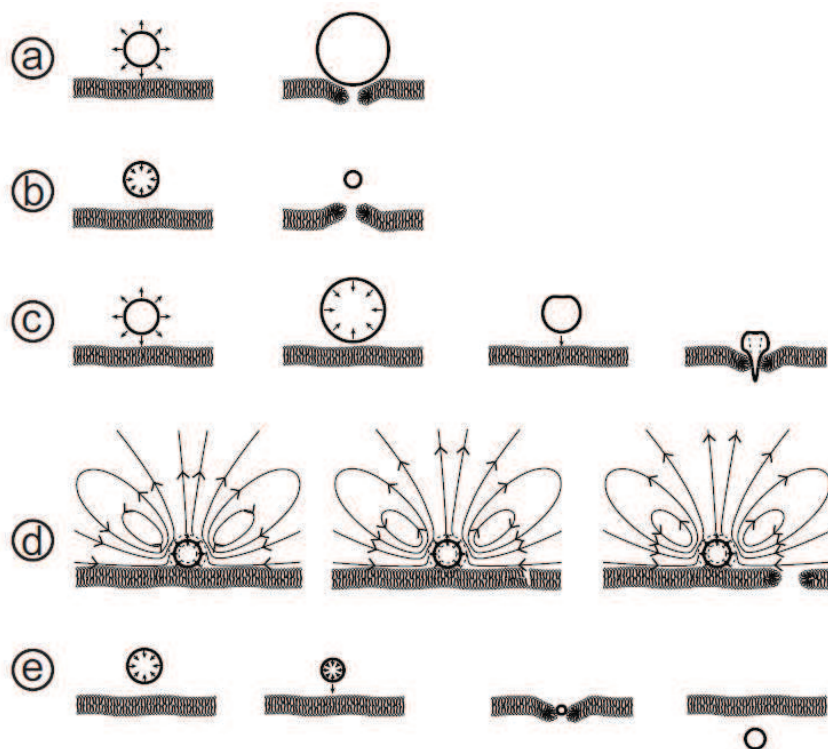


Figure 1: Possible mechanisms of sonoporation: a) push, b) pull, c) jetting, d) shear, e) translation. Based on Figure 9.2 in Postema *et al.*²⁴

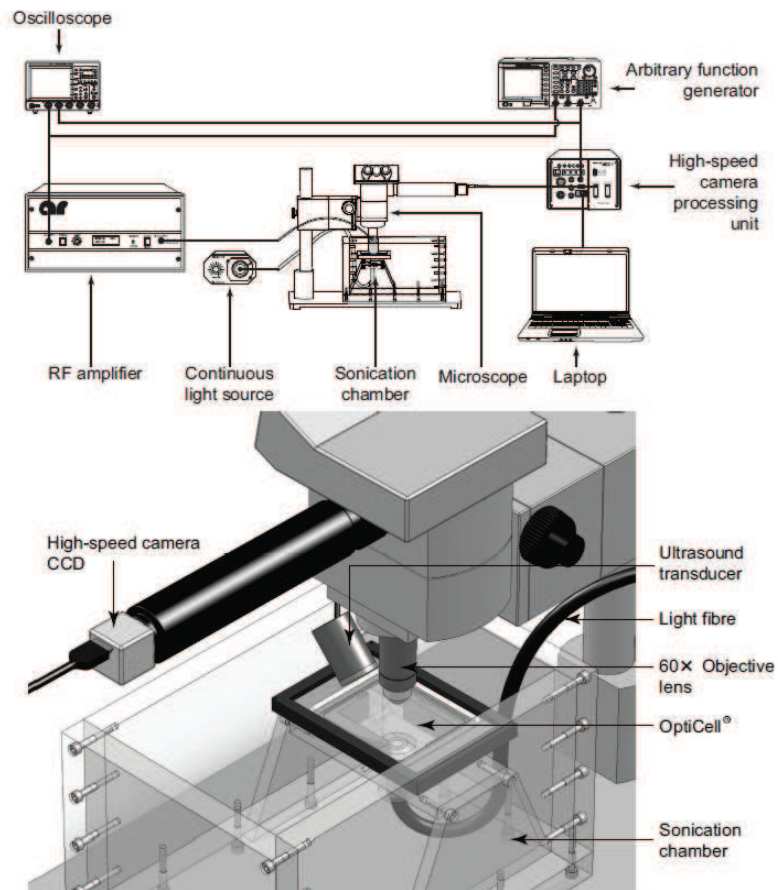


Figure 2: Experimental setup (*top*) and a close-up of the sonoporation configuration (*bottom*).

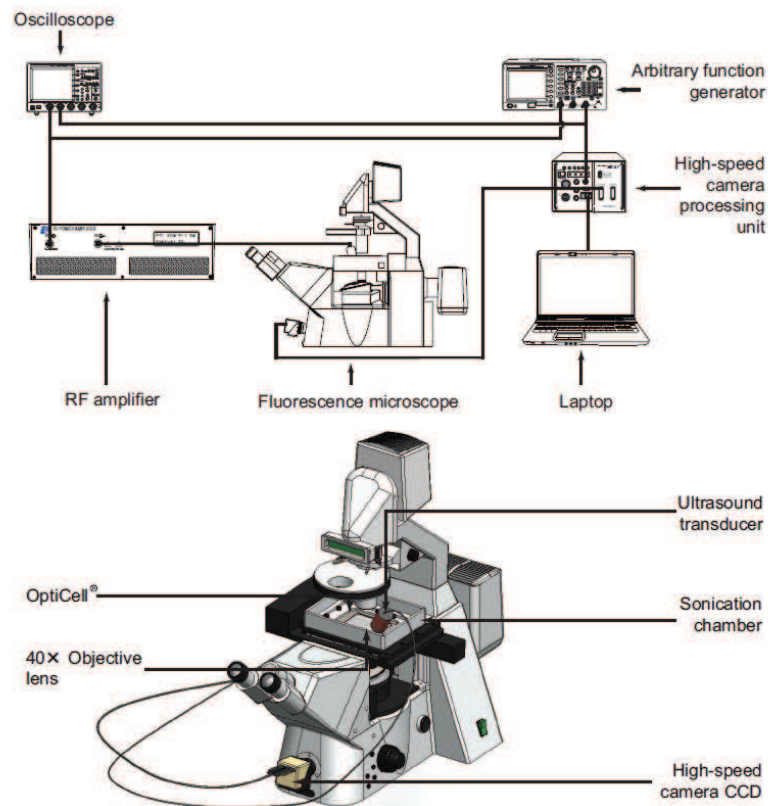


Figure 3: Experimental setup (*top*) and a close-up of the fluorescence configuration (*bottom*).

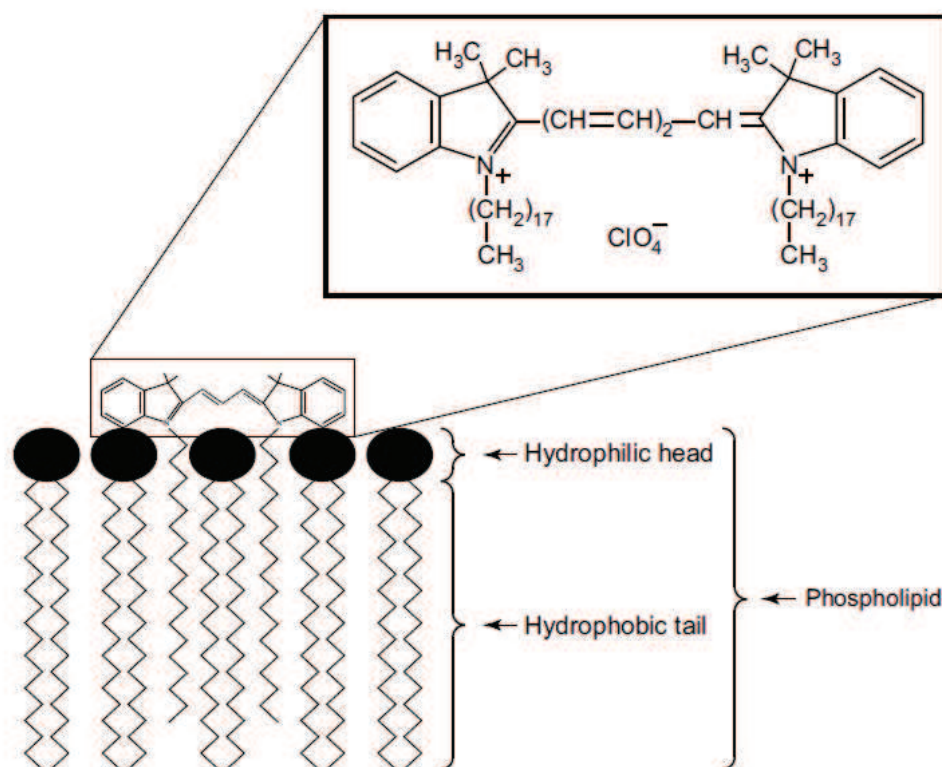


Figure 4: Schematic representation of DiD (DilC₁₈(5)) lipophilic fluorescent probe bonding to phospholipid.³²

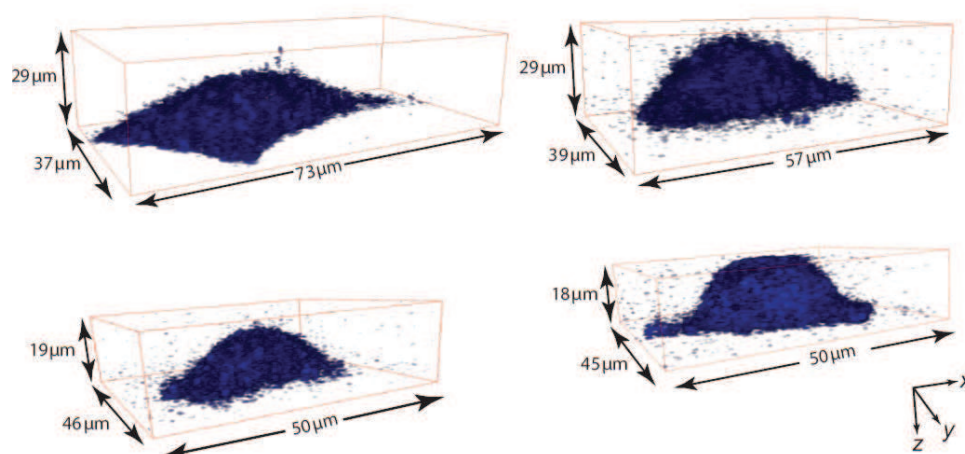


Figure 5: *z*-stacks of fluorescence emitted by the DiD dye attached to the membranes of four typical HeLa cells, representing the cell geometry.

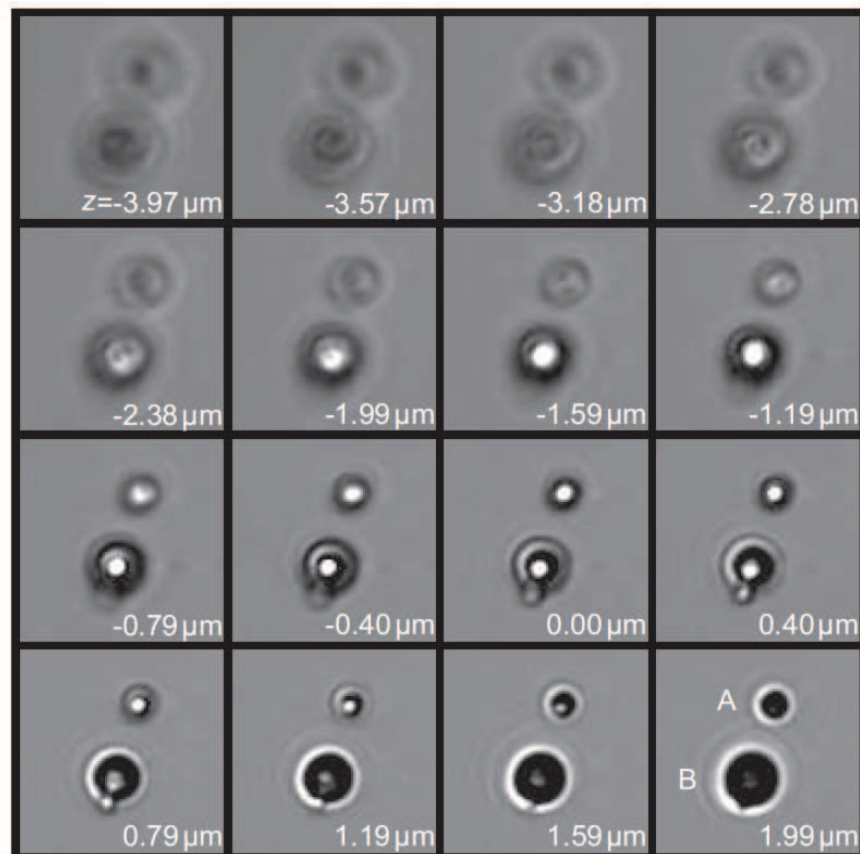


Figure 6: z -stack of two ultrasound contrast agent microbubbles. Proximal-to-focus Airy disks can be seen around the bubbles, whereas distal-to-focus the bubble boundaries are blurred. Microbubble A has a diameter of $2\text{ }\mu\text{m}$, whereas microbubble B has a diameter of $3\text{ }\mu\text{m}$. Each frame corresponds to a $11 \times 11\text{ }(\mu\text{m})^2$ area.

