

Thèse de Doctorat

Claire DOMENGER

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : *Biomolécules, pharmacologie, thérapeutique*

Spécialité : *Biologie des organismes*

Unité de recherche : *INSERM UMR 1089*

Soutenue le 11 décembre 2015

Thèse N° : 31

**Caractérisation du profil d'expression et des potentielles
cibles off-targets d'un U7snRNA optimisé pour le traitement
par saut d'exon de la Dystrophie Musculaire de Duchenne**

JURY

Rapporteurs :

Joëlle MARIE, Directeur de Recherche, UPMC Université Pierre et Marie Curie

Jean-Christophe PAGES, Professeur d'université - Praticien Hospitalier, INSERM U966

Examineurs :

Olivier DANOS, Directeur de Recherche CNRS & Senior Vice President, Cell and Gene therapy, Biogen

Fulvio MAVILIO, Directeur de Recherche, Généthon

Directeur de Thèse :

Philippe MOULLIER, Directeur de Recherche, INSERM UMR 1089

Co-directeur de Thèse :

Caroline LE GUINER, Chargé de Recherche, INSERM UMR 1089

LISTE DES ABREVIATIONS

2'MOE : 2'-O-methoxyl-ethyl	kDa : Kilo daltons
2'OMe : 2'-O-méthyl	lincRNA : Long intergenic non-coding RNA
6MWT : 6 minutes walk test	LNA : Locked nucleic acid
aa : Acides aminés	LOQ : Limit of quantification
AAV(r) : Virus associés aux adénovirus (recombinant)	LR (voie d'injection): intraveineuse locorégionale
ABD1/2 : Actin-binding domain 1/2	<i>mdx</i> : X-linked muscular dystrophy
Ac : Anticorps	miARN : micro ARN
Ad : Adénovirus	MOI : Multiplicity of infection
ADN : Acide desoxyribonucléique	NHEJ : Jonction non homologue des extrémités
ADNc : ADN complémentaire	NMD : Nonsense mediated decay
ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament	nNOS : Oxyde nitrique synthétase neuronale
AON : Oligonucléotides antisens	NO : Oxyde nitrique
ARN : Acide ribonucléique	nt(s): nucléotide(s)
ARNg : ARN guide	ORF : Open reading frame
ARNm : Acide ribonucléique messenger	PAM : Protospacer adjacent motif
Blast: Basic local alignment search tool	pb : paire de bases
BMD : Dystrophie musculaire de Becker	PCA : Analyse à composante principale
BP : Point de branchement	PCR : Réaction de polymérisation en chaîne
Cas9 : CRISPR associated 9	PMO : Phosphoroamidate morpholino oligomer
CK : Créatine kinase	PNA : Peptide nucleic acid
CPP : Cell-penetrating peptides	PS : Phosphorothioates
CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeat	PTC : Premature terminaison codon
<i>CXMD_J</i> : Canine X-linked muscular dystrophy in Japan	PTT : Séquence polypyrimidique
DAPC : Dystrophin associated protein complex	QPCR : PCR quantitative
DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne	RH : Recombinaison homologue
Dp : Dystrophin product	RISC : RNA-inducing silencer complex
DSB : Double strand break	RMN : Résonance magnétique nucléaire
Dtex : Double target exon	RT-QPCR : PCR quantitative à base d'ARN rétro transcrit en ADNc
EMA : European medicines agency	RyR : Récepteur à la ryanodine
ESE : Exonic splicing enhancer	shRNA : Short hairpin RNA
ESS : Exonic splicing silencers	siRNA : small interfering RNA
FC: Fold change	SMN : Survival of motor neurons
FDA : Food and drug administration	SmOPT : Site de fixation aux protéines Sm optimisé (pour U7)
GFP : Green fluorescent protein	SR : Protéines riches en sérine-arginine
GRMD : Golden retriever muscular dystrophy	TAL : Transcription activator like
HDAd : Helper dependant adenoviral vector	TALEN : Transcription activator-like effector nuclease
hnRNP : Ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes	UsnRNA : uridin rich small nuclear RNA
IDLV : Integration deficient lentiviral vectors	UsnRNP : uridin rich small nuclear ribonucleoparticles
IM (voie d'injection) : intramusculaire	vg/dg : Vector genome per diploid genome
ISE : Intronic splicing enhancer	vg/kg : Vector genome per kilogramm
ISS : Intronic splicing silencers	WT : Wild type
ITR : Inverted terminal repeat	ZFN : Zing finger nucleases
	ZFP : Zinc finger protein

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Photographies de Duchenne de Boulogne.	22
Figure 2: Dessin illustrant la « manœuvre de Gowers ».....	24
Figure 3: Coupes histologiques illustrant la dégénération musculaire de la DMD.	25
Figure 4: Représentation schématisque du chromosome X humain et du gène <i>DMD</i>	27
Figure 5 : Représentations schématiques de la structure des différents variants de la protéine dystrophine	31
Figure 6: Schéma des principaux composants du complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC)	32
Figure 7 : Les mutations sur le gène <i>DMD</i>	35
Figure 8 : Représentation schématisque de la « règle de Monaco ».	36
Figure 9 : Représentations schématiques des plasmides et particules virales des trois principaux vecteurs viraux de thérapie génique utilisés dans le cadre de stratégies thérapeutiques de la DMD	52
Figure 10 : Représentation schématisque du génome de l'AAV sauvage.....	58
Figure 11 : Tropisme des vecteurs AAVr dérivés des sérotypes naturels d'AAV.	59
Figure 12 : Méthode de production des vecteurs AAVr par tri-transfection.....	61
Figure 13 : Représentation schématisque de la structure protéique de la dystrophine complète et de différents exemples de mini ou microdystrophines.	65
Figure 14 : Les stratégies de transfert de gène par double vecteur AAVr.	69
Figure 15 : La surexpression d'utrophine chez des souris <i>mdx</i> transgéniques.	71
Figure 16 : Représentation schématisque de la stratégie de correction génique par translecture de mutations non-sens.	75
Figure 17 : Représentation schématisque du saut d'exon naturel de l'ARN pré-messager <i>DMD</i>	77
Figure 18 : Les sites d'épissage et la réaction d'épissage	82
Figure 19 : Représentation schématisque de l'assemblage des principaux composants du spliceosome au cours de la réaction d'épissage	84
Figure 20 : Modèles de régulation de l'épissage..	87
Figure 21 : Les cinq modes classiques d'épissage alternatif.	89
Figure 22 : Sites de modifications chimiques des ribonucléotides sur les AON.	91
Figure 23 : Représentations schématiques des principaux AON	93
Figure 24 : Représentation schématisque des approches thérapeutiques basées sur les modulations de l'épissage par les oligonucléotides antisens (AON).	94
Figure 25 : Mécanismes moléculaires de la maturation 3' des ARN pré-messagers des histones via le U7snRNP.	103
Figure 26 : Séquence du U7snRNA humain.	104
Figure 27 : Structure de l'anneau de protéines Sm spécifique du U7snRNP et des autres UsnRNP du spliceosome.	105
Figure 28 : Représentation schématisque des U1snRNA et U7snRNA.	107
Figure 29: Différents types de off-targets pouvant être observés suite à l'administration d'un oligonucléotide dans un organisme.	116
Figure 30 : Architecture et mode d'action des nucléases ZFN (A), TALEN (B) et CRISPR/Cas9 (C).	122
Figure 31 : Représentation schématisque des sondes utilisées pour différents types de microarrays.	131
Figure 32 : Représentation schématisque d'un protocole de RNAseq.	133
Figure 33 : Représentation schématisque des grandes étapes du projet DMD/U7.....	139
Figure 34: Modèle de saut d'exon chez le chien <i>GRMD</i>	140
Figure 35: Représentation schématisque du plan d'étude suivi par chaque chien <i>GRMD</i> de l'étude pré-clinique DMD/U7.....	141
Figure 36 : Représentation schématisque du génome du vecteur AAVr-8-U7-Dtex53.	146
Figure 37: Profil de biodistribution du vecteur AAVr-8-U7-E6/8 dans les muscles injectés et à distance.	156
Figure 38 : Analyse du saut d'exon au niveau du messenger <i>DMD</i> dans les muscles des chiens injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-E6/E8..	157
Figure 39 : Quantification par RT-QPCR de l'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 dans les tissus des chiens <i>GRMD</i> injectés.	161

Figure 40: Quantification relative par Northern blot de l'expression des U7snRNA-E6 et -E8 dans les tissus des chien <i>GRMD</i> injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-E6/E8.	163
Figure 41 : Analyse du saut d'exon du messenger <i>DMD</i> dans les muscles et le foie de chiens injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-E6/E8	164
Figure 42 : Quantification par RT-QPCR de l'expression du U7snRNA-Dtex53 chez les primates non humains injectés avec différentes doses du vecteur AAV8r-U7snRNA-Dtex53.	166
Figure 43 : Quantification relative par Northern blot de l'expression du U7snRNA-Dtex53 dans les tissus des primates injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-Dtex53.	167
Figure 44 : Analyse du saut d'exon du messenger <i>DMD</i> dans les muscles et les foies de primates non humains injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-Dtex53.	168
Figure 45 : Etude comparative de plusieurs constructions U7snRNA-antisens pour le saut de l'exon 53 du messenger <i>DMD</i> humain.	170
Figure 46 : Représentation schématique du génome du vecteur AAVr-8-U7-Jr53.....	171
Figure 47 : Marquage par immunofluorescence de la chaîne lourde de la myosine dans les myotubes primaires humains	173
Figure 48 : Caractérisation des modèles cellulaires musculaires par analyse de l'expression de gènes spécifiquement musculaires.....	174
Figure 49 : Observations microscopiques des différents modèles d'hépatocytes humains.	175
Figure 50: Caractérisation des modèles cellulaires hépatiques par analyse de l'expression de gènes spécifiquement hépatiques.....	176
Figure 51 : Exemples représentatifs des résultats d'expression de GFP obtenus après transduction d'hépatocytes et de myoblastes primaires humains transduits avec différents sérotypes d'AAVr-GFP.	178
Figure 52 : Représentation schématique de la distribution théorique des particules d'AAVr au sein des myoblastes et hépatocytes humains transduits par un AAVr.	180
Figure 53: Quantification des fractions cytoplasmiques et nucléaires après fractionnement de cellules Hela...	181
Figure 54: Quantification par RT-QPCR de l'expression du U7snRNA-Jr53 dans les modèles cellulaires humains.	184
Figure 55: Analyse du saut d'exon du messenger <i>DMD</i> dans des cellules humaines non transduites ou transduites avec le vecteur AAVr-3-U7-Jr53.	185
Figure 56 : Analyse de l'expression relative du U7snRNA WT dans le muscle squelettique et le foie, chez le chien, le primate et l'Homme.	186
Figure 57 : Représentation schématique des tests croisés imaginés pour comprendre le différentiel d'expression des U7snRNA-E6 et -E8 entre les muscles et le foie chez le chien <i>GRMD</i>	188
Figure 58 : Quantification par RT-QPCR de l'expression relative des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 <i>in vitro</i> dans des cellules canines..	189
Figure 59 : Distribution des scores miRanda par rapport au nombre de cibles positives pour le U7snRNA-Jr53.	197
Figure 60 : Analyse par RT-PCR nichée des effets off-targets potentiels sur les messagers des gènes candidats PDE4DIP, DST et TOP1.	200
Figure 61 : Analyse par RT-QPCR des effets off-targets sur les messagers des gènes candidats SNTB2, NDUFB10 et DMGDH.	201
Figure 62 : Quantification par RT-QPCR de l'expression du U7snRNA-Jr53 dans les échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains non transduits (NT) ou transduits avec un vecteur AAVr-3-U7-Jr53 (U7) analysés en RNAseq.	203
Figure 63 : Illustration de l'alignement de reads obtenus après RNAseq sur deux isoformes d'un transcrit	205
Figure 64: Sashimi plot (logiciel « Integrative Genomics Viewer ») montrant le nombre de reads obtenus et alignés au niveau du transcrit <i>DMD</i> , après RNAseq	207
Figure 65: Représentation des variations d'utilisation de jonctions d'exons analysées par DEXseq entre les myotubes primaires humains non transduits et transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53.	210
Figure 66: Représentation des variations d'utilisation de jonctions d'exons analysées par DEXseq entre les hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53.....	211