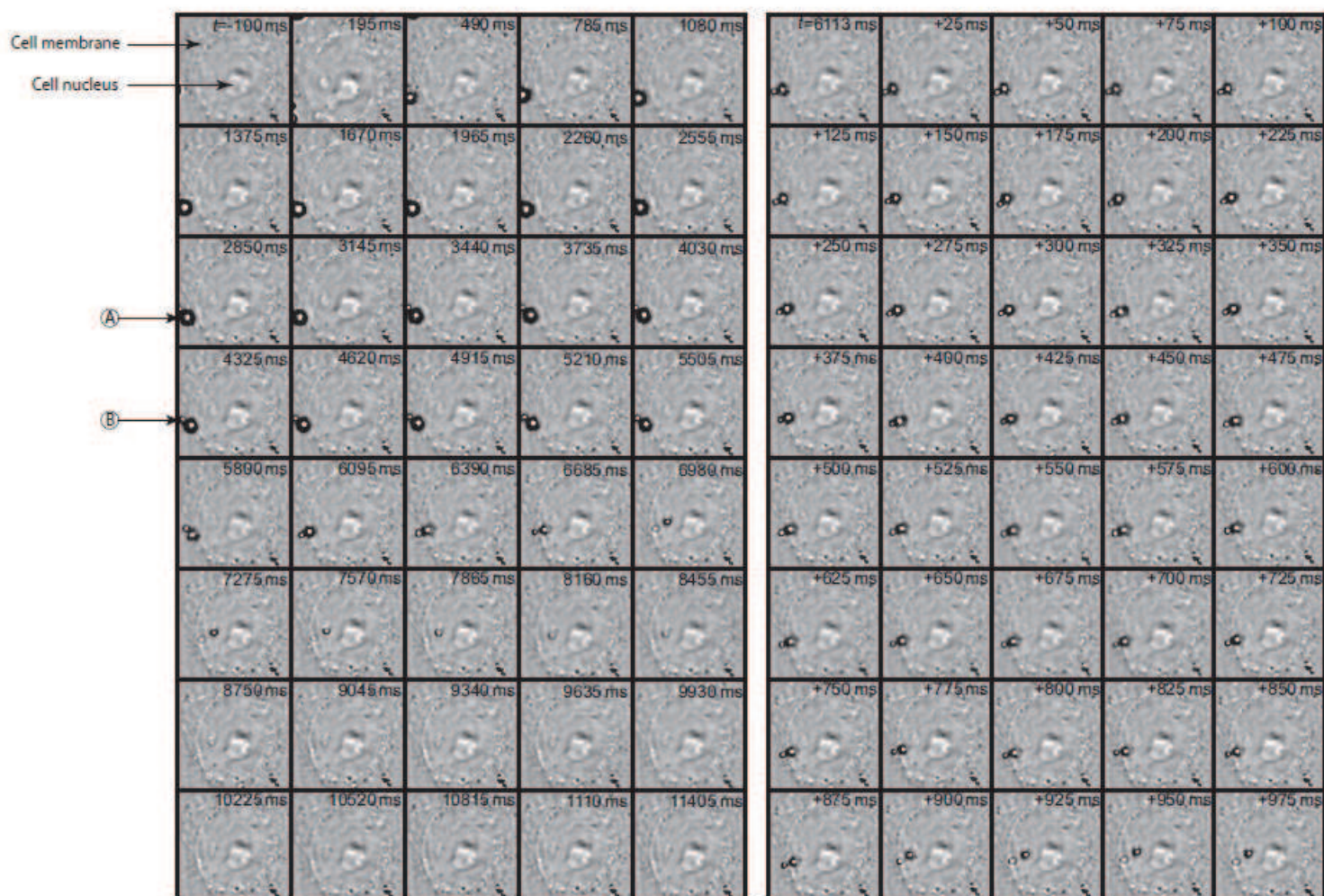


Figure 7: A sonoporation event including microbubble dissolution during 11 s of sonication (*left*) and selected frames of the microbubble entering a cell (*right*). Microbubble “A” entered the cell and dissolved, whereas microbubble “B” stuck to the cell membrane. Each frame corresponds to a $23 \times 23 (\mu\text{m})^2$ area.

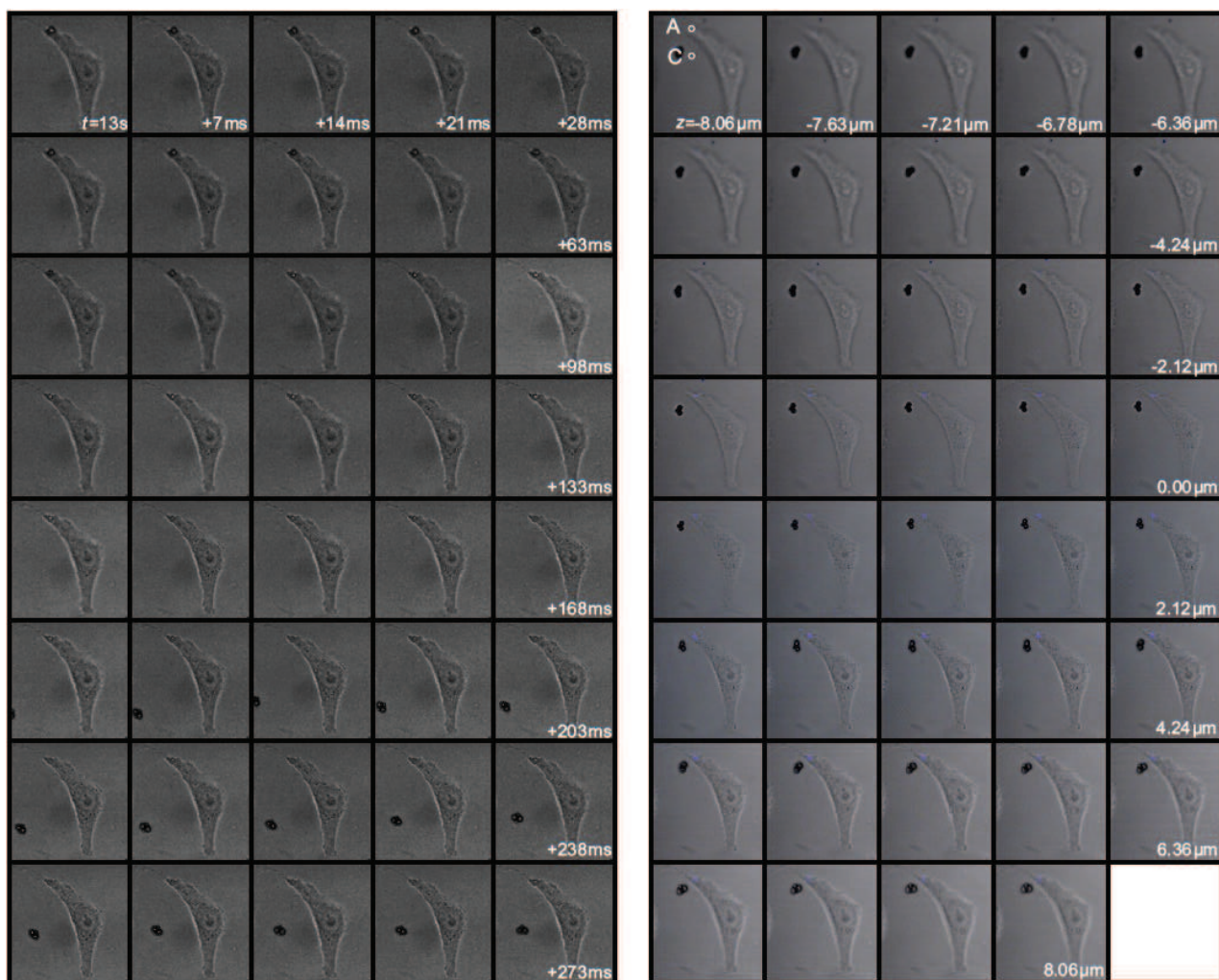


Figure 8: Microbubble of 5- μm diameter apparently penetrating through the cell membrane in optical focus (*left*); z-stack through the entire cell, to record whether the apparent microbubble entry is actually into the cell (*right*). Areas (A) and (C) are regions of interest inside and outside the cell, respectively. Each frame corresponds to a $76 \times 76 (\mu m)^2$ area.

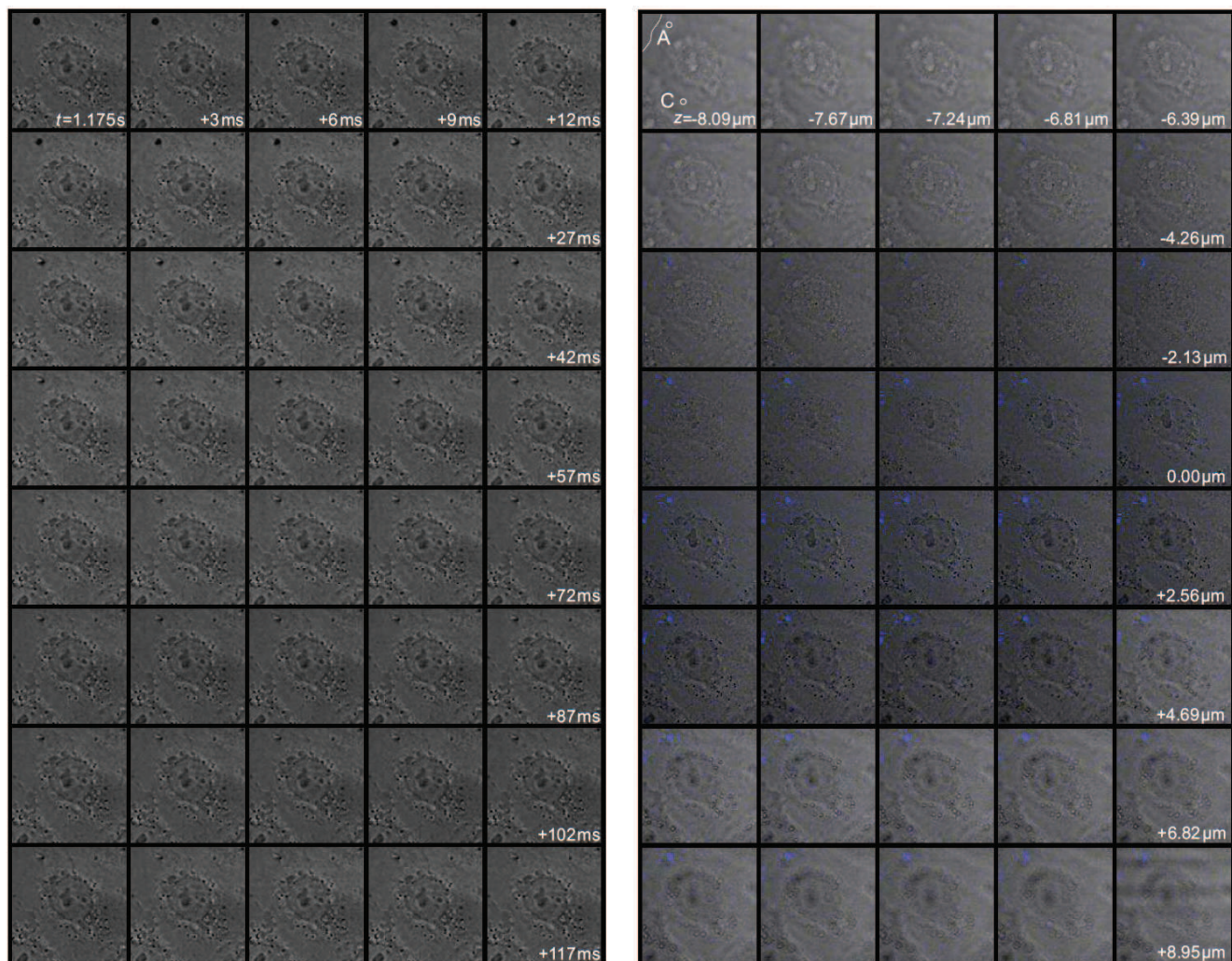


Figure 9: Microbubble of $4\text{-}\mu\text{m}$ diameter apparently penetrating through the cell membrane in optical focus (*left*); z -stack through the entire cell, to record whether the apparent microbubble entry is actually into the cell (*right*). Areas (A) and (C) are regions of interest of high fluorescence and low fluorescence, respectively, inside the cell. The white dotted lines in the upper left frame of the right panel indicates the cell membrane. Each frame corresponds to a $52 \times 52 (\mu\text{m})^2$ area.

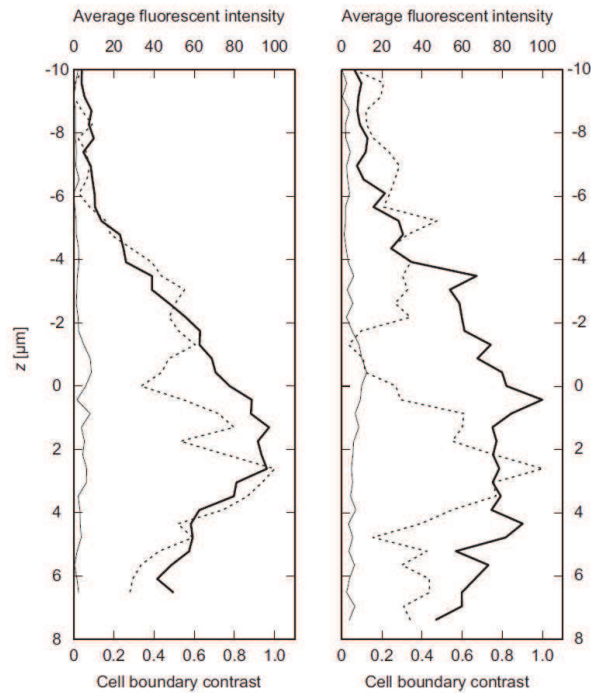


Figure 10: Average fluorescent intensities in the regions of interest (ROI) of Figures 8 (*left*) and 9 (*right*). Bold lines represent ROI (A) inside the cells, whereas hairlines represent ROI (C) the control regions. The dotted line represents the cell boundary contrast. Note that the cell boundary contrast is maximal just proximal to focus.

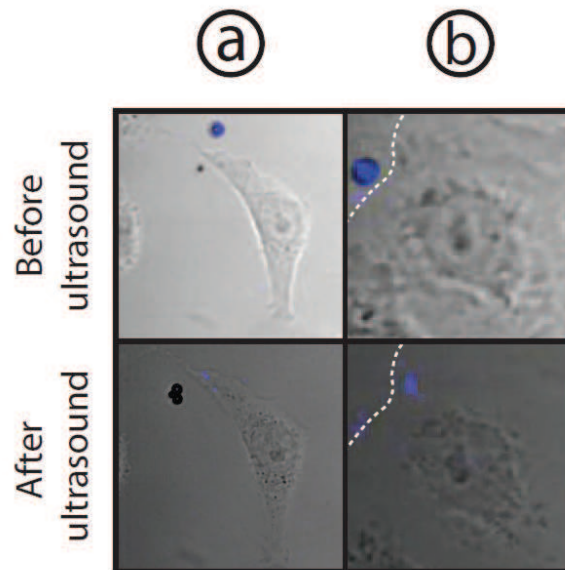


Figure 11: Columns (a) and (b) represent frames in optical focus from the events in Figures 8 and 9, respectively, before sonication and approximately 8 minutes after sonication. The white dotted lines in the right frames indicate the cell membrane boundary. The left frames correspond to $76 \times 76 (\mu\text{m})^2$ areas, whereas the right frames correspond to $45 \times 45 (\mu\text{m})^2$ areas.

REFERENCES

- Bao, S., Thrall, B. D., & Miller, D. L. (1997). Transfection of a reporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 23(6), 953-959.
- Caskey, C. F., Qin, S., Dayton, P. A., & Ferrara, K. W. (2009). Microbubble tunneling in gel phantoms. *J Acoust Soc Am*, 125(5), EL183-189.
- Chen, S., Shohet, R. V., Bekereditian, R., Frenkel, P., & Grayburn, P. A. (2003). Optimization of ultrasound parameters for cardiac gene delivery of adenoviral or plasmid deoxyribonucleic acid by ultrasound-targeted microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol*, 42(2), 301-308.
- Dayton, P. A., Allen, J. S., & Ferrara, K. W. (2002). The magnitude of radiation force on ultrasound contrast agents. *J Acoust Soc Am*, 112(5 Pt 1), 2183-2192.
- Delalande, A., Bureau, M. F., Midoux, P., Bouakaz, A., & Pichon, C. Ultrasound-assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy. *Ultrasonics*, 50(2), 269-272.
- Ehrenberg, B., Montana, V., Wei, M. D., Wuskell, J. P., & Loew, L. M. (1988). Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*, 53(5), 785-794.
- Greenleaf, W. J., Bolander, M. E., Sarkar, G., Goldring, M. B., & Greenleaf, J. F. (1998). Artificial cavitation nuclei significantly enhance acoustically induced cell transfection. *Ultrasound Med Biol*, 24(4), 587-595.
- Kaddur, K., Lebegue, L., Tranquart, F., Midoux, P., Pichon, C., & Bouakaz, A. Transient transmembrane release of green fluorescent proteins with sonoporation. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 57(7), 1558-1567.
- Klibanov, A. L. (1999). Targeted delivery of gas-filled microspheres, contrast agents for ultrasound imaging. *Adv Drug Deliv Rev*, 37(1-3), 139-157.
- Kodama, T., & Takayama, K. (1998). Dynamic behavior of bubbles during extracorporeal shock-wave lithotripsy. *Ultrasound Med Biol*, 24(5), 723-738.
- Kondo, I., Ohmori, K., Oshita, A., Takeuchi, H., Fuke, S., Shinomiya, K., et al. (2004). Treatment of acute myocardial infarction by hepatocyte growth factor gene transfer: the first demonstration of myocardial transfer of a "functional" gene using ultrasonic microbubble destruction. *J Am Coll Cardiol*, 44(3), 644-653.
- Kotopoulis, S., & Postema, M. Microfoam formation in a capillary. *Ultrasonics*, 50(2), 260-268.
- Kotopoulis, S., Wang, H., Cochran, S., & Postema, M. (2010). Lithium niobate ultrasound transducers for high-resolution focused ultrasound surgery. *IEEE International Ultrasonics Symposium Proceedings*.
- Krasovitski, B., Frenkel, V., Shoham, S., & Kimmel, E. Intramembrane cavitation as a unifying mechanism for ultrasound-induced bioeffects. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Kudo, N., Okada, K., & Yamamoto, K. (2009). Sonoporation by single-shot pulsed ultrasound with microbubbles adjacent to cells. *Biophys J*, 96(12), 4866-4876.
- Lindner, J. R., & Kaul, S. (2001). Delivery of drugs with ultrasound. *Echocardiography*, 18(4), 329-337.
- Livanec, P. W., & Dunn, R. C. (2008). Single-molecule probes of lipid membrane structure. *Langmuir*, 24(24), 14066-14073.
- Marmottant, P., & Hilgenfeldt, S. (2003). Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating bubbles. *Nature*, 423(6936), 153-156.
- Philipp, A., & Lauterborn, W. (1998). Cavitation erosion by single laser-produced bubbles. *Journal of Fluid Mechanics*, 361, 75-116.
- Postema, M., Bouakaz, A., Chin, C., & De Jong, N. (2003). Simulations and measurements of optical images of insonified ultrasound contrast microbubbles. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 50(5), 523-536.
- Postema, M., Bouakaz, A., ten Cate, F. J., Schmitz, G., de Jong, N., & van Wamel, A. (2006). Nitric oxide delivery by ultrasonic cracking: some limitations. *Ultrasonics*, 44 Suppl 1, e109-113.
- Postema, M., Gilja, O., & van Wamel, A. (2011). CEUS and sonoporation. In M. Postema (Ed.), *Fundamentals of medical ultrasonics* (pp. 205-217). London: Spon press.
- Postema, M., & Gilja, O. H. (2007). Ultrasound-directed drug delivery. *Curr Pharm Biotechnol*, 8(6), 355-361.
- Postema, M., & Gilja, O. H. (2010). Jetting does not cause sonoporation. *Biomed Eng*, 55(S1), 19-20.
- Postema, M., & Schmitz, G. (2007). Ultrasonic bubbles in medicine: influence of the shell. *Ultrason Sonochem*, 14(4), 438-444.
- Postema, M., ten Cate, F. J., Schmitz, G., de Jong, N., & van Wamel, A. (2007). Generation of a droplet inside a microbubble with the aid of an ultrasound contrast agent: First result. *Letters in Drug Design & Discovery*, 4(1), 74-77.

- Postema, M., van Wamel, A., ten Cate, F. J., & de Jong, N. (2005). High-speed photography during ultrasound illustrates potential therapeutic applications of microbubbles. *Med Phys*, 32(12), 3707-3711.
- Prentice, P., Cuschierp, A., Dholakia, K., Prausnitz, M., & Campbell, P. (2005). Membrane disruption by optically controlled microbubble cavitation. *Nature Physics*, 1(2), 107-110.
- Shortencarier, M. J., Dayton, P. A., Bloch, S. H., Schumann, P. A., Matsunaga, T. O., & Ferrara, K. W. (2004). A method for radiation-force localized drug delivery using gas-filled lipospheres. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 51(7), 822-831.
- Society, B. M. U. (2000). *Guidelines for the safe use of diagnostic ultrasound equipment*.
- Tachibana, K., Uchida, T., Ogawa, K., Yamashita, N., & Tamura, K. (1999). Induction of cell-membrane porosity by ultrasound. *Lancet*, 353(9162), 1409.
- Takahashi, A., Yamaguchi, H., & Miyamoto, H. (1993). Change in K⁺ current of HeLa cells with progression of the cell cycle studied by patch-clamp technique. *Am J Physiol*, 265(2 Pt 1), C328-336.
- ter Haar, G. (2009). Safety and bio-effects of ultrasound contrast agents. *Med Biol Eng Comput*, 47(8), 893-900.
- Tinkov, S., Bekerjian, R., Winter, G., & Coester, C. (2009). Microbubbles as ultrasound triggered drug carriers. *J Pharm Sci*, 98(6), 1935-1961.
- van Wamel, A., Kooiman, K., Harteveld, M., Emmer, M., ten Cate, F. J., Versluis, M., et al. (2006). Vibrating microbubbles poking individual cells: drug transfer into cells via sonoporation. *J Control Release*, 112(2), 149-155.
- Voigt, J. U. (2009). Ultrasound molecular imaging. *Methods*, 48(2), 92-97.

II) DETERMINATION DU MECANISME DE TRANSFERT DE GENE PAR SONOPORATION

1. INTRODUCTION

La thérapie génique est une technique prometteuse dans le traitement de maladies génétiques innées et dans de nombreuses maladies acquises (cancer). Cependant une méthode de transfert de gène efficace et sans danger est nécessaire. La plupart des essais cliniques de thérapie génique à l'heure actuelle utilisent des méthodes virales (principalement basées sur l'utilisation des adénovirus), ces techniques ont démontré leur efficacité, toutefois les effets secondaires encore mal maîtrisés et le coût de ces thérapies font qu'il est nécessaire de développer des méthodes de transfert de gène non virales efficaces et sûres. Parmi les méthodes non virales de transfert de gène, une méthode physique basée sur l'utilisation d'ultrasons couplés à des microbulles de gaz appelée sonoporation est de plus en plus utilisée. En effet, cette méthode offre de nombreux avantages, elle permet un ciblage important et une possibilité d'être couplé à l'imagerie échographique. De nombreuses études ont démontré l'efficacité de transfert de gène par sonoporation *in vitro* et *in vivo*, celle-ci reste cependant à être améliorée. Le mécanisme de sonoporation est encore mal connu. La première hypothèse est que l'ADN plasmidique entre de façon passive par des pores membranaires transitoires. La seconde hypothèse implique un phénomène actif d'endocytose facilité par la sonoporation.

Le but de cette étude *in vitro* est de mieux définir les mécanismes mis en jeu durant et après le processus de sonoporation. Pour cela, nous avons tout d'abord adapté notre dispositif expérimental de sonoporation pour des expériences *in vitro* puis nous avons optimisé les paramètres de sonoporation et avons déterminé la toxicité des différentes conditions.

Par la suite, différentes expériences ont été menées pour :

- suivre les interactions microbulles-cellules durant la sonoporation. Ceci a été effectué à par microscopie de fluorescence couplée à une caméra ultra rapide.
- localiser par microscopie confocale de fluorescence le plasmide et les microbulles après la sonoporation.
- évaluer l'influence de la taille du plasmide sur la localisation cellulaire et l'efficacité du transfert de gène.
- évaluer l'implication de l'endocytose sur l'efficacité du transfert de gène par sonoporation.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. REACTIFS

Tous les réactifs nécessaires à la réalisation de cette étude ont été fournis par Sigma-Aldrich.

2.2. CULTURE CELLULAIRE

Les différentes lignées cellulaires utilisées dans cette partie sont les cellules HeLa, les HeLa-Rab7-GFP, les HeLa-Nup-153 et les cellules Hepa 1-6.

La lignée cellulaire HeLa est une lignée de cellules épithéliales humaines d'adénocarcinome du col de l'utérus (ATCC, CCL-2). Des clones exprimant de façon stable les protéines de fusion Rab7-GFP ou Nup153-GFP ont été fabriquées au laboratoire.

La lignée cellulaire Hepa 1-6 est une lignée de cellules épithéliales d'hépatome murin (ATCC, CRL1839).

Toutes les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide contenant 5% de CO₂. Le milieu de culture est changé tous les 3 jours. La composition des milieux de culture est détaillée dans le tableau 1.

Lignée cellulaire	Composition
HeLa	MEM, 10% SVF, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine
HeLa-Rab7-GFP	MEM, 10% SVF, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine, 400µg/ml G418
HeLa-Nup153-GFP	
Hepa 1-6	DMEM, 10% SVF, 100U/ml pénicilline, 100µg/ml streptomycine

Tableau 1. Composition des milieux de culture pour les lignées cellulaires utilisées.

Un test pour vérifier l'absence de mycoplasmes est réalisé périodiquement par marquage à l'aide du kit MycoAlert® Assay (Lonza, Levallois-Perret, France). Ce test est réalisé systématiquement lors de la décongélation des cellules avant leur mise en culture puis tous les deux mois lors de leur entretien.