Figure 67: Diagrammes de Venn représentant le nombre de jonctions différentielles identifiées entre nos échantillons de myotubes ou d'hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec l'AAVr-U7-Jr53, et chevauchant un motif de fixation putatif de la séquence antisens du U7-Jr53.	214
Figure 68: Corrélation entre l'expression du U7snRNA-Jr53 détectée par RT-QPCR et le nombre de reads alignés sur la séquence du U7snRNA-Jr53.	216
Figure 69: Représentation des différences d'expression des gènes analysés par DESeq2 entre les myotubes primaires humains non transduits et transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53.....	219
Figure 70: Représentation des différences d'expression des gènes analysés par DESeq2 entre les hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53.....	220
Figure 71 : Représentations graphiques obtenues après analyses à composantes principales (PCA) des données d'expression globale obtenues à partir d'échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec l'AAVr-U7-Jr53..	221
Figure 72 : Représentation schématique de la méthodologie d'analyse des effets off-targets spécifiques du U7snRNA-Jr53 après analyse RNAseq.	312

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Applicabilité du saut d'exon chez les patients DMD selon la nature de leur mutation génétique.....	97
Tableau 2 : Différentes cohortes de chiens <i>GRMD</i> incluses dans l'essai pré-clinique	144
Tableau 3 : Récapitulatif des rats inclus dans l'étude de toxicologie.....	146
Tableau 4 : Récapitulatif des primates inclus dans l'étude de toxicologie	147
Tableau 5 : Résultats des tests de reproductibilité du fractionnement cellulaire réalisés sur myoblastes primaires humains.	182
Tableau 6 : Résultats des tests de fractionnement cellulaire réalisés sur les hépatocytes primaires humains....	183
Tableau 7 : Résultats de prédictions <i>in silico</i> des transcrits ayant un motif de fixation du U7snRNA-Jr53.....	198
Tableau 8 : Caractéristiques des 6 gènes candidats sélectionnés pour des validations expérimentales	199
Tableau 9 : Nombre de reads bruts alignés sur la séquence ARN du U7snRNA-Jr53 en fonction du nombre de reads total alignés sur le génome humain de façon unique.....	216

SOMMAIRE

PREAMBULE	13
INTRODUCTION	17
CHAPITRE 1 : La Dystrophie musculaire de Duchenne.....	19
A- Historique.....	21
B- Progression de la maladie.....	22
C- Histologie	24
D- La Dystrophie Musculaire de Becker.....	25
E- Le gène DMD	26
F- La protéine dystrophine et ses différentes isoformes.....	28
1) La dystrophine.....	28
2) Les différentes isoformes de la dystrophine.....	29
3) Le complexe DAPC et le rôle de la dystrophine dans le muscle	31
G- Les mutations sur le gène DMD.....	34
1) Les différentes mutations	34
2) Corrélation génotype/phénotype: “la règle de Monaco”	35
H- Les modèles animaux de la DMD	39
1) Les souris déficientes en dystrophine	39
2) Les nouveaux modèles de rat dystrophiques.....	40
3) Les modèles canins de DMD	40
4) Les autres modèles animaux de la DMD	41
CHAPITRE 2 : Les thérapies de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	43
A- Soins généraux anti-symptomatiques.....	45
1) Les corticostéroïdes.....	45
2) L’assistance respiratoire.....	46
3) Traitement de la cardiomyopathie.....	46
4) Prise en charge orthopédique	47
5) Autres traitements pharmacologiques	47
B- La thérapie cellulaire	48
C- La thérapie génique par addition d’un gène thérapeutique.....	50
1) Les vecteurs viraux de thérapie génique	51
2) Les vecteurs rétroviraux/lentiviraux	54
3) Les vecteurs adénoviraux.....	55
4) Les vecteurs dérivés des virus associés aux adénovirus (AAV)	57
D- Les stratégies de thérapie génique d’addition pour le traitement de la DMD	63
1) Thérapie génique d’addition par transfert d’une dystrophine tronquée (mini ou micro-dystrophine).....	63

2) Thérapie génique d'addition visant à réguler l'expression d'autres protéines que la dystrophine	69
a- Surexpression d'utrophine.....	70
b- Inhibition de la myostatine.....	72
E- Les stratégies de thérapie génique corrective pour le traitement de la DMD	73
1) Altération ciblée du gène DMD	73
2) Translecture des codons stop	74
3) Le saut d'exon.....	76
CHAPITRE 3 : Le saut d'exon comme thérapie de la dystrophie musculaire de Duchenne.....	79
A- Les mécanismes d'épissage des ARN pré-messagers	81
1) Le spliceosome.....	81
2) Les éléments introniques et exoniques régulateurs de l'épissage	85
a- Les enhancers d'épissage	85
b- Les inhibiteurs d'épissage	86
3) L'épissage alternatif.....	88
4) Les mutations perturbant l'épissage.....	89
B- Utilisation des oligonucléotides antisens (AON) pour le saut d'exon de la DMD.....	90
1) L'outil AON	90
a- Les différentes générations d'AON.....	90
b- La conception des AON pour la modulation de l'épissage	93
2) Les essais pré-cliniques in vitro et in vivo utilisant des AON	95
3) Les essais cliniques utilisant des AON	96
4) Les méthodes d'optimisation	100
C- Le U7snRNA comme vecteur de séquences antisens.....	102
1) Le U7snRNA WT	102
2) Le U7snRNA comme outil optimisé pour le saut d'exon	106
3) Le saut d'exon du transcrit dystrophine médié par un U7snRNA	108
4) L'optimisation des U7snRNA.....	110
CHAPITRE 4 : Les potentiels effets off-target des stratégies antisens	113
A- Définition des effets off-targets.....	115
1) Les effets off-targets non dépendants de l'hybridation à une séquence nucléotidique	116
2) Les effets off-targets dépendants de l'hybridation à une séquence nucléotidique	118
B- La mise en évidence expérimentale des off-targets séquence-spécifiques.....	119
1) Les effets off-targets des siRNA	119
2) Les effets off-targets des nucléases modifiées pour l'édition génomique.....	121
a- Les effets off-targets des ZFN.....	122
b- Les effets off-targets des TALEN	124
c- Les effets off-targets des CRISPR / Cas9	126
3) Les effets off-targets des oligonucléotides antisens	128
C- Techniques d'identification des effets off-targets séquence-spécifiques	129

CHAPITRE 5 : Contexte et objectifs de la thèse : développement pré-clinique d'un produit de thérapie génique pour le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne..... 135

A- Les caractéristiques du projet DMD/U7.....	137
B- Le projet pré-clinique DMD/U7 : étude de dose chez le chien GRMD	139
C- Le projet pré-clinique DMD/U7 : études de toxicologie	145
D- L'essai clinique DMD/U7 de phase I/II prévu en 2016	148
E- Objectifs de mon travail de thèse.....	148

RESULTATS 151

PARTIE 1 : Etude des profils d'expression de U7snRNA optimisés pour le saut d'exon du messenger DMD..... 153

A- Profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 chez le chien GRMD.....	155
1) Profil de transduction et efficacité thérapeutique de l'injection locorégionale d'un vecteur AAVr-8-U7-E6/E8 chez le chien GRMD	155
a- Biodistribution du vecteur AAVr-8-U7-E6/E8	155
b- Restauration de l'expression de dystrophine dans les muscles des chiens injectés	156
c- Les améliorations histologiques et fonctionnelles chez les chiens injectés.....	158
2) Analyse des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8	159
a- Analyse des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 par RT-QPCR	159
b- Analyse des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 par Northern blot ..	162
c- Analyse de l'activité moléculaire des U7snRNA-E6-E8 par RT-PCR nichée.....	163
B- Profil d'expression du U7snRNA-Dtex53 chez le primate non-humain	165
1) Biodistribution du vecteur AAVr-8-U7-Dtex53	165
2) Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Dtex53	165
a- Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Dtex53 par RT-QPCR.....	165
b- Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Dtex53 par Northern blot.....	166
c- Analyse de l'activité moléculaire du U7-Dtex53 par RT-PCR nichée.....	167
C- Optimisation de la séquence du produit clinique AAVr-8-U7snRNA	168
D- Profil d'expression du U7snRNA-Jr53 chez l'Homme.....	171
1) Développement de modèles cellulaires humains pertinents.....	171
a- Modèles cellulaires musculaires.....	172
b- Modèles cellulaires hépatiques	174
c- Transduction des modèles cellulaires humains à l'aide d'un vecteur AAVr.....	176
2) Profil d'expression du U7snRNA-Jr53 chez l'Homme.....	179
a- Détermination du nombre de copies de vecteur in vitro par fractionnement cellulaire.....	179
b- Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Jr53 par RTqPCR, en l'absence de normalisation	183
c- Analyse de l'activité moléculaire du U7-Jr53 par RT-PCR nichée.....	184
E- Pourquoi les ARN U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 sont-ils si peu exprimés dans le foie de chien ?	185
F- Conclusion générale.....	190

PARTIE 2 : Recherche des cibles off-targets potentielles du U7snRNA-Jr53 chez l'Homme..... 193

A- Stratégie 1 : Analyses in silico des potentielles cibles off-targets spécifiques du produit thérapeutique U7snRNA-Jr53	196
B- Stratégie 2 : Analyse transcriptomique par RNAseq des potentiels effets off-targets du produit thérapeutique U7snRNA-Jr53 par analyses RNAseq.....	202
1) Approche méthodologique	202
2) Analyse des effets du U7snRNA-Jr53 sur l'épissage d'exons au niveau du transcriptome humain	204
a- Approche analytique via le logiciel DEXseq	204
b- Validation du saut d'exon sur l'ARNm DMD, cible du U7snRNA-Jr53	205
c- Analyse des jonctions d'exons différenciellement utilisées dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53.....	208
d- Analyse ciblée des jonctions différenciellement utilisées dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53: identification des candidats off-targets possédant un motif de fixation du U7snRNA-Jr53	212
3) Analyse des effets du U7snRNA-Jr53 sur l'expression des gènes humains	214
a- Approche analytique via le logiciel DESeq2.....	214
b- Validation de l'expression du U7snRNA-Jr53 en RNAseq.....	215
c- Analyse des gènes différenciellement exprimés dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53	217
d- Analyse ciblée des gènes différenciellement exprimés dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53 : identification des candidats off-targets possédant un motif de fixation du U7snRNA-Jr53.....	222
4) Approche méthodologique pour les validations expérimentales des candidats off-targets, cibles du U7snRNA-Jr53.....	223
C- Conclusion générale	225

DISCUSSION..... 229

A- Efficacité du produit thérapeutique AAVr-U7snRNA.....	233
B- Evaluation de la potentielle toxicité du produit AAVr-U7snRNA.....	238
1) Potentiels effets toxiques dus à la capsid du vecteur AAV recombinant	238
2) Potentiels effets toxiques spécifiques du transgène U7snRNA - Expression du transgène	239
a- Expression du U7snRNA à distance chez les chiens vs les primates non-humains	239
b- Analyse de l'expression du U7snRNA in vitro, quelle pertinence ?.....	241
c- Pourquoi une absence d'expression du U7snRNA dans le foie des chiens GRMD ?	244
d- Pourquoi une expression de la dystrophine Dp427 dans le foie ?.....	246
3) Potentiels effets toxiques spécifiques du transgène U7snRNA – Effets off-targets	247
a- Choix des méthodes d'analyses, stratégie 1 vs stratégie 2	248
b- Effets off-targets identifiés in vitro après transduction par un AAVr-U7-Jr53.....	252
4) Réflexions générales finales :.....	257

BIBLIOGRAPHIE 261

MATERIEL ET METHODES..... 299

ANNEXES 313

PREAMBULE

La Dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie neuromusculaire létale caractérisée par une atrophie et une faiblesse musculaire progressive résultant de la dégénérescence des fibres musculaires de l'ensemble de l'organisme. C'est la plus sévère et la plus fréquente des dystrophies musculaires et touche environ 1 garçon sur 5000 à la naissance (Mendell 2012). Elle est due à des mutations localisées dans le gène *DMD* qui s'étend sur près de 2,5 Mb et qui code une protéine du cytosquelette, la dystrophine. L'absence de protéine dystrophine entraîne diverses perturbations au niveau de la membrane des fibres musculaires qui, fragilisées, finissent par nécroser. Les premiers signes cliniques d'atteinte musculaire apparaissent généralement autour de l'âge de 3 ans. Les garçons perdent ensuite leur indépendance à la marche avant l'adolescence et décèdent généralement d'atteintes respiratoires et/ou cardiaques dans leur 2^{ème} ou 3^{ème} décennie.