2.3. PLASMIDES

Dans cette étude, nous avons utilisé un plasmide codant pour un gène rapporteur, la luciférase pNFCMV-Luc (7500pb). Ce pNFCMV-Luc contient un promoteur fort CMV avec 5 séquences NFκB consécutives en amont du transgène. Les plasmides pNFCMV-Luc sont isolés à partir de cultures de bactéries *Escherichia coli* DH5α en utilisant le protocole standard de lyse alcaline. Les plasmides sont purifiés en utilisant le QIAGEN Mega Kit (QIAGEN, Courtabœuf, France).

2.4. SONOPORATION IN VITRO POUR LE TRANSFERT DE GENE

10⁵ cellules sont cultivées sur des membranes de culture Opticell® (Nunc) découpées aux dimensions 1x1,5 cm afin de rentrer dans les cuvettes de sonoporation. Les cellules sont mises en culture la veille de l'expérimentation. Au moment de l'expérience, les cellules atteignent une confluence autour de 80 %. Les cuvettes de sonoporation utilisées sont en polystyrène de dimensions 10x10x45mm.

Le jour de l'expérimentation, les cuvettes de sonoporation sont remplies avec 1,5ml de milieu de culture Optimem (Gibco) contenant 1% de SVF (PAA) et 1% de pénicilline/streptomycine (concentrations). Les membranes d'Opticell sur lesquelles se trouvent les cellules sont transférées dans les cuvettes de sonoporation. La cuvette est ensuite placée dans un bac d'eau en face du transducteur ultrasonore (figure 1). L'eau est dégazée et est préchauffée à 37°C avant utilisation. Durant le protocole ultrasonore, le milieu à l'intérieur de la cuvette est maintenu sous agitation douce à l'aide d'un agitateur magnétique.

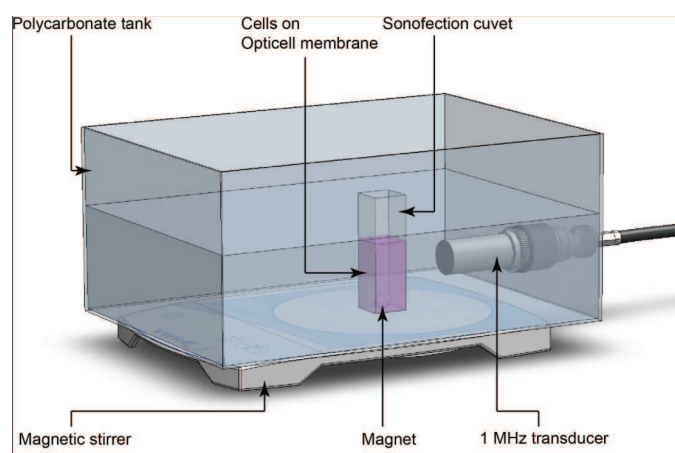


Figure 1. Dispositif expérimental pour sonoporation *in vitro*.

2.5. ULTRASONS

Les ultrasons sont générés par un transducteur de 0,5 pouces de diamètre à une fréquence de 1MHz (IBMF-014, Sofranel, Sartrouville, France). Un signal de 1MHz, ayant une fréquence de répétition du pulse (PRF : pulse rate frequency) de 10kHz avec un duty-cycle compris entre 10 et 60%, est émis d'un générateur de fréquence (Agilent 33220A, Agilent Technologies, Les Ulis, France) connecté à un amplificateur de puissance (ADECE, Artannes, France) et est envoyé au transducteur ultrasonore. Le transducteur ultrasonore a été préalablement calibré dans un dispositif expérimental séparé à l'aide d'un hydrophone (HLG-200, Onda, Sunnyvale, CA). Les pressions acoustiques étudiées varient entre 100 et 200kPa correspondant à des MI de 0,1 à 0,2.

2.6. MICROBULLES

Différentes microbulles sont utilisées dans cette étude : Micromarker, Definity, Sonovue et Quantison.

Les microbulles Micromarker[®] (VisualSonics) sont composées majoritairement de perfluorobutane (C₄F₁₀) entourées d'une enveloppe de phospholipides. Leur taille médiane est de 2,3 à 2,9µm.

Les microbulles Definity (Lantaeus Imaging) sont composées de perfluoropropane et entourées d'une enveloppe de phospholipides. Leur taille médiane est comprise entre 1,1 et 3,3µm.

Les microbulles Sonovue (Bracco Research) sont composées d'hexafluorure de soufre et entourées d'une enveloppe de phospholipides. Leur taille moyenne est de 2,5µm.

Les microbulles Quantison (Andaris) sont composées d'air enveloppé d'albumine humaine. Leur taille est de 3,2µm.

2.6. MARQUAGE FLUORESCENT DES MICROBULLES

L'enveloppe des microbulles Micromarker (Visualsonics) a été marquée à l'aide de la sonde lipophile fluorescente DiD (λ_{ex} 633nm, λ_{em} 643-670nm) (Vybrant, Molecular Probes). 1µl de solution de DiD a été ajouté à 40µl de suspension de microbulles Micromarker et incubé 10 minutes à température ambiante. La figure 2 présente un empilement de sections optiques en z de plusieurs microbulles Micromarker après marquage au DiD.

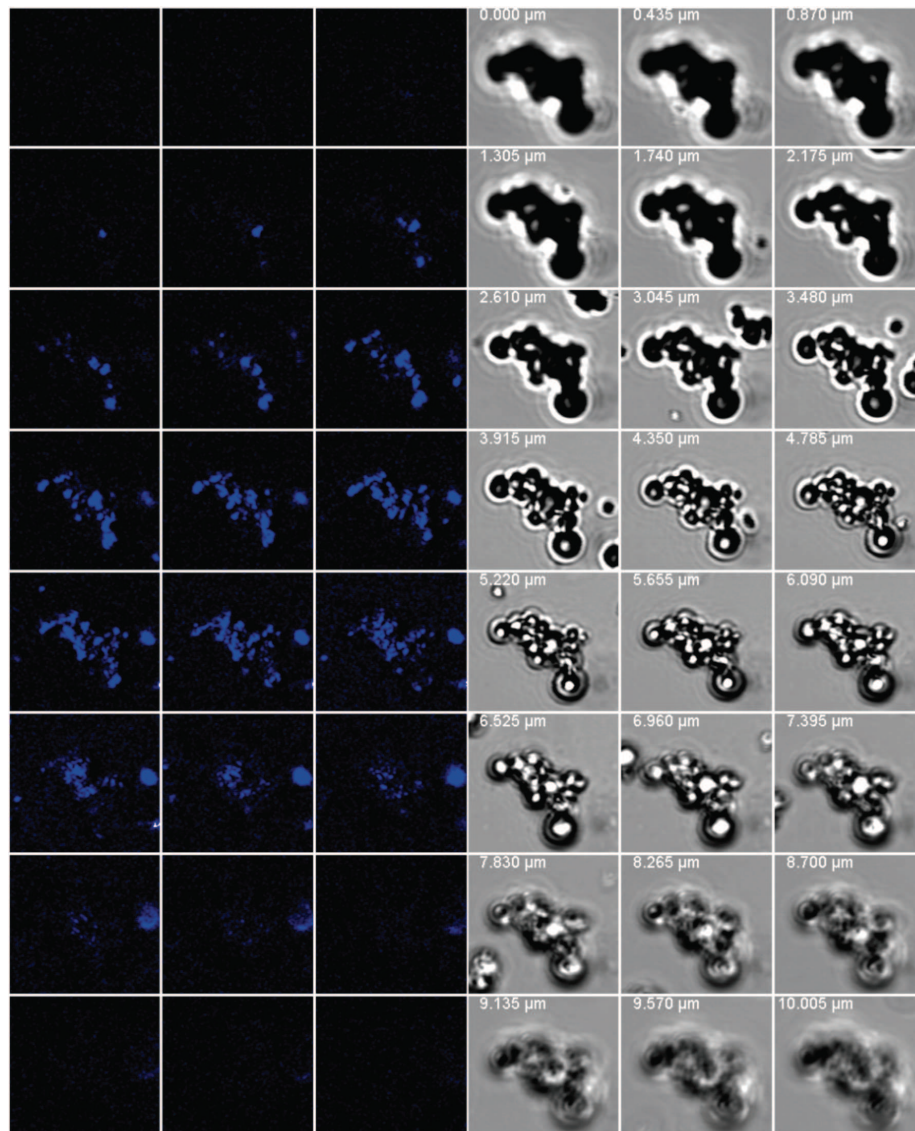


Figure 2. Observation en microscopie confocale de microbulles Micromarker marquées au DiD.

2.7. IMAGERIE UTLRA RAPIDE

Afin de visualiser les microbulles en temps réel durant le processus de sonoporation un dispositif expérimental couplant un microscope confocal et une caméra ultra rapide (figure 3) a été mis en place. Nous avons fabriqué un dispositif de sonoporation compatible avec la platine du microscope confocal et dans lequel une chambre de culture Opticell peut être insérée. Ce dispositif offre la possibilité de travailler dans les conditions d'immersion requises pour la stimulation ultrasonore. Une caméra ultra rapide (MC2 Fast Cam, Photron) capable d'enregistrer jusqu'à 2000 images par secondes a été connectée au microscope confocal (Zeiss LSM 510 Axiovert).

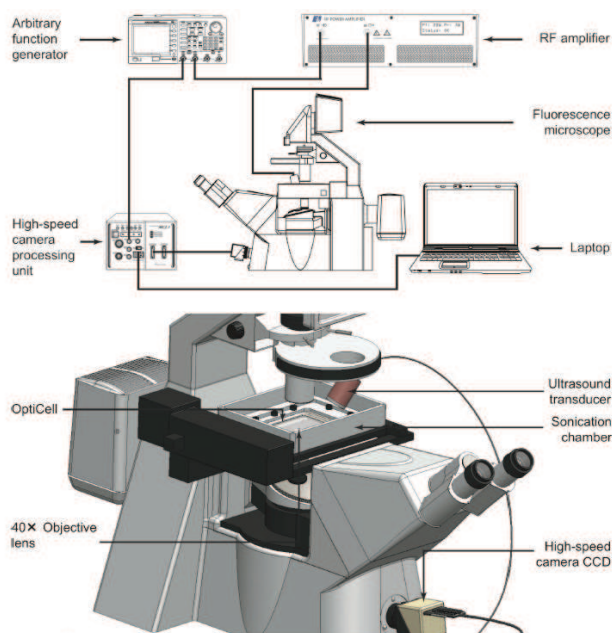


Figure 3. Dispositif expérimental permettant d'observer le processus de sonoporation *in vitro* à l'aide d'un microscope confocal couplé à une caméra ultra-rapide.

2.8. MESURE DE L'ACTIVITE DE LA LUCIFERASE

L'activité de la luciférase est mesurée à partir de lysats cellulaires à l'aide d'un luminomètre (Lumat LB9507, Berthold, Wildbach, Allemagne) 24h après sonoporation en suivant la méthode de De Wet *et al.* (de Wet *et al.*, 1987). L'activité luciférase obtenue (RLU/mg de protéines) est exprimée par mg de protéines mesurées en utilisant le dosage à l'acide bicinchoninique (Smith *et al.*, 1985).

2.9. MESURE DE LA CYTOVIABILITE

La mesure de cytoviabilité a été réalisée par le test MTT 24h après sonoporation. Les cellules sont incubées durant 4h à 37°C, 5% CO₂ en présence du 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) à 500µg/ml. Les cellules sont ensuite lavées puis incubées dans un tampon contenant de l'isopropanol acidifié et du SDS 3% permettant la lyse des cellules et la re-suspension des cristaux de formazan formés. La quantification est réalisée par la mesure de la densité optique à 560nm.

2.10. INHIBITION DE L'ENDOCYTOSE

Afin d'étudier l'implication de l'endocytose dans le processus de sonoporation les cellules ont été prétraitées durant 30 minutes avec les différents inhibiteurs aux concentrations indiquées. Nous avons testés la chlorpromazine (de 5 à 20µg/ml, Sigma Aldrich), inhibiteur de la voie d'endocytose clathrine dépendante et la filipine III (de 0,5 à 4µg/ml, Sigma Aldrich), inhibiteur de l'endocytose cavéoline dépendante. La sonoporation a eu lieu en présence des inhibiteurs, le milieu de sonoporation contenant les inhibiteurs a été changé par du milieu complet 2h après sonoporation. L'importance du transport actif a été évaluée en déplaçant l'ATP cellulaire. Ceci a été réalisé en incubant les cellules 30 minutes avant sonoporation avec un tampon de déplétion en ATP (PBS contenant 50mM de 2-Deoxyglucose, 50nM d'azide de sodium et 1,8mM de calcium).

2.11. MARQUAGE FLUORESCENT DE L'ADN

L'ADN plasmidique pNFCMV-LucF+ est rendu fluorescent après couplage avec la cyanine 3 (λ_{ex} 543nm, λ_{em} 570nm) en utilisant le kit Label IT (Mirus, Madison, WI, USA). Le ratio de marquage fluorescent utilisé était environ de 1 base fluorescente toutes les 50 paires de base.