Malheureusement, à l'heure actuelle, aucun traitement n'a montré suffisamment d'efficacité pour stopper la dégénérescence musculaire liée à la DMD. S'il a pu être montré qu'un traitement pharmacologique continu à base de corticoïdes permet de ralentir significativement la progression de la maladie (Mendell 1989), ce traitement, lourd en effets secondaires, n'est pas toujours bien toléré par les patients. De même, la mise en place d'une assistance respiratoire permet parfois de prolonger l'espérance de vie de près de 10 ans (Eagle 2007), mais toujours dans des conditions de faiblesse musculaire et de dépendance élevées. Ces dernières années, de nombreuses stratégies pharmacologiques, de thérapie cellulaire ou de thérapie génique ont émergé. Suite à des résultats très encourageants obtenus chez l'animal, certaines approches sont aujourd'hui évaluées en essai clinique, chez des patients DMD.

Avec le développement et l'optimisation de méthodes de transfert de gènes de plus en plus sûres avec les vecteurs viraux, et notamment les vecteurs viraux recombinants dérivés des virus adéno-associés (AAV), la thérapie génique offre aujourd'hui la possibilité de corriger le défaut génétique à la source, et ce à l'échelle du muscle mais aussi de l'organisme. Hormis les stratégies classiques de thérapie génique par addition du gène thérapeutique, des stratégies dites de thérapie génique correctrice, permettent la correction directe du défaut génétique et ainsi le maintien du niveau d'expression naturels des gènes et de l'équilibre de la cellule.

Parmi ces thérapies géniques correctives, le saut d'exon est une approche très prometteuse pour la correction des défauts génétiques causant la *DMD*. Un saut d'exon peut être induit par une courte séquence antisens, insérée dans un U7snRNA modifié et vectorisé dans un AAV recombinant. Une fois dans les cellules musculaires, cette séquence antisens va être capable d'interférer avec les mécanismes naturels d'épissage et permettre d'exclure un (ou plusieurs) exon(s) ciblé(s) pour finalement restaurer un cadre de lecture correct dans l'ARN messager mature. La protéine dystrophine en résultant sera certes partiellement tronquée, mais fonctionnelle (Goyenvallé 2004). C'est sur cette approche thérapeutique « AAVr-U7snRNA » que s'est particulièrement focalisé mon travail de thèse.

En effet, notre laboratoire, en collaboration avec d'autres grands laboratoires français, participe au développement d'un tel produit thérapeutique AAVr-U7snRNA, conçu pour le traitement de la *DMD* par saut d'exon. L'objectif est de pouvoir débiter un essai clinique courant 2016, afin d'évaluer la biosécurité et l'efficacité de ce produit thérapeutique après administration chez des patients atteints de *DMD*.

Ce manuscrit retrace les différentes étapes et les différents challenges auxquels nous avons dû répondre lors du développement pré-clinique de ce produit thérapeutique innovant, depuis la preuve d'efficacité chez le chien *GRMD*, modèle canin de la *DMD* (Le Guiner 2014), jusqu'à l'évaluation de sa potentielle toxicité *in vivo* chez le rat et le primate non-humain mais aussi *in vitro* dans des modèles cellulaires humains pertinents. Au sein de ce vaste projet, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit, s'est plus particulièrement articulé autour de :

- L'évaluation de l'efficacité d'un produit thérapeutique AAVr-U7snRNA chez le chien *GRMD*, via la détermination :
 - du profil de transduction des muscles injectés
 - de l'activité moléculaire du transgène thérapeutique dans les muscles transduits, y compris l'efficacité du saut d'exon sur le transcrit dystrophine
- L'évaluation de la toxicité d'un produit thérapeutique AAVr-U7snRNA, via la détermination :
 - du profil de biodistribution du vecteur thérapeutique au sein de l'organisme traité
 - du profil d'expression du transgène thérapeutique dans les tissus non ciblés

- des potentielles cibles « off-targets » du produit thérapeutique dans des modèles cellulaires humains

Avant de présenter et de discuter les résultats de cette étude, nous introduirons la pathologie DMD, ses causes et ses symptômes. Puis nous détaillerons les approches thérapeutiques de la DMD disponibles aujourd'hui ou en cours de développement, et tout particulièrement la stratégie de saut d'exon. Enfin, nous expliquerons en quoi l'analyse des potentielles cibles « off-targets » est une phase critique dans le développement des outils de saut d'exon et quelles méthodes peuvent être utilisées pour les détecter. Le contexte et l'objectif de la thèse seront finalement présentés.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1 :

La Dystrophie musculaire de Duchenne

A- Historique

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) porte le nom du médecin neurologue français Guillaume-Benjamin Duchenne, surnommé Duchenne de Boulogne (1806-1875) qui l'a caractérisée durant les années 1860. Pourtant les premières descriptions cliniques de patients probablement atteints de DMD remontent aux années 1830 avec les observations de Charles Bell (1774-1842) ou encore les rapports de G. Conte (1798-1858) et L. Gioja, de Naples, décrivant une faiblesse musculaire progressive et un élargissement des muscles chez deux frères en 1938 (Tyler 2003). C'est Edward Meryon (1809-1880), médecin anglais, qui a proposé les premières descriptions cliniques et pathologiques précises de la DMD en 1851 dans son article intitulé « On granular and fatty degeneration of the voluntary muscles » (Meryon, 1852). Il y résumait ses observations cliniques et histologiques (basées sur des autopsies post-mortem) de plusieurs garçons atteints de faiblesse et de perte musculaire (et de leurs sœurs, saines) de 3 familles différentes.

Une dizaine d'années plus tard, Duchenne de Boulogne faisait lui aussi la description de cas de garçons atteints de DMD (figure 1) mais il accorda tout d'abord à la maladie nommée « paraplégie hypertrophique de l'enfance », une origine neurologique ; en désaccord avec E. Meryon et ses observations montrant une moelle épinière et des nerfs sains chez les enfants atteints. Peu après, Duchenne mit au point son « emporte pièce histologique », le premier outil permettant la réalisation de biopsies musculaires *intra-vitam*. Ceci lui permit en 1868 de décrire, de façon bien plus claire et approfondie que ne l'avait fait Meryon, la maladie qu'il renomma alors « dystrophie musculaire pseudo-hypertrophique » (Duchenne 1868). Il valida l'origine musculaire, et non neurologique, de l'affection et détailla les différents stades de la maladie (mouvements faibles, hypertrophie apparente des muscles des membres inférieurs et finalement paralysie générale), ainsi que l'apparition importante de fibrose et le remplacement progressif des fibres musculaires par du tissu adipeux (Jay 2001, Tyler 2003). Passionné d'électrophysiologie, Duchenne tenta une approche thérapeutique par des stimulations électriques localisées et montra qu'il était alors possible d'améliorer la condition des patients dans les premières phases de la maladie, mais que les effets n'étaient que transitoires à un stade plus avancé (Duchenne 1868).

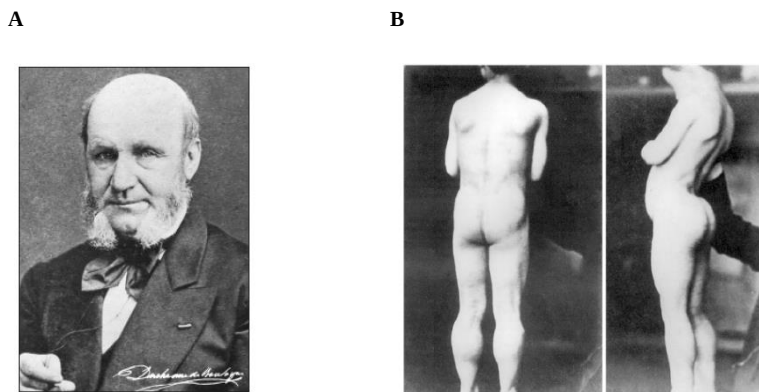


Figure 1 : A : Duchenne de Boulogne (1806-1875) (Parent 2005) ; B : Photographie du premier patient (Cas I, Joseph Sarrazin) de Duchenne (tirée de Tyler 2003).

A partir de 1879, William Richard Gowers (1845-1915) contribua à la description clinique de la maladie, notamment en décrivant et illustrant la manière caractéristique dont les enfants atteints de DMD se relèvent du sol, encore aujourd'hui référencée comme la « manœuvre de Gowers ». Il observa également que la maladie touchait principalement les garçons et qu'il s'agissait principalement de cas familiaux avec une hérédité transmise par la mère (Tyler 2003).

B- Progression de la maladie

La DMD est une maladie génétique récessive et liée à l' X ; elle est la plus sévère des dystrophies musculaires et se caractérise par une dégénérescence progressive de l'ensemble des tissus musculaires. La DMD est aussi la plus fréquente des dystrophies musculaires puisqu'elle touche environ 1 garçon sur 5000 naissances (d'après de récentes estimations) (Mendell 2012, Mah 2014).

A la naissance, les garçons ne présentent aucun signe clinique de la maladie ; même s'il est parfois possible de détecter des anomalies sur les biopsies musculaires dès le second trimestre de grossesse ou chez les nouveaux nés (Merlini 2015). Généralement, les premiers symptômes se manifestent au cours de la croissance, avec un retard à l'apprentissage de la marche (autour de 18 mois) (Moser 1984), un léger défaut de croissance (Eiholzer 1988) et une élévation du taux de créatine kinase (CK) sérique (10 à 100 fois plus élevé que le taux normal) libérée dans le sérum lors de la dégradation du tissu musculaire. Plus tard, entre 2 et 6 ans, la force musculaire chute de 50 à 60 % (Mendell et Lloyd-Puryear 2013) ; les enfants présentent un affaiblissement progressif des muscles proximaux des membres se traduisant par une

démarche dandinante avec une tendance à tomber, des difficultés à courir, à monter des escaliers ou encore à se relever du sol adoptant ainsi « la manœuvre de Gowers » (figure 2). Ces difficultés motrices sont associées à une pseudo-hypertrophie de certains muscles, particulièrement des mollets et des deltoïdes, due au remplacement des muscles par de la fibrose ou du tissu adipeux. L'affaiblissement et la perte de la masse musculaire se fait de façon symétrique touchant les muscles proximaux des membres inférieurs, la ceinture pelvienne, le tronc et l'abdomen ainsi que dans une moindre mesure, les muscles des épaules et les muscles proximaux des membres supérieurs (Moser 1984).

La faiblesse musculaire, la perte des réflexes des tendons dans ces muscles et les contractures articulaires résultent en l'incapacité de marcher et la dépendance au fauteuil roulant chez les enfants autour de l'âge de 12 ans (Moser 1984, Gardner-Medwin 1980, Blake 2002). La perte de l'usage des muscles des bras intervient plus tard dans le développement de la maladie, de même que l'apparition progressive de déformations de la colonne vertébrale (cyphoscolioses, combinant cyphoses et scolioses) notamment causées par les contractures asymétriques au niveau des hanches et l'inclinaison du bassin due à la position assise permanente des enfants. La déformation thoracique et l'atteinte du diaphragme et des muscles intercostaux sont à l'origine d'insuffisances respiratoires ayant longtemps entraîné le décès des patients autour de l'âge de 20 ans. Aujourd'hui, grâce notamment à l'utilisation systématique de la ventilation assistée, l'âge moyen de décès a reculé à 30-40 ans (voir *Chapitre 2, A-2*). La mort peut également résulter d'un arrêt cardiaque (10 à 20 % des cas) puisque l'atteinte cardiaque est quasiment constante dès la fin de l'adolescence chez les patients (Moser 1984, Manzur et Muntoni 2009). Les premiers signes d'atteinte cardiaque se traduisent par une dilatation et une hypertrophie du ventricule gauche qui progressent en une cardiomyopathie dilatée. Des anomalies de l'ECG (électrocardiogramme) telles des tachycardies et variations du rythme cardiaque sont également présentes et associées à des changements morphologiques du muscle cardiaque, des défauts de conductance et à l'apparition de fibrose (Westering 2015).

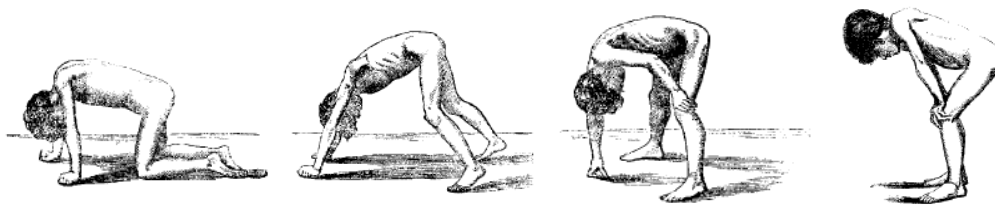


Figure 2: Dessin illustrant la « manœuvre de Gowers » d'un enfant DMD se relevant du sol (tirée de Tyler 2003)

Certains patients DMD peuvent également présenter des troubles cognitifs et des retard mentaux (Blake 2000) : la moyenne de leur quotient intellectuel (QI) est de 80 et 20% des patients ont un QI inférieur à 70 (Moser 1984, Emery 2002). Ces handicaps mentaux sont davantage accentués dans les capacités de langage et de lecture. Le degré de handicap mental varie de façon considérable entre patients, ne progresse pas avec la maladie et aucune corrélation ne peut être faite avec l'âge ou la sévérité de l'atteinte musculaire ; il est par contre relié à l'absence de la protéine dystrophine dans le cerveau (Blake 2000 et *Chapitre 1, F-2*).