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1. DETERMINATION DES PARAMETRES OPTIMAUX POUR LA SONOPORATION *IN VITRO*

A l'instar des expérimentations réalisées *in vivo*, les paramètres ultrasonores optimaux pour un transfert de gène efficace ont été déterminés. Quatre paramètres ont été testés : la pression acoustique (kPa), la durée (sec), le duty cycle (%), la concentration en microbulles (%). La figure 4 présente l'efficacité de transfert de gène par sonoporation en fonction de ces 4 paramètres.

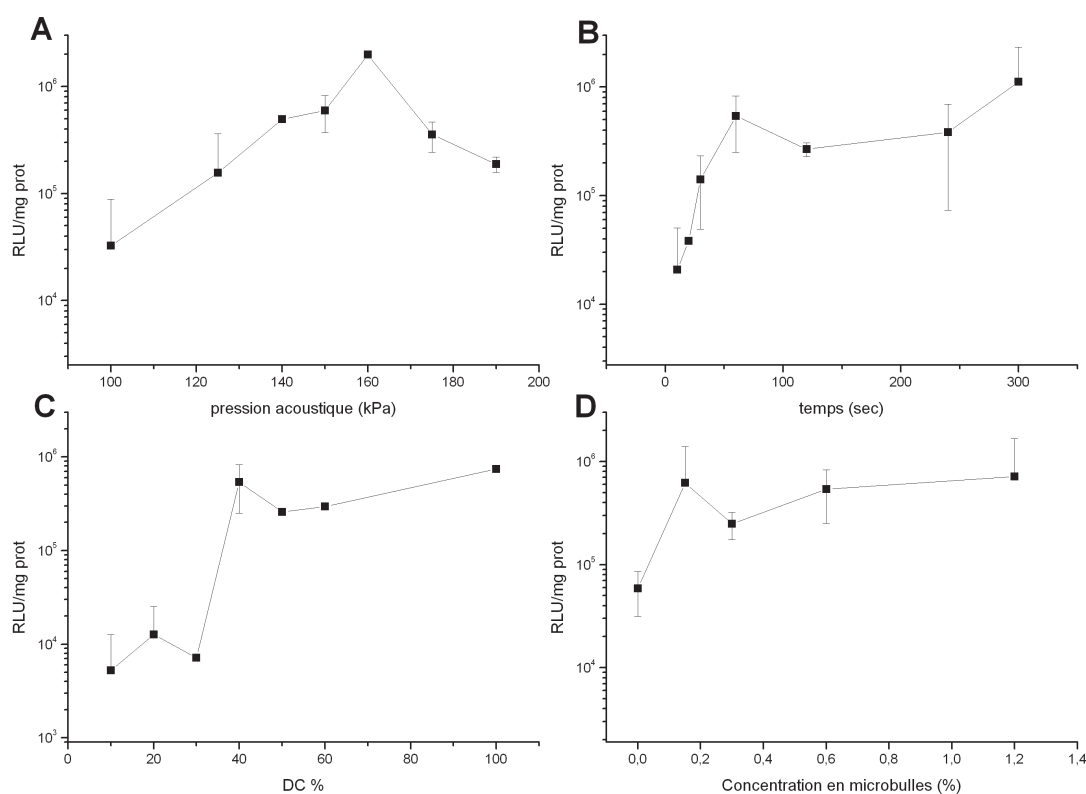


Figure 4. Optimisation des paramètres utilisés lors la sonoporation. (A) influence de la pression acoustique (paramètres fixés : 0,3% Definity, 60 sec, 40% DC). (B) influence du temps de stimulation ultrasonore (paramètres fixés : 150kPa, 0,3% Definity, 40% DC). (C) influence du duty cycle (DC) (paramètres fixés : 150kPa, 60 sec, 0,3% Definity). (D) influence de la concentration en microbulles Definity (paramètres fixés : 150kPa, 60 sec, 40% DC).

Nous avons testé différentes valeurs de pressions acoustiques en ayant fixé les autres paramètres testés (60 sec, 40% DC, 0,3% Definity). Ces paramètres fixés ont été inspirés d'une étude effectuée précédemment (Kaddur *et al.*, 2010). La figure 4a montre qu'il existe une dépendance entre ce paramètre et l'efficacité de transfert de gène de 100kPa à 200kPa. En effet, l'augmentation de la pression acoustique de 100 à 160kPa entraîne une augmentation linéaire de l'efficacité du transfert de gène ($3,2 \times 10^4$ RLU/mg prot à 2×10^6 RLU/mg prot soit une augmentation d'environ 100 fois). Au

delà de 160kPa, l'efficacité de transfert de gène est diminuée et atteint à 200kPa une valeur de $1,9 \times 10^5$ (soit une réduction d'environ 10 fois). Ces valeurs sont dans le même ordre de grandeur que celle obtenues dans l'étude de Duvshani *et al.* effectuée sur des cellules d'adénocarcinome de prostate murin PC2 même si les expériences ont été menées avec Optison (Duvshani-Eshet & Machluf, 2007). Dans une étude similaire effectuée sur des cellules HeLa mais avec des microbulles Sonovue, les auteurs montrent un maximum d'efficacité de transfert de gène est obtenu pour une stimulation ultrasonore à 240kPa durant 7 minutes avec un duty cycle de 60% (Li *et al.*, 2009) cependant une forte toxicité est mesurée (30% de viabilité cellulaire). Dans notre étude la cytoviabilité atteint une valeur de 70% pour la condition optimale.

Nous avons ensuite fait varier le temps d'exposition aux ultrasons de 10 à 300 secondes. Les résultats de la figure 4B montrent que l'efficacité de transfert de gène est corrélée positivement avec le temps de stimulation entre 10 et 60 secondes (de $2,1 \times 10^4$ à $5,4 \times 10^5$). Un plateau est observé entre 60 et 300 secondes. Cependant, il est à noter une certaine variabilité pour des durées de stimulation élevées. Ceci peut s'expliquer par une augmentation de la toxicité induite par la sonoporation en fonction du temps de stimulation. En effet, nos expériences montrent une toxicité variant de 30 à 60% pour des durées de stimulation respectives de 10 à 300 secondes.

Concernant le duty cycle (Figure 4C), une valeur seuil de 40% est nécessaire pour obtenir un transfert de gène efficace. Entre 10 et 30% une expression très faible de la luciférase (autour de 10^4 RLU/mg prot) est obtenue. A partir de 40% duty cycle, une augmentation de 75 fois de l'efficacité de transfert de gène est obtenue. Un plateau est atteint entre 40 et 60% de duty cycle. Cependant, il est à noter que les expériences menées à 60% de duty cycle conduisent à une toxicité très variable (environ 60%). Ceci est en accord avec nos résultats obtenus précédemment sur des cellules HeLa en suspension en présence de microbulles BR14 (Kaddur *et al.*, 2010). Dans cette étude, un plateau est atteint à partir de 40% de duty cycle.

L'importance de la quantité de microbulles a été également évaluée. La figure 4D nous indique que la présence d'une certaine concentration en microbulles (0,15%) est nécessaire pour avoir un transfert de gène efficace. Au-delà de cette concentration, l'efficacité de transfection est peu dépendante de la quantité de microbulles utilisée. Cette observation est similaire avec celle qu'on a obtenu précédemment sur des cellules HeLa en suspension en présence de microbulles BR14 (Kaddur *et al.*, 2010) et l'étude de Rahim *et al.* effectuée sur des cellules CHO adhérentes en présence de Sonovue (Rahim *et al.*, 2006).

L'ensemble de ces résultats traduit l'importance des paramètres ultrasonores utilisés dans l'efficacité du mécanisme de transfert de gène par sonoporation. En fonction des paramètres utilisés, les interactions microbulles-cellules sont très certainement modifiées. C'est pour cela que nous avons mis en place un dispositif de sonoporation couplé à une caméra ultrarapide pour observer en temps réel ces phénomènes.

3.2. INTERACTION MICROBULLES-CELLULES

Les interactions possibles entre microbulles et cellules ont été recherchées en utilisant les paramètres acoustiques optimaux déterminés précédemment (1MHz, 40%DC, PRF=10kHz, 100 à 200kPa, microbulles 0,3%). La figure 5 montre différents types d'interactions microbulles-cellules en fonction de la pression acoustique. Nous avons testés des pressions acoustiques de 100kPa (Figure 5A), 150kPa (Figure 5B) et 200kPa (Figure 5C). Pour des pressions acoustiques de 100kPa, le phénomène majoritaire observé est assimilé à un massage membranaire. La microbulle activée par ultrasons reste en contact avec la membrane plasmique durant la stimulation. Pour cette pression acoustique, un faible transfert de gène a été obtenu (figure 4A). Pour une pression acoustique de 150kPa, le phénomène majoritaire observé est l'entrée de microbulles dans la cellule. Dans l'évènement présenté, la microbulle entre dans la cellule au bout de 600ms de stimulation

ultrasonore. C'est autour de cette valeur de pression acoustique que l'efficacité de transfert de gène est la plus élevée (figure 4A). Pour une pression acoustique de 200kPa, nous avons identifié deux phénomènes: soit les microbulles sont chassées du champ optique à cause d'une force de radiation trop forte, soit une interaction violente des microbulles avec la cellule est observée. Cette dernière peut se matérialiser par le détachement de certaines cellules de leur support. Il est important de noter qu'à 200kPa le transfert de gène est dix fois plus faible qu'à 150kPa. Par ailleurs, quelques événements d'entrée de microbulles dans les cellules ont été observés.

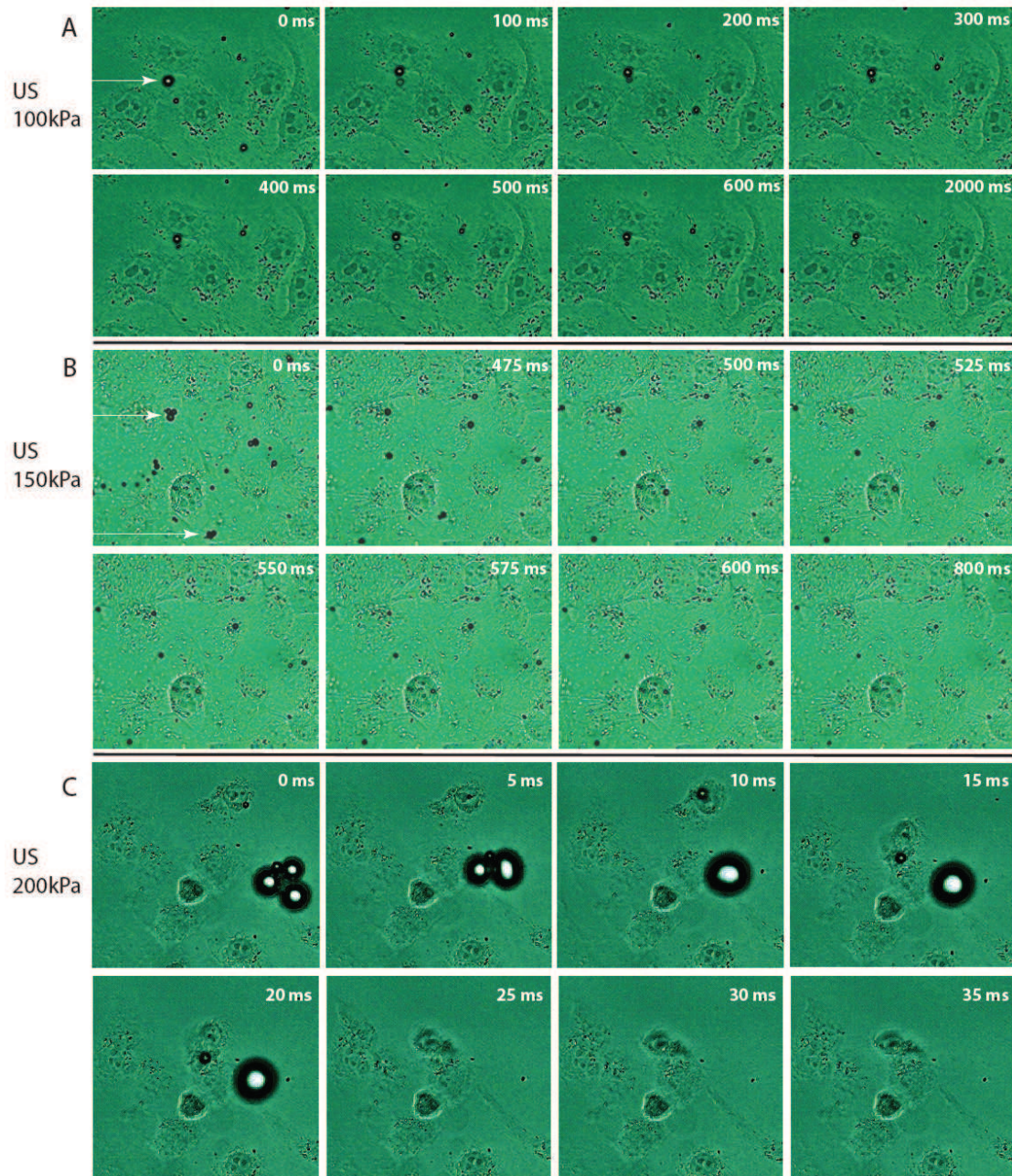


Figure 5. Séquences d'images de cellules HeLa en présence de microbulles Micromarker. (A) images réalisées durant une stimulation ultrasonore de 100kPa, la microbulle entourée interagit avec la membrane plasmique par "massage" cellulaire. (B) images réalisées durant une stimulation ultrasonore de 150kPa, la microbulle entourée entre dans la cellule après 552ms. (C) images réalisées durant une stimulation ultrasonore de 200kPa, une microbulle détache une cellule de son support. Les flèches présentent les microbulles à observer au cours du temps. Le temps affiché représente la valeur de temps après le début de la stimulation ultrasonore.