Il existe également des femmes porteuses symptomatiques de la DMD (5-10%) qui, en partie à cause d'un biais dans le processus d'inactivation du chromosome X, présentent certains des symptômes de la DMD : augmentation du taux de CK sérique, pseudo-hypertrophie des mollets, crampes et faiblesses musculaires (souvent asymétriques et touchant les muscles proximaux) (Mercier 2013, Emery 2002). Ces symptômes peuvent se développer dès l'enfance ou uniquement à l'âge adulte. Les femmes porteuses peuvent également développer des altérations cardiaques (40% des porteuses DMD) ou une cardiomyopathie dilatée (8% des porteuses DMD) sans autre signe d'affaiblissement musculaire (Hoogerwaard 1999).

C- Histologie

Sur le plan histologique, les premières observations au microscope de coupes de biopsies musculaires faisaient état de processus de nécrose (rupture du sarcolemme, phagocytose des fibres musculaires) et de régénération des fibres (petites fibres musculaires, cytoplasme basophile et noyaux centraux) dès la naissance et donc avant même l'apparition des premiers signes cliniques. D'autres caractéristiques histologiques des muscles DMD sont l'anisocytose, avec une grande hétérogénéité dans le diamètre des fibres musculaires (fibres en régénération, atrophiées ou hypertrophiées) et la localisation centrale des noyaux des fibres multi-nucléées (Bell et Conen 1968). La nécrose des fibres est également associée à l'apparition

d'infiltrats de cellules inflammatoires telles que macrophages et lymphocytes T CD4+ (MacDouall 1990).

Avec la progression de la maladie, les cycles de dégénération/régénération se font plus rares et les fibres nécrotiques prennent le dessus : une atrophie musculaire avec diminution du nombre de fibres est alors observée. La fibrose, d'abord endomysiale puis pérимysiale, apparaît entre les fibres et les sépare des capillaires sanguins (Desguerre 2009), puis la fibrose augmente en corrélation avec l'aggravation de la maladie pour remplacer les fibres nécrosées. Finalement le tissu est infiltré par les adipocytes et le tissu musculaire des patients est remplacé par du tissu fibro-adipeux (figure 3).

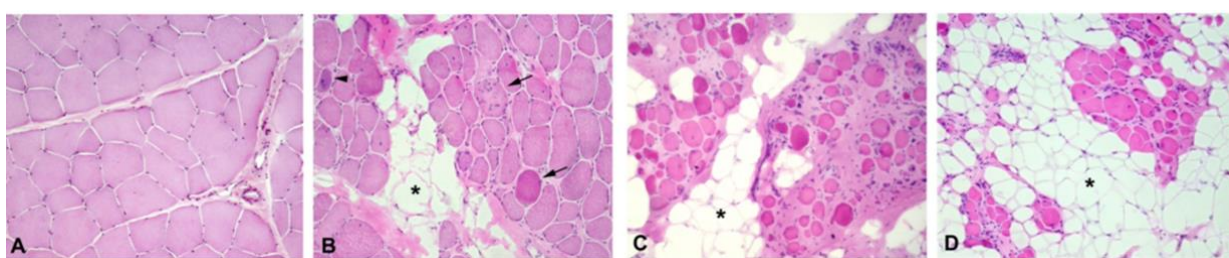


Figure 3 : Coupes histologiques illustrant la dégénération musculaire de la DMD. A : Coupe transversale de muscle d'un patient sain. B, C, D : Coupes transversales de muscle d'un patient DMD à différents stade de la maladie. Certains aspects caractéristiques du muscle DMD sont visibles : les fibres sont de petites tailles, certaines nécrotiques (flèches), d'autres en régénération (tête de flèche) et le tissu musculaire est progressivement remplacé par du tissu fibreux (surtout en C), et adipeux (astérisque) (tirée de Skuk 2004).

D- La Dystrophie Musculaire de Becker

La Dystrophie Musculaire de Becker (BMD) décrite en 1955 est une forme allélique plus modérée de la DMD se caractérisant pas la présence d'une protéine dystrophine plus courte et partiellement fonctionnelle dans les fibres musculaires (l'aspect moléculaire sera détaillé dans le *Chapitre 1, G-2*). La BMD, beaucoup plus rare que la DMD, affecte environ 1 garçon sur 20 000 naissances même s'il est difficile d'évaluer précisément l'incidence en absence de diagnostic des formes les plus bénignes (Mostacciolo 1987, Emery 1991). La distribution de l'atteinte musculaire est similaire à celle des patients DMD, les muscles proximaux des membres inférieurs étant touchés en priorité (Emery 2002), mais de façon beaucoup moins sévère.

Sur le plan clinique, les patients BMD présentent une très grande variabilité. Certains patients présentent des symptômes similaires, même si l'évolution est moins rapide, que les patients DMD (faiblesses musculaires dès l'enfance et perte de la locomotion avant 20 ans). D'autres patients ont, au contraire, une vie quasiment normale, sans symptômes ou des symptômes

légers tels qu'un élargissement des mollets, des crampes dues à l'exercice, des myalgies et une myoglobinurie (Bushby 1993). Par contre, la cardiomyopathie est un phénomène plus récurrent et préoccupant puisque 90% des patients BMD développent des problèmes cardiaques (Finsterer 2007).

E- Le gène DMD

Depuis les premières descriptions de la maladie au XIX^{ème} siècle, il apparaissait évident que la DMD n'affectait que les garçons et était héritée de la mère.

Dans les années 1980, de nombreuses équipes se sont lancées dans la localisation précise du gène responsable sur le chromosome X. Les premières études se sont penchées sur des cas de jeunes filles atteintes de DMD et ayant toutes des anomalies de leur caryotype: des translocations X;autosome impliquant divers sites autosomiques mais avec toujours un point de cassure dans le bras court du chromosome X (Lindenbaum 1979, Jacobs 1981, Ray 1985). Par ces études, le locus DMD a été localisé de façon certaine sur le bras court du chromosome X.

Parallèlement, d'autres équipes ont affiné cette localisation par des études de liaisons génétiques en utilisant des sondes ADN pour suivre la co-ségrégation de la maladie et de marqueurs RFLPs (DNA restriction fragment length polymorphisms). En 1983, Davies et son équipe positionnent le locus DMD entre Xp110 et Xp223 (Davies 1983). Ces études ont notamment été confirmées par le cas d'un patient atteint de diverses maladies liées à l'X (granulomatose chronique, DMD et rétinite pigmentaire) et présentant une micro-délétion en Xp21 (Francke 1985, Kunkel 1985). Le développement de nombreuses sondes ADN (pour un suivi des RFLP et pour des analyses de southern blot) de plus en plus précises ont ensuite permis une meilleure compréhension et localisation du locus DMD ainsi que la possibilité de diagnostics prénataux pour la DMD (Monaco 1985, Ray 1985).

C'est également à cette période que le locus du gène muté dans la BMD a été localisé, lui aussi dans la région Xp21 et donc lié au locus DMD, suggérant le caractère allélique de ces deux dystrophies musculaires (Kingston 1983, Kingston 1984).

En recherchant des régions transcrites à partir du locus DXS164, une partie de l'ADN complémentaire (ADNc) du gène muté dans la DMD a été isolée (Monaco 1986). Puis l'année suivante, le clonage complet de l'ADNc de 11kb ainsi qu'un début de caractérisation de sa séquence (identification des exons) a été réalisé (Koenig 1987).

Le gène *DMD*, aujourd'hui parfaitement caractérisé, est donc situé sur le chromosome X en position Xp21.2 et sa séquence, majoritairement constituée d'introns (99.4%) s'étend sur environ 2.5 Mb. Le gène *DMD* est encore aujourd'hui le plus grand gène humain jamais identifié (environ 0.1% du génome humain). La transcription et l'épissage concomitant de l'ARN pré-messager de la DMD durent 16 heures (Tennyson 1995) et aboutissent à un transcrit mature de 14kb composé de 79 exons et codant la protéine dystrophine, exprimée majoritairement dans le muscle (voir *Chapitre 1, F-1*). La région codante du transcrit *DMD* est parcourue par plusieurs promoteurs régulés de façon indépendante et aboutissant à la synthèse de différentes isoformes de la dystrophine. Trois promoteurs (promoteurs B/brain, M/muscle et P/purkinje) localisés dans la région 5' conduisent à la transcription tissu-spécifique d'ARN messagers complets. Ces promoteurs ont chacun un premier exon spécifique mais partagent les mêmes autres 78 exons. Quatre autres promoteurs internes sont à l'origine de transcrits plus courts dont les premiers exons sont localisés respectivement au niveau des exons 30, 45, 56 et 63 figure 4) (Blake 2002).

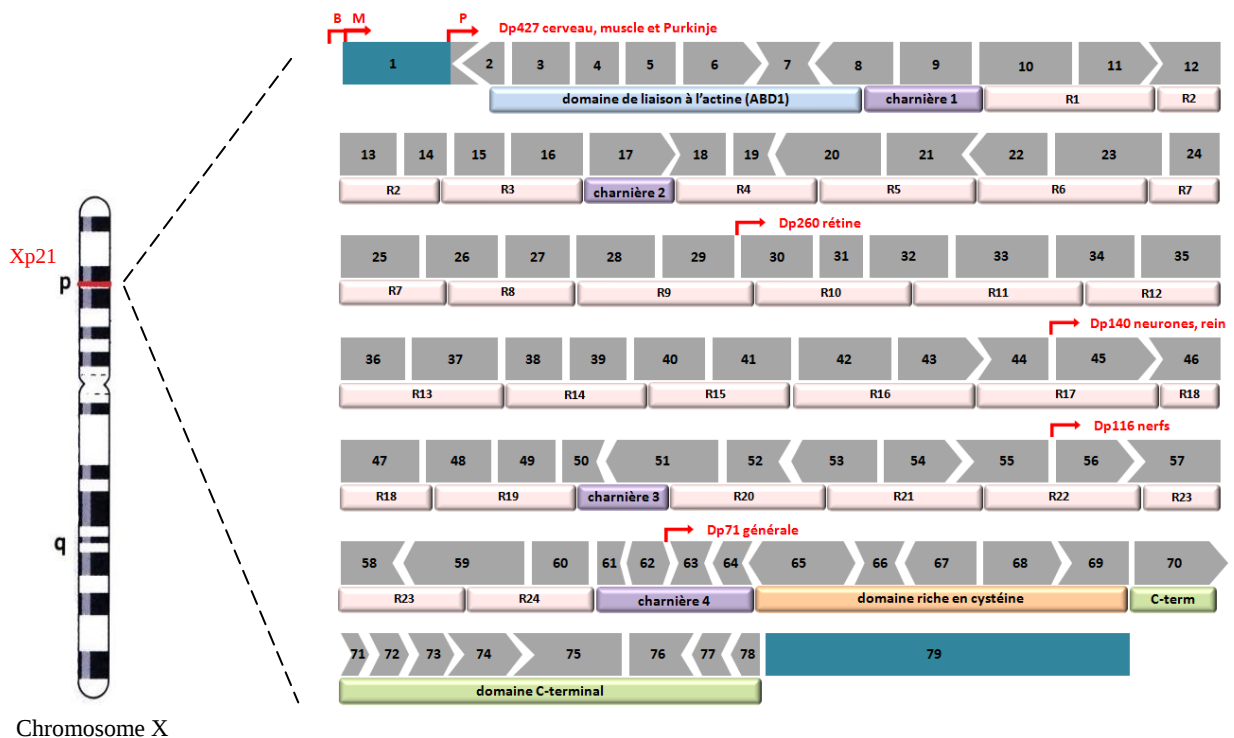


Figure 4: Représentation schématique du chromosome X humain et de la localisation du gène *DMD* en Xp21 (partie gauche). La partie droite de la figure représente les 79 exons du gène *DMD* ainsi que leur enchainement par rapport au cadre de lecture. La position des différents promoteurs est indiquée par des flèches rouges : les promoteurs B/brain, M/muscle et P/purkinje conduisent à la production d'une protéine complète de 427 kilo daltons (kDa) alors que les quatre promoteurs internes conduisent à la production de protéines plus courtes de

260, 140, 116 et 71 kDa respectivement. Les différentes régions de la protéine dystrophine sont représentées par des rectangles de couleurs sous les exons qui les codent : la région N-terminale et son domaine de liaison à l'actine (ABD1) en bleu, les 24 domaines répétés (R : répétition) en rose, les 4 régions charnières en violet, le domaine riche en cystéine en orange et le domaine C-terminal en vert.