L'entrée de microbulles dans la cellule a été validée par microscopie confocale. Des microbulles sont observées dans la cellule après sonoporation (figure 6). Il est à noter que des microbulles sont également visibles à la surface de la cellule.

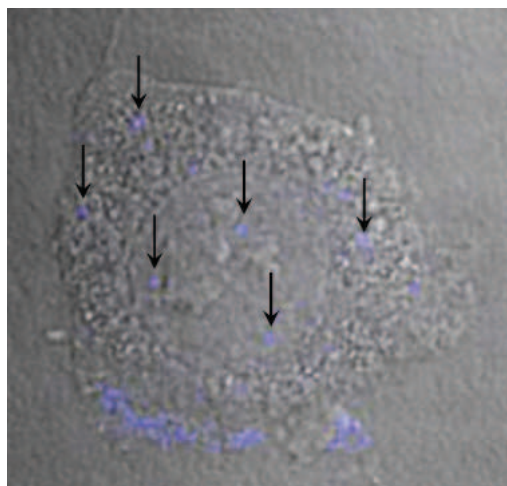


Figure 6. Mise en évidence de la localisation de microbulles Micromarker fluorescentes après sonoporation (1MHz, 150kPa, 60 sec, 40% DC, 0,3% Micromarker DiD) par microscopie confocale. Les flèches présentent les microbulles internalisées dans la cellule.

Ce phénomène d'entrée de microbulles a été également observé lors de notre étude d'imagerie ultra-rapide réalisée à 6,6MHz avec une pression de 500kPa. Cette pénétration de microbulle a été validée en utilisant des microbulles fluorescentes (Delalande *et al.*, 2011).

Les paramètres acoustiques utilisés dans cette précédente étude sont proches de ceux utilisés en échographie de contraste. Sachant que la majorité des études de transfert de gène par sonoporation est réalisée en utilisant une fréquence ultrasonore de 1MHz comme pour l'étude que nous avons réalisée *in vivo* (Delalande *et al.*, 2010). Il est tentant de corréler le phénomène d'entrée de microbulles et l'efficacité de transfert de gène et que l'entrée de la microbulle favorise l'entrée du plasmide dans la cellule.

Il est à noter que des résultats similaires ont été obtenus avec la lignée cellulaire d'adénocarcinome hépatique murin Hepa 1-6. L'apparition de ces phénomènes ne semble pas dépendant du type cellulaire bien qu'il serait intéressant de valider cela sur un type cellulaire non-épithélial. Nous avons également observé ces phénomènes d'entrée de microbulles avec Sonovue, un autre type de microbulle composée d'une enveloppe lipidique et de taille similaire par rapport aux Micromarker.

En revanche, les expériences menées avec Quantison, un type de microbulles composées d'une enveloppe protéique rigide, n'a pas permis d'obtenir d'interactions microbulle-cellule (résultats non montrés).

En outre, les phénomènes d'entrée de microbulles sont généralement observés dans une gamme de temps inférieure ou égale à 10 secondes. Une corrélation peut être faite entre ce temps et la durée d'ouverture des pores membranaires mesurée de manière indirecte dans d'autres études (Kaddur *et al.*, 2010; Mehier-Humbert *et al.*, 2005a). Ces observations ont été obtenues en incubant les cellules avec le marqueur fluorescent après sonoporation indiquant un retour à l'état imperméable à partir de 10 secondes.

3.3. CINÉTIQUE DE LOCALISATION DU PLASMIDE APRES SONOPORATION

Nous avons suivi la cinétique de localisation du plasmide après sonoporation en microscopie confocale de fluorescence. La figure 7 nous indique tout d'abord un marquage ponctiforme correspondant au plasmide. Cette information suggère que les plasmides se trouvent soit agrégés sous forme libre dans le cytoplasme soit contenus dans une structure vésiculaire. De plus, les analyses des coupes optiques au cours du temps montrent une progression lente du plasmide dans le cytoplasme. Au bout de 10 minutes après sonoporation, les plasmides sont retrouvés majoritairement au niveau de la membrane plasmique. Après 30 et 45 minutes les plasmides ont légèrement progressés dans le cytoplasme mais sont cependant loin du noyau.

Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par Mehier-Humbert *et al.*, les auteurs observent un marquage plasmidique diffus 5 minutes après sonoporation dans les cellules MAT B III (Mehier-Humbert *et al.*, 2005b). Cette différence pourrait s'expliquer soit par les paramètres acoustiques utilisés (2,25MHz, 570kPa) soit par la méthode de marquage non-covalente du plasmide effectué avec l'intercalant fluorescent YOYO. Il est donc difficile de garantir que le marquage observé correspond à l'ADN marqué et non à la sonde libre. De plus, une étude récente menée par Meijering *et al.*, 2009 utilisant un dextran fluorescent de 500kDa a révélé le même type de marquage (ponctiforme) que nous avons observé (Meijering *et al.*, 2009).

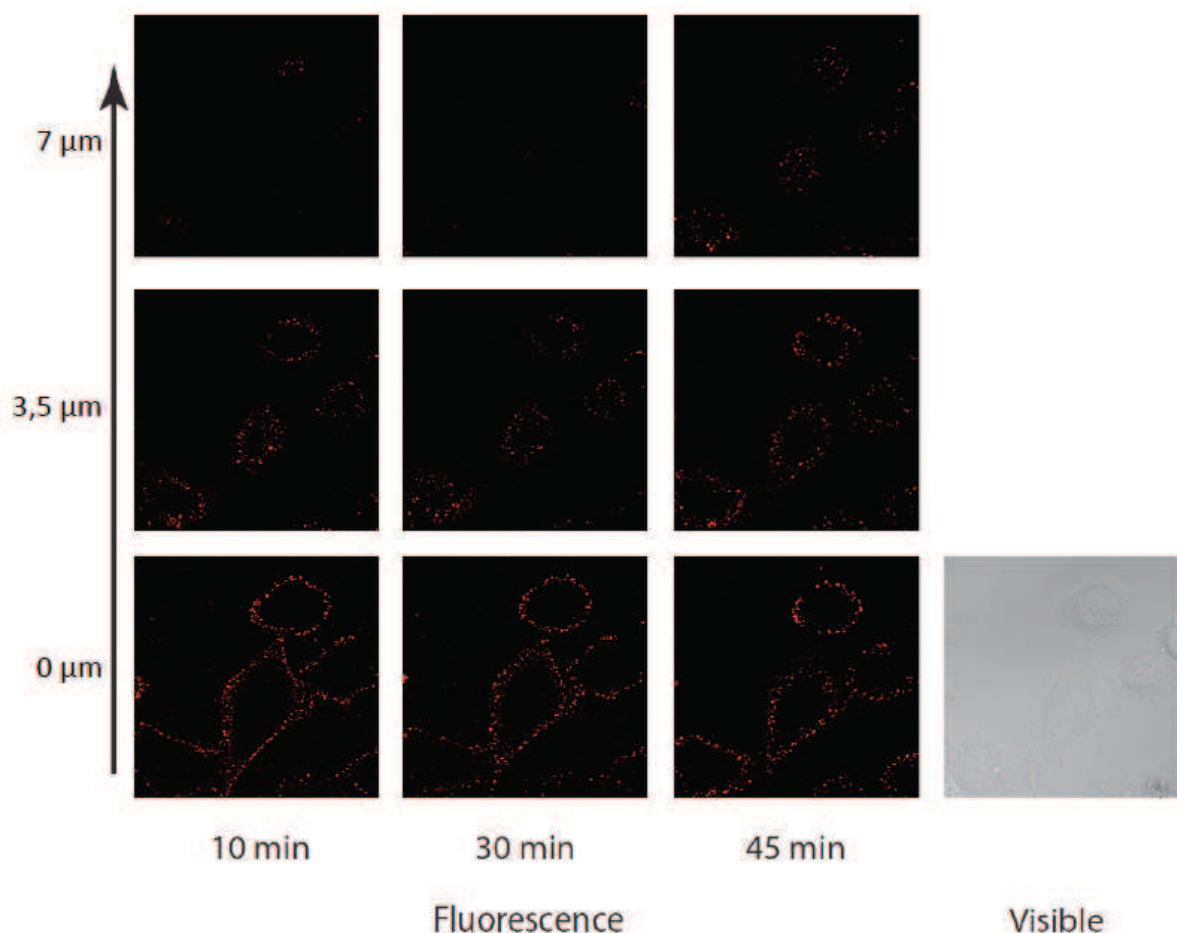


Figure 7. Cinétique de localisation du plasmide après sonoporation dans des cellules HeLa. La sonoporation a été effectuée dans les conditions suivantes : 1MHz, 40%DC, 150kPa, 2 minutes d'exposition, 5µg de plasmide marqué à la cyanine 3 et 0,3% Definity. Image représentative de l'échantillon, présentation de 3 coupes optiques ($z=0\mu\text{m}$, $3,5\mu\text{m}$, $7\mu\text{m}$).

3.4. DEVENIR DU PLASMIDE ET IMPLICATION DE L'ENDOCYTOSE

Suite à notre observation précédente, nous avons voulu connaître si le plasmide rejoint les compartiments d'endocytose. Pour cela, nous avons exploité les lignées de cellules HeLa exprimant de façon stable la protéine de fusion Rab7-eGFP qui est un marqueur spécifique des endosomes tardifs.

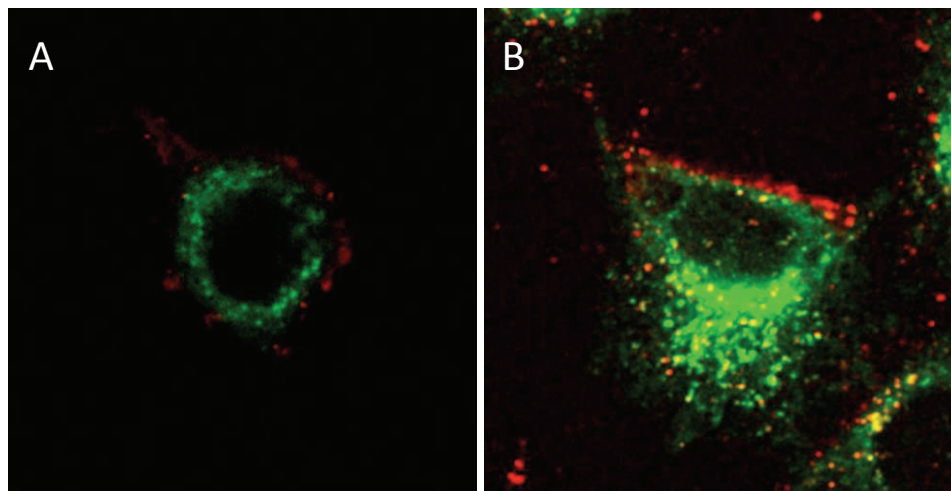


Figure 8. Observation de la cinétique d'internalisation de plasmide marqué à la cyanine 3 après sonoporation (1MHz, 150kPa, 40%DC, 60 sec, 0,3% Definity, 5µg pDNA) dans les cellules HeLa-Rab7-eGFP par microscopie confocale de fluorescence. L'ADN plasmidique est représenté en rouge et les protéines Rab7-eGFP en vert, une colocalisation des deux structures est représentée en jaune. (A) observation immédiatement après sonoporation, (B) observation 3 heures après sonoporation, de nombreux plasmides sont colocalisés avec la protéine Rab7-eGFP.

Une colocalisation entre les plasmides fluorescents et les endosomes tardifs contenant Rab7-eGFP a été recherchée. La figure 8 montre qu'une partie des plasmides est colocalisée dans les vésicules Rab7-eGFP positive 3 heures après sonoporation. Il est intéressant de noter qu'il reste de nombreux spots correspondant aux plasmides à la membrane plasmique. Ces observations suggèrent que la voie clathrine pourrait être impliquée dans le phénomène. En effet, les molécules empruntant la voie clathrine se retrouvent généralement dans les endosomes tardifs. Il est à noter que les complexes ADN/vecteur histidylés internalisés *via* la voie clathrine sont localisés dans les endosomes tardifs après une durée similaire (Billiet *et al.*, nos résultats en cours de publication). De plus, ces analyses vont dans le même sens que celles de Meijering *et al.* obtenues avec des cellules endothéliales (Meijering *et al.*, 2009). Ce type de cinétique lente est probablement du à la taille du cargo internalisé. En effet, un ADN plasmidique de 7,5kb correspond environ à 2,47MDa (330 Da / paire de base ADN).