F- La protéine dystrophine et ses différentes isoformes

1) La dystrophine

Le produit du gène *DMD*, la dystrophine, fut identifié en 1987 comme une protéine d'environ 400 kDa exprimée dans les muscles squelettiques, à un plus faible niveau dans les muscles lisses (estomac) chez la souris et l'Homme et également dans le cerveau chez la souris (Hoffman 1987).

La dystrophine est une protéine hydrophile du cytosquelette rattachée à la membrane et possède un poids moléculaire de 427 kDa (pour les isoformes les plus grands) équivalent à 3685 acides aminés (aa). Sa structure est très proche de celle de la β -spectrine et de l' α -actinine (appartenant à une famille de protéines du cytosquelette) et se compose de 4 domaines (Koenig 1988) :

- Un domaine N-terminal de liaison à l'actine

L'extrémité NH₂ de 240 aa est comparable à la région N-terminale de l' α -actinine et contient deux sous-domaines capables de se fixer à la F-actine du cytosquelette (ABD1 : actin-binding domain 1) (Blake 2002, Ervasti 2007, Muntoni 2003).

- Un domaine central « en bâtonnet » (ou rod domain)

Ce domaine est le plus long de la protéine (environ 2700 aa) et lui confère sa forme allongée dite en bâtonnet. Il est formé de 24 répétitions en tandem en hélices α , très similaires aux répétitions en triples hélices de la β -spectrine. On parle ainsi de domaines « spectrine-like » (Blake 2002, Ervasti 2007, Muntoni 2003). Ces répétitions, dont la fonction n'est pas interchangeable (Le Rumeur 2010), sont entrecoupées de 4 régions charnières riches en résidus proline qui confèrent à la dystrophine sa flexibilité (Koenig 1990). Un second domaine de liaison à l'actine (ABD2) est présent au niveau des répétitions 11 à 17 et les répétitions 16 et 17 sont quant à elles indispensables à la liaison de nNOS (oxyste nitrique synthétase neuronale) sur la dystrophine (Lai 2009, Le Rumeur 2010).

- Un domaine riche en cystéines

Ce domaine de 280 aa, relativement riche en résidus cystéine, possède des sites de liaison au Ca^{2+} intracellulaire ainsi que des motifs appelés WW et ZZ. Le domaine WW, connu pour se lier à des substrats riches en proline (4^{ème} charnière du domaine central), permet une liaison de la dystrophine aux β -dystroglycanes et le domaine ZZ est responsable des interactions avec des cations de métaux divalents, tels le Zn^{2+} , et la liaison à la calmoduline (Blake 2002, Ervasti 2007, Muntoni 2003).

- Un domaine C-terminal

L'extrémité COOH de la dystrophine (420 aa) lui est très spécifique puisqu'elle ne ressemble pas aux domaines C-terminaux des autres protéines de la famille β -spectrine / α actinine. Ce domaine est composé de motifs en hélices α formant le domaine de liaison à la dystrobrevine. Le domaine C-terminal est aussi impliqué dans l'interaction avec les syntrophines, des protéines du cytoplasme sous-sarcolemmiques (Blake 2002, Ervasti 2007, Muntoni 2003).

2) Les différentes isoformes de la dystrophine

Comme évoqué précédemment, au moins sept promoteurs sont répartis le long du gène *DMD* et sont à l'origine des différentes isoformes de la protéine. Bien que la dystrophine ait initialement été identifiée dans le muscle squelettique, ces isoformes sont exprimées de façon spécifique dans divers tissus (Chelly 1988).

Trois isoformes complètes, nommées Dp427 (dystrophin product, 427 kDa) sont produites à partir des promoteurs en 5' du gène et possèdent les 4 domaines de la structure protéique décrite précédemment. Le nom de ces isoformes reflète les tissus majeurs dans lesquels elles sont retrouvées. L'isoforme Dp427m (musculaire) est exprimée de façon importante dans les muscles squelettiques, le muscle cardiaque et les muscles lisses (Muntoni 1995), ainsi que dans une moindre mesure dans les cellules gliales du cerveau (Barnea 1990). L'isoforme Dp427c (cortical) est exprimée à partir du promoteur B (>90kb en amont du promoteur M, musculaire) dans les neurones corticaux et dans des régions CA (Cornes d'Ammon) de l'hippocampe (Nudel 1989, Gorecki 1992, Boyce 1991). L'isoforme Dp427p (Purkinje) quant à elle, est retrouvée dans les cellules de Purkinje cérébelleuses et de l'hippocampe ainsi que dans le cerveau cortical (Gorecki 1992) et à un plus faible niveau dans le muscle squelettique (Holder 1996).

A partir des quatre autres promoteurs internes, des isoformes plus courtes, tronquées en N-terminal sont produites à des tailles de 260 kDa, 140 kDa, 116 kDa et 71 kDa respectivement. Là encore, chaque isoforme possède un premier exon unique (voir figure 4) et est exprimée de façon tissu-spécifique.

L'isoforme Dp260 est retrouvée en grande quantité dans les cellules de la rétine, ainsi que dans le cerveau et le cœur. Cette isoforme contient la plupart des répétitions du domaine central ainsi que la région C-terminale de la dystrophine (figure 5). Elle est indispensable à une fonction normale de la rétine (Pillers 1993 et D'Souza 1995).

L'isoforme Dp140 est exprimée dans le cerveau (parties gliales), la rétine et les reins et ne contient que la partie distale des répétitions en bâtonnet et la région C-terminale (figure 5) (Lidov 1995).

L'isoforme Dp116 est exprimée uniquement dans les nerfs périphériques et les cellules de Schwann et n'est quasiment constituée que de la région C-terminale de la protéine (figure 5) (Byers 1993). Comme toutes les isoformes du cerveau décrites précédemment (Dp427c, Dp427p et Dp140), Dp116, pourrait être impliquée dans les désordres cognitifs et les retards mentaux observés chez certains enfants atteints de DMD. Même si les corrélations génotype-phénotype ne sont pas toujours claires, il apparaît que des réarrangements dans la seconde partie du gène s'associent plus préférentiellement à des troubles cognitifs que des mutations dans la partie proximale. Notamment, des mutations au niveau du promoteur de Dp140 ont été associées à des retards mentaux chez des enfants DMD et BMD (Bardoni 2000).

Enfin, l'isoforme Dp71, dite « générale », est retrouvée dans un large panel de tissus non musculaires tels le cerveau (neurones, cellules gliales : elle y est l'isoforme la plus abondante), le rein, la rétine, le foie, le poumon, la peau et les testicules notamment. Elle est aussi retrouvée en grande quantité dans les tissus fœtaux. Par contre, la Dp71 n'est pas retrouvée dans le muscle squelettique (Hugnot 1992). Au niveau structural, la Dp71 contient exclusivement le domaine riche en cystéine et l'extrémité C-terminale (figure 5). Elle conserve donc ses sites de liaisons aux dystroglycanes et à la dystrobrevine. La fonction de la Dp71 est longtemps restée inconnue, probablement car elle est très différente de celle de la dystrophine Dp427 musculaire. Pourtant, de par sa large distribution tissulaire, la plus petite des isoformes de la dystrophine joue un rôle primordial dans de nombreux processus cellulaires (homéostasie de l'eau et des ions, adhésion cellulaire, architecture nucléaire, etc).

Elle est également impliquée dans les désordres non musculaires liés à la DMD : les troubles cognitifs et les dysfonctions rétiniennes (Tadayoni 2012, Hendriksen 2015).

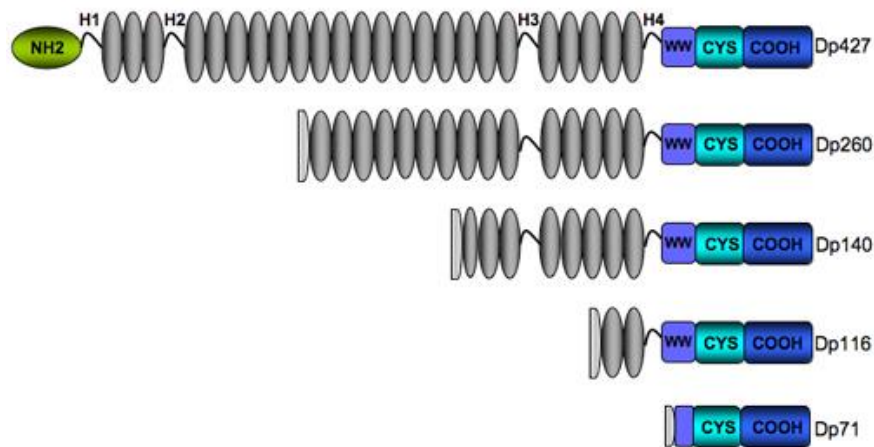


Figure 5 : Représentations schématiques de la structure des différents variants de la protéine dystrophine : l'isoforme complète et majoritaire dans le muscle (Dp427) ainsi que ses isoformes plus courtes (Dp260, Dp140, Dp116 et Dp71) (tirée de www.umd.be).

Des événements d'épissages alternatifs dans la partie 3' du gène *DMD* peuvent générer un nombre encore plus grand d'isoformes de la DMD, différentes les unes des autres au niveau de leur extrémité C-terminale (Feener 1989) et régulées de façon tissu-spécifique ou en fonction du stade développemental. De nombreux variants d'épissage ont notamment été décrits pour l'isoforme Dp71 (Tadayoni 2012). De plus, même si elles sont majoritairement tissu-spécifiques, certaines isoformes sont exprimées dans de nombreux types cellulaires ou tissulaires (au moins au niveau ARN), ce qui témoigne de la grande complexité de la régulation de l'expression du gène *DMD* (Tokarz 1998).

3) Le complexe DAPC et le rôle de la dystrophine dans le muscle

Rapidement après son identification, la protéine dystrophine a été localisée à la surface cytoplasmique du sarcolemme, suggérant un rôle de maintien de l'intégrité et de la structure des fibres musculaires (Bonilla 1988, Watkins 1988). Pourtant la dystrophine n'est pas directement reliée au sarcolemme. Elle y est ancrée par l'intermédiaire d'un complexe glycoprotéique, le DAPC (*dystrophin associated protein complex*) pouvant être subdivisé en plusieurs groupes de protéines (Yoshida et Ozawa 1990, Yoshida 1994) : un ensemble de protéines transmembranaires comprenant les dystroglycanes, sarcoglycanes et la sarcospane ;

ainsi que des protéines cytoplasmiques : les syntrophines, la dystrobrevine et bien sûr la dystrophine (figure 6).

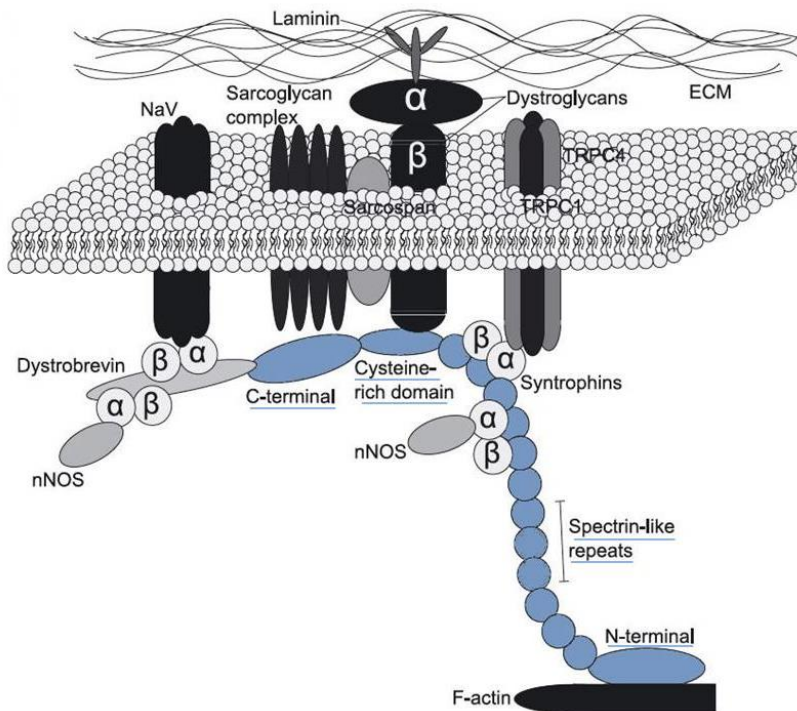


Figure 6: Schéma des principaux composants du complexe protéique associé à la dystrophine (DAPC). La dystrophine (en bleu) sert de lien entre la matrice extracellulaire (via les complexes de sarcoglycanes et de dystroglycanes) et l'actine intracellulaire. Les différents domaines de la dystrophine (domaine N-terminal, domaine central avec répétitions spectrine-like, domaine riche en cystéine et domaine C-terminal) et leur lien avec les différents composants du DPAC sont représentés (tirée de Mosqueira 2013).