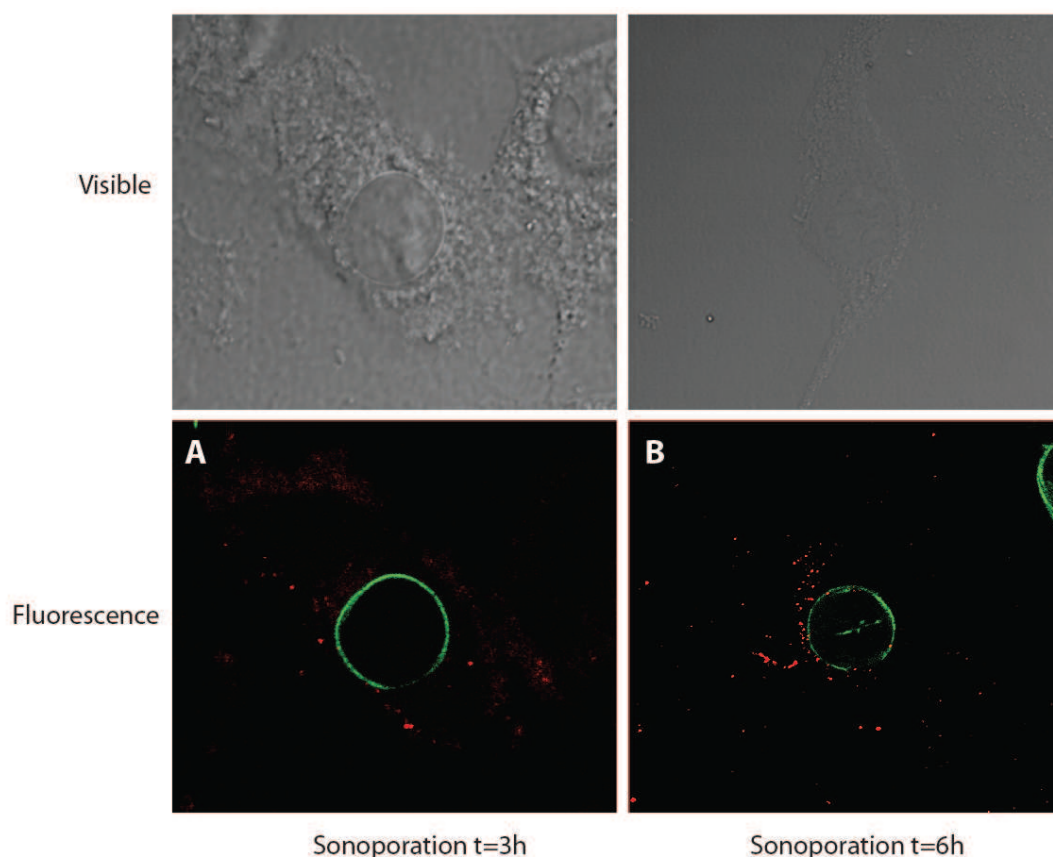


Figure 9. Observation de la cinétique d'internalisation de plasmide marqué à la cyanine 3 après sonoporation (1MHz, 150kPa, 40%DC, 60 sec, 0,3% Definity, 5 μ g pDNA) dans les cellules HeLa-Nup153-eGFP par microscopie confocale de fluorescence. L'ADN plasmidique est représenté en rouge et les protéines Nup153-eGFP en vert, une colocalisation des deux structures est représentée en jaune. (A) observation immédiatement après sonoporation, (B) observation 3 heures après sonoporation.

Ayant à notre disposition des cellules HeLa exprimant stablement la protéine Nup153-eGFP du pore nucléaire, nous les avons utilisées pour suivre la localisation nucléaire du plasmide après sonoporation (figure 9). Une cinétique de 1h à 6h post sonoporation a été réalisée. Au bout de 3 heures, nous avons observé une localisation du plasmide dans une région péri nucléaire (figure 9A). Après 6 heures, certains plasmides atteignent le noyau et sont très proches des pores nucléaires (figure 9B). Même si la localisation du plasmide à l'intérieur du noyau est un évènement rare, nos précédentes études ont montré une expression du transgène dès 6h en accord avec la localisation du plasmide dans le noyau (Kaddur *et al.*, 2010).

Ces observations nous amènent à poser la question suivante : d'où proviennent les plasmides qui atteignent le noyau?

Deux hypothèses non exclusives peuvent être émises:

- soit ces plasmides sont ceux qui ont été introduits directement dans la cellule après sonoporation sans implication de l'endocytose.
- soit ces plasmides sont ceux qui ont été endocytés et été libérés dans le cytosol.

Les plasmides utilisés contiennent des séquences de reconnaissance au facteur de transcription NF κ B. Ces séquences favorisent l'importation nucléaire des plasmides dans le cytosol et l'acheminement se fait *via* les microtubules (Breuzard *et al.*, 2008; Goncalves *et al.*, 2009; Mesika *et*

al., 2005). S'ils se retrouvent dans le cytosol, ils peuvent être pris en charge par le facteur NFκB et importés dans le noyau comme nous avons précédemment démontré par des expériences de ChIP (Goncalves *et al.*, 2009).

Afin de valider l'implication de l'endocytose dans le processus de transfert de gène par sonoporation, nous avons testé l'effet de la déplétion en ATP cellulaire ainsi que les inhibiteurs d'endocytose sur l'efficacité de transfert de gène.

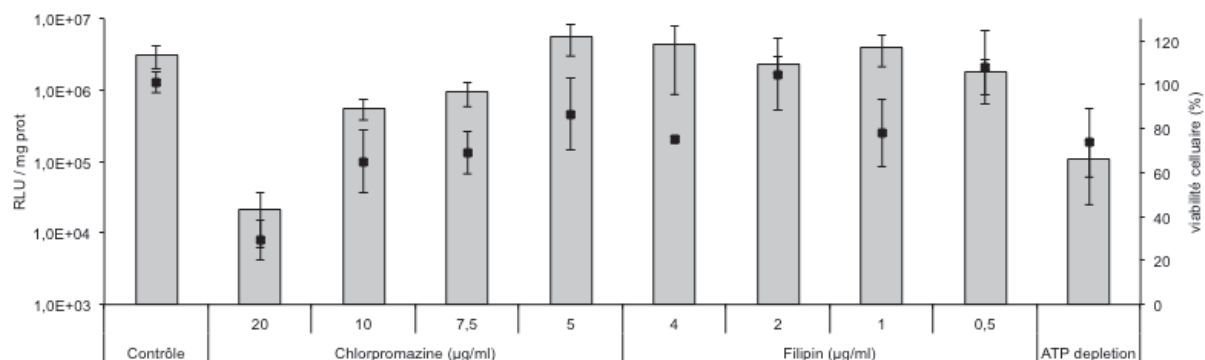


Figure 10. Effet des inhibiteurs de l'endocytose et de la déplétion en ATP cellulaire sur l'efficacité de transfert de gène par sonoporation (1MHz, 60 sec, 150kPa, 40% DC, 0,3% Definity, 10µg plasmide). L'évaluation de l'efficacité de transfert de gène et de la cytotoxicité est réalisée 24 heures après sonoporation.

La figure 10 indique que la déplétion en ATP réduit de 28 fois l'efficacité de transfert de gène par sonoporation, ce qui démontre que ce processus est actif. L'inhibition par la chlorpromazine est dose dépendante, elle diminue de 3, 5 et 140 fois pour des concentrations respectives de 7,5, 10 et 20µg/ml. Cette diminution correspond à une inhibition de 70, 82 et 99% de l'activité luciférase obtenue dans les cellules non traitées. En revanche à 5µg/ml, aucune inhibition significative n'est observée. Il est à noter une toxicité non négligeable de la chlorpromazine à 20µg/ml (environ 30% de viabilité cellulaire). Par contre, la filipine III, inhibiteur de la voie cavéolée n'a aucun effet significatif sur le transfert de gène par sonoporation.

Nous avons validé l'efficacité de nos conditions d'inhibition en testant leur effet sur l'internalisation de la transferrine, un contrôle positif de la voie clathrine (résultats non montrés). Les conditions utilisées permettent une inhibition de la transferrine en présence de chlorpromazine alors que très peu d'effet a été obtenu avec les cellules incubées en présence de filipine III.

Les résultats obtenus avec la chlorpromazine vont dans le même sens que ceux obtenus par Meijering *et al.*, ils ont observé une inhibition de 50% du transfert de dextran de 500kDa dans les cellules endothéliales. Cependant, nous pouvons supposer que l'implication de l'endocytose dans le phénomène de sonoporation soit dépendante de la taille. A l'inverse de nos résultats, ces auteurs ont par contre observés une inhibition par la filipine. Cette différence pourrait être due à la différence de type cellulaire utilisé.

4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude *in vitro*, nous avons mis en place un dispositif expérimental de sonoporation efficace sur cellules adhérentes au laboratoire.

Les résultats obtenus dans cette étude réalisée à une fréquence ultrasonore de 1MHz indiquent que les paramètres acoustiques et le ratio microbulle/ADN sont déterminants dans l'efficacité du

transfert de gène comme attendu. La condition optimale de sonoporation à 1MHz dans cette configuration correspond à une pression acoustique (pic négatif de pression) de 150kPa, un duty cycle de 40%, un temps de sonoporation de 60 secondes et une concentration en microbulles de 0,3%. Cette condition entraîne une faible toxicité (<15%).

L'étude des interactions microbulle-cellule a mis en évidence pour la première fois à 1MHz une entrée de microbulle dans les cellules lorsque les paramètres optimaux de sonoporation ont été utilisés. Cette entrée de microbulle a été majoritairement observée dans les conditions optimales de transfert de gène suggérant l'importance de ce phénomène dans l'obtention d'une sonoporation efficace.

Nos résultats montrent également que le processus de sonoporation est relié au processus d'endocytose. Ceci est démontré d'une part par la colocalisation des plasmides dans les vésicules d'endocytose et par l'effet inhibiteur de la chlorpromazine sur la sonoporation.

En perspective, nous envisageons de déterminer la quantité de plasmides intracellulaires après sonoporation par cytométrie en flux. De même, afin d'évaluer l'effet de la chlorpromazine sur l'entrée des microbulles par sonoporation, des observations d'interaction microbulles-cellules traitées par la chlorpromazine seront réalisées par microscopie couplée à l'imagerie ultrarapide. Par cette technique, nous souhaitons identifier les zones d'interactions préférentielles entre microbulles et cellules en réalisant des marquages de molécules membranaires spécifiques tels que les gangliosides. Une interrogation subsiste concernant l'intégrité et le devenir de la microbulle après son entrée dans la cellule. Nous avons observé lors de ce phénomène une fuite du gaz contenu dans la microbulle. Nos résultats préliminaires indiquent que les microbulles présentes dans la cellule semblent persister jusqu'à 6h. Il serait donc intéressant de suivre le devenir de ces microbulles en déterminant les compartiments intracellulaires dans lesquelles elles se trouvent au cours du temps.

A l'heure actuelle, les données obtenues montrent que la membrane plasmique subit des déformations qui entraînent sa perméabilisation. Ces déformations sont dues probablement aux forces de cisaillements générées par les ultrasons et les microbulles activées. Il est admis que la sonoporation induit : i) la formation de pores, ii) une activation des canaux SACs entraînant l'entrée de calcium. Une détermination de la chronologie de ces événements en intégrant la pénétration des microbulles de gaz serait intéressante à identifier.

Pour aller plus loin dans la connaissance du mécanisme, nous rechercherons l'implication des microtubules et des filaments d'actine en effectuant des traitements affectant le réseau du cytosquelette. Le réseau du cytosquelette doit jouer un rôle de senseur mécanique de la perturbation induite par les ultrasons et les microbulles. Les molécules impliquées dans la mécanotransduction impliquant les filaments d'actine et de microtubules sont de plus en plus connues. Nous souhaiterons identifier celles mis en jeu lors de la sonoporation (Holle & Engler, 2011).

Pour définir l'implication de NFκB dans l'importation nucléaire lors de la sonoporation, nous quantifierons dans un premier temps l'activation de NFκB par les ultrasons seuls ou en présence de microbulles par immunomarquage; dans un deuxième temps, nous inhiberons la fixation de NFκB sur sa cible en utilisant le BAY 11-7082.