Le complexe de dystroglycanes est composé de deux sous unités α et β produites à partir d'un même transcrit puis clivées en deux protéines distinctes. La sous unité α est une protéine extracellulaire très glycosylée reliée à des composants de la matrice extracellulaire tels que les laminines, l'agrine ou le perlecan. La sous-unité β , quant à elle est une protéine transmembranaire et, via ses résidus prolines, est reliée à la dystrophine au niveau du domaine riche en cystéine (Constantin 2014, Ervasti 2007). La dystrophine, reliée en N-terminal à l'actine et en C-terminal à l' α -dystroglycane (via le β -dystroglycane), fait donc le lien entre la matrice extracellulaire et les filaments cytoplasmiques d'actine.

Les différentes sous-unités de sarcoglycanes qui composent le DAPC (α -, β -, δ -, et γ -sarcoglycanes) sont des protéines transmembranaires qui s'assemblent en un complexe tétramérique. Leurs fonctions est de renforcer le lien entre les α - et β -dystroglycanes et la dystrophine. Des mutations sur l'un des gènes de sarcoglycanes sont à l'origine des différentes formes de dystrophies musculaires des ceintures chez l'homme (Constantin 2014).

Du côté cytoplasmique, les α - and β -syntrophines fonctionnent comme des adaptateurs moléculaires médiant l'ancrage de canaux ioniques et de molécules de signalisation au DAPC, notamment nNOS (Brenman 1995, Adams 2001, Constantin 2014).

Dans le muscle, grâce à la cohésion et à la stabilité des différents constituants du DAPC, la dystrophine joue un rôle structural de maintien des fibres musculaires en stabilisant le sarcolemme durant les cycles de contractions / relaxations du muscle (Petrof 1993).

Le DAPC a également d'autres rôles notamment le maintien du fonctionnement d'autres protéines dont la fonction est dépendante de leur association au DAPC, ou encore la régulation de processus cellulaires importants (homéostasie du Ca^{2+} et fonctions mitochondriales notamment) et de cascades de signalisations intracellulaires (Mosqueira 2013).

L'absence de dystrophine dérégule totalement le DAPC : les autres membres du complexe sont réduits en nombre et leur localisation au niveau du sarcolemme est perturbée. La désorganisation du DAPC fait disparaître le maintien mécanique des fibres musculaires : les fibres sont fragilisées à chaque nouvelle contraction musculaire, ce qui entraîne des microlésions du sarcolemme et une désorganisation de la structure des costamères (Rybakova 2000). La dislocation du sarcolemme est associée à des flux d'ions et de protéines du et vers le cytosol, et notamment l'entrée de Ca^{2+} dans le cytosol.

L'augmentation massive du calcium intracellulaire, observée chez les patients DMD et chez la souris *mdx*, est en effet un événement majeur influençant la pathologie moléculaire dans la DMD. Pourtant l'origine de cette entrée de Ca^{2+} dans les fibres dystrophiques reste inconnue et sujet à débat. Certaines études suggèrent que le calcium extracellulaire entre simplement dans le cytosol via les microlésions du sarcolemme. D'autres suggèrent que, même si les microlésions participent à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire, d'autres mécanismes entrent en jeu, notamment les canaux ioniques activés par la déformation mécanique des fibres dystrophiques (SAC, stretch-activated channels) (Wallace 2009, van Westering 2015). De nombreuses voies de signalisation Ca^{2+} -dépendantes sont alors activées, et notamment le mécanisme de mort cellulaire via les calpaines, des protéinases Ca^{2+} -dépendantes qui dégradent les protéines de la membrane cellulaire, entraînant la nécrose progressive des fibres musculaires. L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire peut également entraîner l'apparition de dysfonctions des mitochondries, ce qui conduit également à la mort des fibres dystrophiques (Turner 1993, Wallace 2009, Mosqueira 2013).

On notera également qu'une des conséquences des lésions du sarcolemme est la libération dans le sérum d'enzymes musculaires telles la CK permettant un diagnostic de la maladie.

Un autre mécanisme contribue à la dégénération musculaire chez les patients DMD par dommages oxydatifs dus à la présence de radicaux libres dans le muscle. L'absence de dystrophine entraîne en effet la délocalisation de la nNOS (reliée aux syntrophines du DAPC) de la membrane plasmique au cytoplasme (Brenman 1995) et réduit ainsi son activité. nNOS produit généralement de l'oxyde nitrique (NO) qui réagit avec des radicaux libres et régule différentes fonctions métaboliques, vasculaires et immunes (Mosqueira 2013). La production de NO étant diminuée, des dommages liés aux radicaux libres peuvent être observés dans les muscles dystrophiques (Wallace 2009) y compris une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire due à une hypernitrosylation du récepteur à la ryanodine, RyR.

G- Les mutations sur le gène DMD

1) Les différentes mutations

De part sa très grande taille (2.5Mb) le gène *DMD* a un taux de mutations (1.10^{-4}) bien supérieur au taux de mutations moyen dans les gènes humains (entre 1.10^{-5} et 1.10^{-6}) et environ un tiers sont des mutations *de novo* (Aartsma Rus 2006). Depuis la découverte du gène en 1986, des milliers d'anomalies intragéniques ont été décrites sur le gène *DMD*.

La vaste majorité des mutations sont des larges délétions (environ 65%) ou duplications (environ 15%) d'un exon ou plus ; alors que seulement 20-30% des anomalies correspondent à des mutations ponctuelles ou à des petits réarrangements (figure 7A).

On note la distribution non aléatoire des grandes délétions sur le gène avec la mise en évidence de deux régions privilégiées (ou « hotspot »): une région proximale (région I) des exons 2 à 20 touchée dans 15% des cas et une région distale (région II) des exons 45 à 55 touchée dans 74% des cas. L'exon 45 est le plus communément délété de tous les exons chez les patients DMD (Blake 2002, Muntoni 2003, Tuffery-Giraud 2009).

Bien qu'elles aussi très hétérogènes, les duplications sont plutôt localisées dans la région « hotspot » I et la duplication de l'exon 2 est la plus fréquente (9.8% des duplications) (White 2006, Tuffery-Giraud 2009). Certains réarrangements plus complexes sont dus à des événements

de délétions ou duplications non contigus sur le gène et même à des cas de triplifications (White 2006).

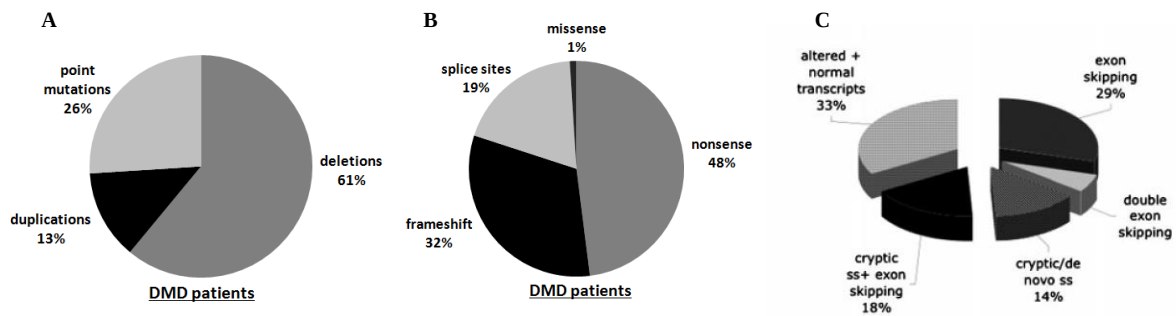


Figure 7 : Les mutations sur le gène *DMD*. A : Distribution des larges réarrangements génomiques et mutations ponctuelles chez les patients DMD ; B : Fréquence des différents types de petits réarrangements et mutations ponctuelles chez les patients DMD ; C : Impact des mutations des sites d'épissage sur l'épissage des transcrits analysés dans les muscles de patients DMD et BMD : la détection de très faibles quantités de transcrits normaux est observée exclusivement chez les patients BMD (tirée de Tuffery-Giraud 2009).

Le gène *DMD* montre également une importante quantité de mutations ponctuelles (mutations non sens, faux sens, mutations décalant le cadre de lecture et mutations des sites d'épissage) largement réparties sur le gène (figure 7B). Chez les patients DMD, la plupart de ces mutations correspondent à des mutations non sens conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré sur l'ARN messager (ARNm) et à l'absence de protéine. Les mutations induisant un décalage du cadre de lecture représentent un tiers des mutations ponctuelles et sont provoquées par des délétions, insertions ou duplications de quelques nucléotides. Les mutations d'épissages touchent les sites d'épissage et causent le saut d'un seul exon ou des profils d'épissages encore plus complexes (figure 7C) avec l'apparition de sites cryptiques d'épissage (Tuffery-Giraud 2009). Chez la plupart des patients possédant de telles mutations, très peu ou aucune protéine dystrophine n'est détectée dans les muscles, indiquant une instabilité de l'ARNm ou de la protéine tronquée.

2) *Corrélation génotype/phénotype: "la règle de Monaco"*

Il apparaît que la taille ou la position des mutations ne corrélient pas toujours avec le phénotype clinique des patients. L'hypothèse mise en avant par Anthony Monaco et son équipe en 1988 (depuis appelée la « règle de Monaco ») explique en partie ces observations (Monaco 1988).

Leur modèle se base sur le cadre de lecture des triplets de codons pour la traduction en acides aminés des protéines. Lorsque la mutation implique un point de cassure qui décale le cadre de lecture, cela résulte en une protéine tronquée, anormale qui est rapidement dégradée entraînant ainsi l'apparition de symptômes importants de la DMD. Par contre, lorsque le point de cassure de la mutation préserve le cadre ouvert de lecture des codons, la protéine traduite est plus courte mais semi-fonctionnelle. Le phénotype clinique est alors moins sévère et correspond à un phénotype de la dystrophie musculaire de Becker (BMD). Cette théorie (schématisée en figure 8A) corrèle avec les observations faites dans des muscles de patients BMD où la dystrophine est retrouvée au sarcolemme bien qu'à un poids moléculaire plus petit et/ou une plus faible abondance (Hoffman 1988, figure 8B).

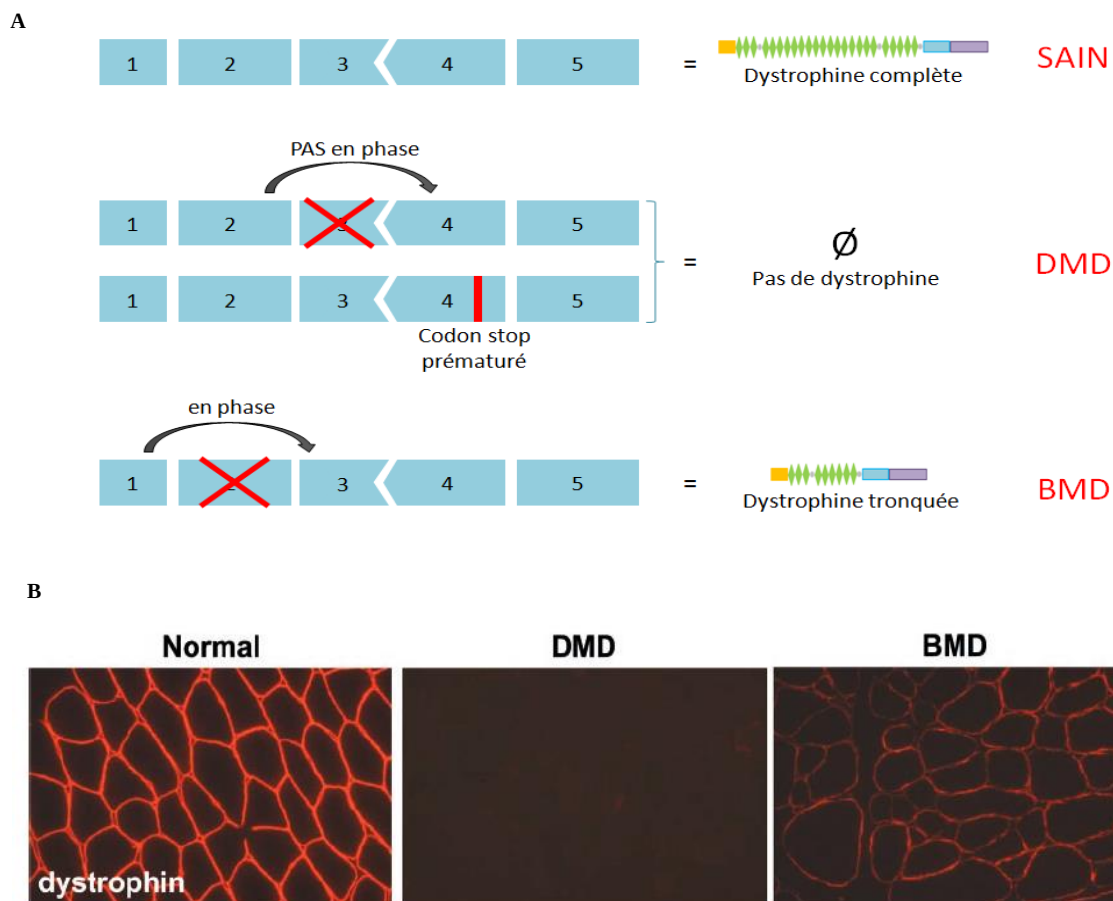


Figure 8 : A: Représentation schématique de la « règle de Monaco ». Le phénotype DMD peut survenir par exemple lors de l'apparition d'un codon stop prématuré (mutation non sens) ou lors d'une large délétion d'un exon entier du gène entraînant un décalage du cadre de lecture. Pour une large délétion préservant le cadre de lecture, le phénotype sera moins sévère, de type BMD grâce à la production d'une protéine dystrophine plus courte mais fonctionnelle. B: Immunohistochimie anti-dystrophine dans des muscles d'un patient sain (à gauche), atteint de dystrophie musculaire de Duchenne, DMD (au milieu), et atteint de dystrophie musculaire de Becker, BMD (à droite) (tirée de Blake 2002).

Bien que la théorie de Monaco corrèle avec plus de 90% des cas de patients DMD/BMD, il existe quelques exceptions à cette règle du cadre de lecture :

- Mutations en phase chez des patients DMD :

Des délétions ou duplications n'altérant pas le cadre de lecture sont décrites chez 7% des patients présentant les symptômes de la DMD. Dans ces cas, il est possible que la mutation soit trop large pour produire une protéine fonctionnelle ou qu'elle touche des domaines indispensables à la fonction de la dystrophine.

Ceci est particulièrement vrai dans le cas de très larges délétions (en phase) s'étalant de la partie 5' de la protéine jusqu'au milieu des domaines répétés, supprimant ainsi les 2 sites de liaison à l'actine (Nevo 2003, Muntoni 2003). En contraste lorsqu'une très large délétion affecte presque 50% (Δ exons 17-48) du gène mais que seuls les domaines répétés sont supprimés de la protéine finale, le phénotype est généralement BMD (England 1990).

Ceci met en exergue le caractère indispensable de certains domaines de la dystrophine que sont les extrémités N-terminale (et son domaine de liaison à l'actine ABD1) et C-terminale (domaine riche en cystéines indispensable à la liaison avec la matrice extracellulaire). D'autres domaines, dits dispensables, conduisent à un phénotype léger lorsqu'ils sont tronqués. Cela concerne une partie au moins des répétitions du domaine central. Ces observations ont conduit au développement des approches de saut d'exon et de mini-gènes pour le traitement de la DMD par thérapie génique (voir *Chapitre 2, D-1* et *Chapitre 3*).

Il est également possible que des duplications ou délétions soient en phase au niveau de l'ADN mais que le cadre de lecture soit perturbé au niveau ARNm par des événements d'épissages alternatifs conduisant à une absence de protéine et un phénotype DMD (Aartsma Rus 2006). Dans ce cas, la règle de Monaco est respectée mais au niveau ARN seulement.

- Mutations décalant le cadre de lecture chez des patients BMD :

Bien que plus rares, des mutations décalant le cadre de lecture au niveau ADN existent chez des patients BMD (2% des patients), telles que des délétions des exons 3-6, 5-7, 47-52 ou encore 49-50 (se référer à la figure 4). Là encore, les perturbations de l'épissage alternatif entrent alors en jeu et le cadre de lecture est finalement restauré au niveau ARNm par des événements de saut d'exon(s) (Muntoni 2003).

L'exemple fréquent des patients BMD avec une délétion des exons 3 à 7 (Malhotra 1988) est également en contradiction avec la règle du cadre de lecture. En effet, une délétion des exons 3 à 7 devrait normalement conduire à un décalage du cadre de lecture et à une terminaison

prématurée de la traduction (se référer à la figure 4). Or chez certains patients, une protéine de taille quasi normale est produite et fonctionnelle. Pour ce cas, un autre mécanisme que le saut d'exon entre en jeu : le cadre de lecture est restauré par la présence d'un autre site d'initiation de la traduction localisé dans l'exon 8 (Muntoni 2003, Aartsma Rus 2006). Ce mécanisme de décalage de l'initiation de la traduction a aussi été mis en évidence chez des patients portant une mutation non sens dans l'exon 1 mais qui présentaient tout de même un phénotype BMD (Flanigan 2009). Un IRES (Internal ribosome entry site) localisé dans l'exon 5 est en effet responsable du décalage de l'initiation de la traduction de la dystrophine à partir de l'exon 6 (Wein 2015).

Le fait que les points de mutations, bien que localisés dans le même intron, soient légèrement différents d'un patient à l'autre pourrait expliquer pourquoi une partie des patients développent la DMD alors que pour d'autres, un épissage alternatif restaure le cadre de lecture (Aartsma Rus 2006). Il est effectivement bien connu aujourd'hui que certaines séquences introniques régulent l'épissage des exons adjacents.

Des évènements de saut d'exon spontanés sont également à l'origine de la restauration du cadre de lecture de l'ARNm *DMD* dans quelques fibres musculaires (Klein 1992, Lu 2000). Il n'est effectivement pas rare d'observer quelques fibres exprimant la dystrophine regroupées en petit cluster dans les muscles de patients ou des modèles animaux (Hoffman 1990, Burrow 1991). Ces fibres, appelées fibres révertantes, expriment une dystrophine fonctionnelle et correctement localisée au sarcolemme mais qui est généralement tronquée de quelques régions correspondantes aux exons adjacents à la mutation (Klein 1992). Elles représentent 1 à 10% des fibres musculaires, leur nombre varie en fonction du patient et/ou de la mutation mais elles n'ont a priori aucun rôle thérapeutique (Fanin 1995).

La complexité des mécanismes moléculaires à l'origine des phénotypes plus ou moins sévères chez les patients DMD/BMD rend la recherche de thérapies d'autant plus complexe. Pourtant, certains mécanismes mis en évidence chez ces cas particuliers de patients ont tout de même permis une meilleure compréhension du fonctionnement du gène et par conséquent l'élaboration de traitements de thérapie génique aujourd'hui testés en clinique (mini-gènes et saut d'exon, entre autres).

H-Les modèles animaux de la DMD

Durant ces dernières années, de nombreux modèles animaux pour la DMD ont été développés afin d'avoir une meilleure compréhension des mécanismes fondamentaux en jeu dans la maladie, mais aussi pour évaluer l'efficacité et l'innocuité d'agents thérapeutiques. Aujourd'hui une soixantaine de modèles, des invertébrés aux grands animaux, ont été décrits pour la DMD. Certains ont été générés en laboratoire alors que chez d'autres la maladie est survenue naturellement. La liste ci-dessous, loin d'être exhaustive, regroupe les principaux modèles animaux : les plus connus, les plus communément utilisés comme la souris *mdx* et le chien *GRMD* ou les plus récemment développés.

1) Les souris déficientes en dystrophine

Le premier modèle identifié est aujourd'hui encore le plus couramment utilisé. Il s'agit de la souris *mdx* (X-linked muscular dystrophy) qui a d'ailleurs été découverte de façon fortuite en dosant la CK dans le sérum de souris C57BL/10. Par la suite, l'absence de dystrophine dans les fibres musculaires et l'identification d'une mutation sur le gène *DMD* de ces souris ont confirmé que les symptômes mimait bien un phénotype DMD (Bulfield 1984). La mutation chez ces souris est une mutation ponctuelle non-sens (transition d'un C en T) dans l'exon 23 du gène *DMD*, à l'origine d'un codon stop prématuré. Malgré l'absence de dystrophine, les symptômes cliniques des souris *mdx* sont assez légers comparés aux patients DMD et leur durée de vie n'est que très peu diminuée. Les premiers signes d'une anomalie musculaire surviennent à l'âge de 3 à 6 semaines par l'apparition de fibres nécrotiques et en régénération (fibres aux noyaux centraux et quelques infiltrations de macrophages), ainsi qu'une hypertrophie des muscles et une élévation du taux de CK sérique. Il faut attendre que les souris atteignent l'âge de 15 mois pour voir apparaître des symptômes plus graves tels la perte de la masse musculaire, une scoliose ou une insuffisance cardiaque. Le diaphragme est par contre plus sévèrement atteint que le reste des muscles et montre une dégénération progressive dès la naissance (Nakamura 2011, McGreevy 2015).

Dans l'optique de trouver des modèles avec un phénotype plus sévère, des variants (cv, chemical variants) de la souche *mdx* ont été créés en utilisant le mutagène ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) : *mdx*^{2cv}, *mdx*^{3cv}, *mdx*^{4cv} et *mdx*^{5cv} (Chapman 1989). Des croisements ont également été faits entre des souris *mdx* et d'autres souches (CH3, BALB/c et C57BL/6

notamment). Chaque nouveau modèle possède sa petite particularité phénotypique : phénotype musculaire plus sévère pour les *mdx*^{5cv}, moins de fibres révertantes pour les *mdx*^{4cv}, plus de fibrose et moins de régénération pour les *DBA/2-mdx*, troubles neurologiques pour les *albino-mdx* (McGreevy 2015). D'autres souches ont été créées afin de répondre à une question particulière, ou portant une mutation très spécifique. Par exemple, la souris *Dup2* qui présente une duplication de l'exon 2 ou la *mdx52* qui est un modèle pour les thérapies ciblant le saut de l'exon 51 (Nakamura 2011).

Aujourd'hui, les modèles murins qui paraissent les plus pertinents et avec les phénotypes musculaires les plus sévères sont les modèles double knock-out (dKO). Dans ces souris, un gène responsable d'un mécanisme compensatoire a été inhibé en plus de la dystrophine. On citera par exemple, les *dKO* utrophine/dystrophine, les intégrine/dystrophine ou les *myoD*/dystrophine (McGreevy 2015).

2) Les nouveaux modèles de rat dystrophiques

D'autres modèles de rongeurs ont été créés assez récemment et, en tant que petit modèle animal, présentent les mêmes avantages que la souris (génome facilement manipulable, facilité d'entretien et animaux rapides à reproduire). Ils ont été créés par édition du génome en rompant le gène *DMD* à l'aide des outils CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat and CRISPR associated 9) ou TALEN (transcription activator-like effector nuclease) conduisant à l'absence de dystrophine dans leurs fibres musculaires. Leur phénotype musculaire est plus sévère et plus continu dans le temps que celui de la souris *mdx* (dégénérescence musculaire, fibrose sévère, infiltration adipeuse) et certains présentent surtout un phénotype cardiaque prononcé (Nakamura 2014, Larcher 2014).

3) Les modèles canins de DMD

Bien que simples à manipuler, les modèles de rongeurs ne permettent pas de répondre à toutes les interrogations dans le développement de thérapies pour la DMD (mode et dose d'administration et étude des réponses immunitaires notamment) d'où l'importance des modèles gros animaux tels que les modèles canins aujourd'hui disponibles.

Le premier identifié et le plus utilisé des modèles canins est le chien *GRMD* (Golden retriever muscular dystrophy) caractérisé en 1988 (Kornegay 1988, Cooper 1988) et portant une

mutation ponctuelle dans le site accepteur d'épissage de l'intron 6. L'exon 7 est généralement sauté, décalant ainsi le cadre de lecture de l'ARNm et annihilant la production de dystrophine (Sharp 1992).