5. Références

- Breuzard, G., Tertilt, M., Goncalves, C., Cheradame, H., Geguan, P., Pichon, C., et al. (2008). Nuclear delivery of NF κ B-assisted DNA/polymer complexes: plasmid DNA quantitation by confocal laser scanning microscopy and evidence of nuclear polyplexes by FRET imaging. *Nucleic Acids Res*, 36(12), e71.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., & Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 7(2), 725-737.
- Delalande, A., Bureau, M. F., Midoux, P., Bouakaz, A., & Pichon, C. (2010). Ultrasound-assisted microbubbles gene transfer in tendons for gene therapy. *Ultrasonics*, 50(2), 269-272.
- Delalande, A., Kotopoulis, S., Rovers, T., Pichon, C., & Postema, M. (2011). Sonoporation at a low mechanical index. *Bubble science, Engineering and Technology*, 3(1).
- Duvshani-Eshet, M., & Machluf, M. (2007). Efficient transfection of tumors facilitated by long-term therapeutic ultrasound in combination with contrast agent: from in vitro to in vivo setting. *Cancer Gene Ther*, 14(3), 306-315.
- Goncalves, C., Ardourel, M. Y., Decoville, M., Breuzard, G., Midoux, P., Hartmann, B., et al. (2009). An optimized extended DNA kappa B site that enhances plasmid DNA nuclear import and gene expression. *J Gene Med*, 11(5), 401-411.
- Holle, A. W., & Engler, A. J. (2011). More than a feeling: discovering, understanding, and influencing mechanosensing pathways. *Curr Opin Biotechnol*.
- Kaddur, K., Lebegue, L., Tranquart, F., Midoux, P., Pichon, C., & Bouakaz, A. (2010). Transient transmembrane release of green fluorescent proteins with sonoporation. *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*, 57(7), 1558-1567.
- Li, Y. S., Davidson, E., Reid, C. N., & McHale, A. P. (2009). Optimising ultrasound-mediated gene transfer (sonoporation) in vitro and prolonged expression of a transgene in vivo: potential applications for gene therapy of cancer. *Cancer letters*, 273(1), 62-69.
- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R. H. (2005a). Plasma membrane poration induced by ultrasound exposure: implication for drug delivery. *J Control Release*, 104(1), 213-222.
- Mehier-Humbert, S., Bettinger, T., Yan, F., & Guy, R. H. (2005b). Ultrasound-mediated gene delivery: kinetics of plasmid internalization and gene expression. *J Control Release*, 104(1), 203-211.
- Meijering, B. D., Juffermans, L. J., van Wamel, A., Henning, R. H., Zuhorn, I. S., Emmer, M., et al. (2009). Ultrasound and microbubble-targeted delivery of macromolecules is regulated by induction of endocytosis and pore formation. *Circ Res*, 104(5), 679-687.
- Mesika, A., Kiss, V., Brumfeld, V., Ghosh, G., & Reich, Z. (2005). Enhanced intracellular mobility and nuclear accumulation of DNA plasmids associated with a karyophilic protein. *Hum Gene Ther*, 16(2), 200-208.
- Rahim, A., Taylor, S. L., Bush, N. L., ter Haar, G. R., Bamber, J. C., & Porter, C. D. (2006). Physical parameters affecting ultrasound/microbubble-mediated gene delivery efficiency in vitro. *Ultrasound Med Biol*, 32(8), 1269-1279.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., et al. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.

CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES

Au cours de cette thèse, j'ai été amené à évaluer la faisabilité du transfert de gène dans les tendons d'Achilles en utilisant une méthode chimique et une méthode physique.

NANOPARTICULES DE SILICE ET TRANSFERT DE GENE DANS LE TENDON D'ACHILLE

J'ai participé à une étude exploitant les nanoparticules de silice comme méthode de transfert de gène dans le tendon d'Achille de rat lésé. Ce travail a permis de montrer pour la première fois la possibilité d'utiliser des nanoparticules de silice mésoporeuses (MSN) pour le transfert de gène dans les tendons. Les résultats indiquent que la charge des particules n'influence pas l'efficacité du transfert de gène. En effet, les MSN-NH₂ sont aussi efficaces que les MSN-COOH. Il est probable que d'autres liaisons entre l'ADN et la nanoparticule de silice sont mises en jeu telles que les liaisons hydrogène entre le silanol et le groupement phosphate de l'ADN. De même, une partie de l'ADN pourrait être insérée dans les pores de la nanoparticule comme suggère les résultats obtenus par la microscopie de force atomique (article 1).

Ces nanoparticules ont été efficaces pour transférer un gène codant pour le PDGF. Les résultats montrent que deux injections espacées d'une semaine de complexes ADN/MSN (ratio 2:5, 20µg ADN plasmidique) ont permis d'accélérer la réparation tendineuse. Cette réparation a été validée par des analyses histologiques et biomécaniques. Quand bien même ses résultats sont intéressants, la différence entre l'efficacité de transfert de gène du plasmide nu et du plasmide complexé n'est pas très élevée même si l'expression de ce dernier est plus stable.

Pour améliorer ce système, nous développons actuellement des nanoparticules de silice substituées par des résidus histidine reconnu pour améliorer l'échappement des endosomes (collaboration Jean Oliver Durand, ICGM Lyon). Les résultats préliminaires obtenus sont très encourageants.

La matrice tendineuse est majoritairement composée de collagène et la régénération tendineuse nécessite la production de collagène I. Nous avons émis l'hypothèse que la combinaison d'un gène codant le PDGF avec un gène codant la fibromoduline ou la lumican, deux protéoglycanes impliquées dans l'assemblage du collagène pourrait avoir des effets bénéfiques (Ezura *et al.*, 2000). Des études en cours réalisées avec des liposomes histidylés développés au laboratoire (Midoux *et al.*, 2009) indiquent qu'une meilleure réparation des lésions tendineuses a été obtenue après cette cotransfection. Les mécanismes d'action mis en jeu sont en cours d'étude.

SONOPORATION ET TRANSFERT DE GENE DANS LE TENDON D'ACHILLE

Concernant l'exploitation de la sonoporation pour le transfert de gène dans le tendon d'Achille de souris, nos résultats obtenus avec 10µg d'ADN par tendon sont très prometteurs. Notre condition optimale ultrasonore permet une expression du transgène de façon stable pendant 100 jours sans toxicité. Le transfert de gène obtenu est aussi efficace que celui obtenu avec un vecteur adénoviral (Lou *et al.*, 2000). Cette stabilité nous a amené à évaluer cette méthode pour restaurer un gène invalidé dans un modèle de souris *Fmod KO*. Nos résultats sur ce modèle ont montré une restauration phénotypique des fibres de collagène évaluée par microscopie électronique. Il serait à présent intéressant de réaliser des tests biomécaniques afin de déterminer si cette restauration phénotypique observée est accompagnée d'une restauration fonctionnelle.

Le véritable modèle du syndrome d'Ehlers-Danlos est la souris invalidée pour la fibromoduline et la lumican. Les mêmes études restent à réaliser avec ce modèle de souris disponible depuis peu au laboratoire afin de démontrer une restauration fonctionnelle du phénotypique sauvage dans les tendons d'Achille.

En perspective de ce travail, nous envisageons de déterminer les raisons de la stabilité d'expression génique après sonoporation. En effet, même si nous avons retrouvé des copies de plasmide intact dans le tendon d'Achille 100 jours après sonoporation, le type de cellule contenant le transgène reste à déterminer (fibroblastes, ténoblastes, ténocytes). Nous souhaiterons savoir si les conditions de sonoporation utilisées ont permis de transférer plus préférentiellement un type cellulaire donné. Par ailleurs, il serait intéressant d'évaluer l'effet des ultrasons seuls ou couplés aux microbulles sur le transcriptome des tendons traités comparés aux contrôles. Les résultats obtenus pourraient expliquer la nécessité d'effectuer une stimulation ultrasonore durant 10 minutes.

MECANISMES DE LA SONOPORATION IN VITRO

Nos principaux résultats obtenus dans cette partie indiquent que le processus de sonoporation est fortement dépendant des microbulles utilisées, qu'une entrée des microbulles dans les cellules se produit dans les conditions optimales de transfert de gène et qu'une inhibition d'endocytose *via* la voie clathrine altère l'efficacité du transfert de gène. Nous espérons acquérir plus de connaissances fondamentales concernant les phénomènes cellulaires induits par l'application des ultrasons seuls ou associés aux microbulles. Ces informations seront utiles pour exploiter au mieux la méthode. En effet, nous sommes convaincus que l'action physique des ultrasons et des microbulles au niveau de la membrane plasmique induisent des signalisations moléculaires fines qui seront utiles pour mieux comprendre les effets biologiques produits par les ultrasons.

L'ensemble de ces observations nous indique les limites actuelles de cette technique. Elles résident essentiellement dans les microbulles disponibles actuellement. Si les microbulles pénètrent dans la cellule et si l'ADN se retrouve dans des vésicules d'endocytose il semble judicieux de développer des microbulles originales capables à la fois de vectoriser l'ADN et de déstabiliser les membranes cellulaires entre autre membrane plasmique et vésiculaire (Schéma 1). Pour cela, nous exploiterons des lipides cationiques et fusogènes histidylés développés au laboratoire. Nous tâcherons d'obtenir une distribution de taille étroite autour d'un micromètre de diamètre. Ces microbulles doivent être furtives et fonctionnalisables, ceci est possible en utilisant des lipides pégylés.

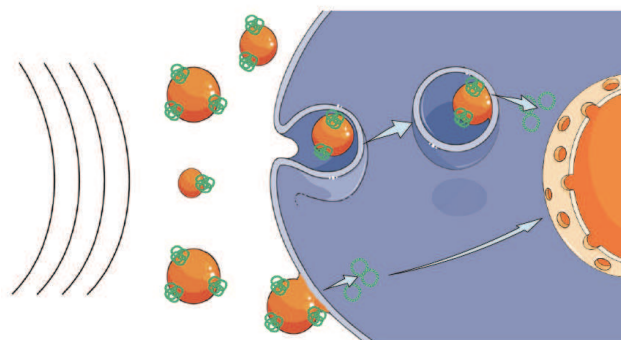


Schéma 1 : Nouvelle stratégie de délivrance de gène par sonoporation. Les microbulles portent à leur surface les acides nucléiques à transférer, ces microbulles sont capables de fusionner à la membrane plasmique afin de délivrer leur cargo ou elles sont capables une fois prises en charge par la voie d'endocytose de s'échapper des endosomes. cercles vert : ADN plasmidique, cercles orange : microbulles.

Enfin, il est actuellement admis que la médecine du futur repose sur une médecine personnalisée impliquant le développement d'outils de théranostique combinant imagerie diagnostique et thérapie. Dans ce cadre, les paramètres ultrasonores utilisés en échographie étant différents de ceux utilisés en sonoporation (fréquence, durée de pulse) il serait intéressant de mettre en place un même appareillage dédié à ces deux applications. Techniquement ceci serait réalisable en utilisant une nouvelle technologie de sonde ultrasonore basée sur les cMUT.

Méthodes de transfert de gènes non virales: application aux pathologies tendineuses

Résumé :

Le tendon est un organe impliqué dans de nombreux troubles musculo squelettiques. Les connaissances des différentes molécules impliquées dans la biologie des tendons permettent d'envisager des traitements par thérapie génique. L'objectif de cette thèse a été d'évaluer la faisabilité de transférer des gènes dans les tendons par deux méthodes non virales : une méthode chimique utilisant des nanoparticules de silice mésoporeuses et une méthode physique reposant sur l'utilisation des ultrasons et des microbulles de gaz (sonoporation). Dans une première étude, nous avons montré que des nanoparticules de silice mésoporeuses sont capables de transférer efficacement des gènes dans le tendon d'Achille de rat. Celles ci ont été utilisées pour transférer le gène du facteur de croissance PDGF dans des tendons lésés. Nos résultats indiquent une accélération de la réparation du tendon lésé. Dans une deuxième étude, nous avons utilisé la sonoporation, technique jamais appliquée aux tendons. Nous avons déterminé les paramètres acoustiques permettant un transfert de gène efficace dans le tendon d'Achille de souris. Une expression stable d'un transgène a été maintenue pendant 100 jours suite à une injection locale d'ADN en présence de microbulles de gaz. Nous avons ensuite utilisé cette méthode dans un modèle de souris transgénique invalidée pour le gène de la fibromoduline possédant des fibres de collagène anormales. Une restauration remarquable du phénotype de ces souris a été observée suite au transfert du gène de la fibromoduline. Nous avons ensuite étudié les interactions entre les microbulles, la membrane plasmique et le transfert de gène dans les cellules sous ultrasons. Ces études ont permis d'identifier pour la première fois, une pénétration des microbulles de gaz dans la cellule et un trafic intracellulaire de l'ADN impliquant la voie d'endocytose clathrine dépendante. En conclusion, les deux méthodes de transfert de gène non virales ont permis de transfecter des gènes efficacement dans les tendons. Ces résultats prometteurs permettent d'envisager leur exploitation pour des applications thérapeutiques dans les pathologies tendineuses.

Mots clés : tendons, transfert de gène, silice, sonoporation, microbulles, ultrasons

Non viral gene transfer methods : application to tendinopathy

Summary :

Tendons are often involved in many musculoskeletal disorders. Knowledge of the different molecules involved in tendons biology allows to consider treatments based on gene therapy. The goal of my work was to evaluate the feasibility of gene transfer in tendons by using two non-viral methods: mesoporous silica nanoparticles and a physical method based on ultrasound-assisted gas microbubbles (sonoporation). In the first study, we showed that mesoporous silica nanoparticles could efficiently transfer genes in rat Achilles tendon. They were used to transfer plasmid DNA encoding PDGF growth factor gene in injured tendons. Data demonstrated that DNA/MSN complexes have improved the healing of injured tendons. In the second study, we used the sonoporation method which has never been applied to the tendons. First, we determined the acoustic parameters for gene transfer in mice Achilles tendon. A stable expression of the transgene was maintained up to 100 days following one local injection of DNA in the presence of gas microbubbles. We then used this method to restore the fibromodulin knocked out gene in a transgenic mouse model having disorganized collagen fibers in tendons. Following the transfer of fibromodulin gene, a remarkable restoration of collagen fibers in these mice was observed. In the last part, we studied the interactions of microbubbles with the plasma membrane and the plasmid DNA internalization into the cells by sonoporation. These studies have identified for the first time a rapid penetration of gas microbubbles inside the cell and an intracellular routing of DNA involving the clathrin-mediated endocytosis pathway. In conclusion, both methods of non viral gene transfer led to an efficient gene transfer in tendons. These promising results obtained during this project allow considering their use for therapeutic applications in tendon diseases.

Keywords : tendons, gene transfer, silica, sonoporation, ultrasound, microbubbles