Ses caractéristiques cliniques, histologiques et son évolution de la pathologie, très similaires à celles d'un patient DMD, en font un modèle idéal pour le développement clinique de thérapies (Kornegay 2012). Une faiblesse musculaire, une fatigabilité lors d'exercices et une démarche anormale et caractéristique (Barthélémy 2009) (déplacement caractéristique des membres postérieurs en saut de lapin ou « bunny hopping ») apparaissent dès l'âge de 2-3 mois. Puis, entre 3 et 6 mois, surviennent des symptômes musculaires plus importants : une atrophie musculaire, des contractures articulaires, une hypersalivation et des dysphagies suggérant une atteinte des muscles pharyngaux et œsophagiens ainsi que, selon les animaux, les premiers signes d'atteinte cardiaque (McGreevy 2015, Kornegay 2012). Comme pour les patients DMD, la sévérité du phénotype des chiens *GRMD* est très variable d'un individu à l'autre, notamment au niveau de l'atteinte cardiaque, mais l'espérance de vie moyenne de ces chiens est très largement diminuée (réduction d'environ 75% de la normale). Au niveau histologique, il existe également de grandes similarités avec ce qui est observé chez l'homme, notamment une fibrose très prononcée dans les muscles des membres et des marqueurs de régénération présents mais moins abondants que chez la souris *mdx* (cohérent avec le phénotype sévère des chiens et léger des souris) (McGreevy 2015).

Les chiens *CXMD_J* (Canine X-linked muscular dystrophy in Japan) correspondent à une autre souche de chiens modèle de la DMD obtenus par croisement d'un chien *GRMD* et d'une chienne Beagle afin de palier les difficultés d'élevage, de maintenance et de coût des chiens *GRMD* (Shimatsu 2003). Ces chiens présentent globalement les mêmes caractéristiques phénotypiques que les chiens *GRMD* et de nombreuses études ont démontré leur utilité en tant que modèle de la DMD (Nakamura 2011).

4) Les autres modèles animaux de la DMD

Bien d'autres modèles animaux de la DMD ont été identifiés, créés ou développés. Mais mis à part ceux que nous venons d'évoquer, assez peu sont couramment utilisés dans les essais thérapeutiques. Il existe notamment un modèle félin de la DMD (*HFMD*, hypertrophy feline muscular dystrophy) (Nakamura 2011), des modèles de cochons (Klymiuk 2013) et tout récemment un modèle de primates non-humains a été développé (Chen Y. 2015). Des modèles

animaux qui ne sont pas des mammifères existent également. Ainsi, des modèles DMD de zebrafish (*Danio rerio*) et de drosophile (*Drosophila melanogaster*) ont été créés. Ils sont notamment utilisés pour le screening de molécules et de drogues, mais également pour comprendre les mécanismes pathologiques des maladies musculaires humaines dont les gènes sont conservés chez ces petits animaux. Leurs génomes simples et entièrement séquencés en font de bons outils pour les approches moléculaires fondamentales (Planté 2015).

CHAPITRE 2 :

Les thérapies de la dystrophie musculaire de Duchenne

A- Soins généraux anti-symptomatiques

A l'heure actuelle, aucun traitement curatif et définitif de la DMD n'est encore disponible. Les seuls traitements proposés aux patients, en dehors des essais thérapeutiques, sont des traitements de soutien ou anti-symptomatiques pour soulager les douleurs, les inconforts (dispositifs d'assistance à la marche, prévention des scolioses, surveillance de la nutrition), pour tenter de ralentir la progression de la maladie, notamment l'âge de la perte de la marche et bien sûr prendre en charge les insuffisances respiratoires et cardiaques.

1) Les corticostéroïdes

L'utilisation des stéroïdes et notamment des corticostéroïdes (stéroïdes produits par le cortex surrénal), pour ralentir la progression de la DMD a fait l'objet de très nombreux essais cliniques depuis la première étude développée en 1974 sur un petit nombre de patients (Drachman 1974). En 1989, Jerry Mendell et son équipe développent un essai randomisé en double aveugle chez 103 patients DMD recevant 0.75 ou 1.5 mg/kg/jour de prednisone pendant 6 mois. Ils démontrent une amélioration significative de la force et de la fonction musculaire et une augmentation de la masse musculaire chez les garçons ayant reçu le traitement par rapport au groupe placebo (Mendell 1989).

Aujourd'hui, il est largement reconnu que le traitement quotidien par corticostéroïdes, plus particulièrement par glucocorticoïdes (principalement la prednisone ou le deflazacort), permet un recul de la perte de la marche, le maintien de la fonction et de la force musculaire au moins à court terme, une diminution de la progression des atteintes respiratoires et cardiaques et permet d'augmenter la survie et la qualité de vie des patients (Markham 2008, Merlini 2015, Pane 2015). Dans la plupart des pays développés, les corticostéroïdes sont aujourd'hui systématiquement administrés aux patients DMD ambulants dès le plus jeune âge à une dose de départ avoisinant les 0.75 mg/kg/ jour de prednisone (ou 0.9 mg/kg/jour en dose équivalente de deflazacort) (Manzur 2008).

Même après la perte de la marche, les corticostéroïdes peuvent être nécessaires au maintien de la fonction musculaire des membres supérieurs et peuvent aider à prévenir le développement de scolioses. Les doses sont par contre réadaptées au cours des années de traitement et en fonction de la tolérance du patient. En effet, un traitement aux corticostéroïdes de longue durée engendre de nombreux effets secondaires, souvent très lourds tels une diminution de la

croissance, une prise de poids, une intolérance au glucose, une apparence cushingoïde (visage rouge, lunaire, lié au syndrome de Cushing), le développement d'ostéoporose, et des troubles comportementaux (hyperactivité, irritabilité, euphorie) (Manzur 2008, Manzur et Muntoni 2009, Goemans 2014). A l'heure actuelle, d'autres stéroïdes présentant beaucoup moins d'effets secondaires mais avec les mêmes effets anti-inflammatoires et positifs sur la fonction musculaire sont testés dans différents modèles animaux (Blat 2015).

2) *L'assistance respiratoire*

Les premiers signes d'insuffisance respiratoire chez les patients DMD sont les troubles de la respiration pendant le sommeil (hypoventilations, hypoxies et apnées). Une trachéotomie (assistance respiratoire invasive) peut être pratiquée, mais les médecins privilégieront, tant que possible, la technique de ventilation non-invasive par pression positive (NIPPV), systématiquement proposée pour diminuer les symptômes respiratoires et prolonger la durée de vie (Simmonds 1998, Yasuma 2004, Eagle 2007). Le dispositif consiste en un ventilateur portable associé à un embout ou à un masque nasal, le tout très compact pour une utilisation facilitée à domicile, notamment pendant la journée lorsque les symptômes respiratoires deviennent plus importants dans les stades tardifs de la maladie (Toussaint 2006). Grâce aux techniques d'assistance respiratoires (trachéotomie et assistance non invasive) mises en place, la durée de vie des patients a considérablement augmenté et certains atteignent aujourd'hui leur quatrième décennie.

3) *Traitement de la cardiomyopathie*

Alors que le nombre de décès dus à une insuffisance respiratoire diminue, le nombre de patients DMD développant une cardiomyopathie létale ou une insuffisance cardiaque augmente en proportion (Goemans 2014). La prise en charge, le suivi et le traitement cardiaque des patients est par conséquent devenu un nouvel enjeu pour les traitements anti-symptomatiques.

Il a été montré que l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IEC) réduit les dysfonctionnements importants du ventricule gauche (dilatation et hypertrophie) et par conséquent la mortalité des patients (van Westering 2015). Les bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine, les β -bloquants ainsi que les diurétiques sont également utilisés (parfois en cocktail avec des IEC) mais leur intérêt thérapeutique est moins bien établi

pour le traitement de la cardiomyopathie des patients DMD (Blat 2015, van Westering 2015). D'autres traitements pouvant potentiellement améliorer la fonction cardiaque des patients DMD sont actuellement en cours d'évaluation pré-clinique ou clinique, mais doivent encore démontrer leur efficacité (van Westering 2015).

4) Prise en charge orthopédique

Afin d'améliorer la posture des patients DMD ambulants et donc de préserver la marche un peu plus longtemps, des dispositifs d'orthoses sont utilisés (orthoses genou - cheville - pied ou cheville - pied), de même que des séances de kinésithérapie et de physiothérapie pour prévenir les déformations articulaires, ou encore des chirurgies orthopédiques pour soulager les contractures (Goemans 2014). La plupart des patients non-ambulants développent des scoliozes sévères impactant sur la fonction respiratoire, la nutrition et le confort. Bien que les corticostéroïdes aient également un effet positif sur la prévention des déformations vertébrales, une chirurgie de fusion des vertèbres est souvent préconisée aux alentours de 14 ans (Manzu et Muntoni 2009).

5) Autres traitements pharmacologiques

En plus des corticostéroïdes, d'autres molécules pharmacologiques sont actuellement testées chez l'animal ou dans des essais thérapeutiques. On ne les listera pas de façon exhaustive ici, mais par exemple, certaines visent à diminuer la toxicité due aux dérégulations calciques, comme les inhibiteurs des canaux calciques de type L ou les composés *Rycal* stabilisateurs du RyR qui diminuent le taux de calcium dans les fibres musculaires et restaurent la fonction musculaire chez la souris *mdx* (Blat 2015). D'autres molécules ont des effets anti-fibrotiques via l'inhibition du TGF- β (Levi 2015).

L'Idebenone est une molécule anti-oxydante capable de stimuler la production d'énergie et les flux d'électrons par les mitochondries. Elle a été testée récemment dans un essai clinique de phase III chez des patients DMD et permet la diminution de la perte de fonction respiratoire chez ces patients (Buyse 2015). L'idebenone pourrait remplacer les glucocorticoïdes chez les patients qui n'y répondent plus ou qui ne tolèrent plus les effets secondaires associés.

Certains agents pharmacologiques permettent de moduler l'expression de l'utrophine, une protéine homologue de la dystrophine (voir *paragraphe D- 2) a-*). Au cours du

développement, l'utrophine est exprimée avant la dystrophine. Puis son expression est « éteinte » lors de la maturation des muscles chez l'adulte. Certaines stratégies visent à réactiver l'expression du gène en apportant des facteurs de transcription artificiels ou des agents pharmacologiques (Onori 2013, Strimpakos 2014, Guiraud 2015). Le plus prometteur étant le SMTC1100, un modulateur de l'expression d'utrophine, bien toléré chez des patients sains volontaires en phase Ia et actuellement testé chez des patients DMD en phase Ib (Tinsley 2015, van Westering 2015).

Le renforcement de la régénération musculaire et l'augmentation de la masse musculaire peuvent également être provoqués par des régulateurs de la différenciation ou de la croissance musculaire (l'IGF-1, insulin growth factor) ou les inhibiteurs de HDAC (histone desacétylases). La myostatine est une protéine de la famille du TGF- β qui régule négativement la croissance musculaire. Des inhibiteurs, et plus particulièrement des anticorps anti-myostatine ont montré leur efficacité à restaurer l'histopathologie, la force et la fonction des muscles chez la souris *mdx* (Bogdanovitch 2002).

B- La thérapie cellulaire

Le muscle squelettique adulte est principalement constitué de myofibres multinuclées, différenciées et post-mitotiques, ainsi que de cellules satellites quiescentes (cellules souches du muscle). En réponse à une lésion musculaire, les cellules satellites s'activent, prolifèrent et génèrent de nouveaux myoblastes qui fusionnent avec les fibres lésées pour réparer le muscle.

Rapidement après la découverte du gène et de la protéine dystrophine, des premiers essais de thérapie cellulaire ont vu le jour. Ils s'appuyaient sur l'hypothèse que les muscles des patients DMD pourraient être protégés de la dégénérescence par fusion avec des cellules saines. Ainsi, les premières transplantations de myoblastes sains ont été réalisées chez la souris *mdx* immunosupprimée via des injections intra-musculaires. Ces transplantations ont montré leur efficacité par la restauration de la dystrophine, suggérant une contribution des myoblastes transplantés à la réparation des fibres musculaires (Law 1988, Partridge 1989).

Pourtant, les essais cliniques qui ont suivis n'ont pas eu les résultats escomptés : très peu de dystrophine était restaurée et aucune amélioration fonctionnelle ou clinique n'était observée (Palmieri 2010). Les essais suivants ont mis en évidence les réactions de rejet des myoblastes transplantés suggérant des traitements immunosuppresseurs inadaptés. De plus, l'inefficacité

du transfert de myoblastes chez l'Homme peut également être expliquée par la diffusion très limitée des cellules après injection dans le muscle et la trop faible quantité de cellules transplantées. En effet, les myoblastes isolés et purifiés perdraient leur capacité à proliférer et à fusionner *in vivo*, particulièrement dans un environnement musculaire en dégénérescence (Farini 2009, Palmieri 2010). Des stratégies visant à améliorer l'efficacité des transplantations de myoblastes sont actuellement étudiées mais l'utilisation d'autres cellules et particulièrement des cellules souches précurseurs de la lignée myogénique sont aujourd'hui également étudiées (Skuk 2015).

En plus des cellules satellites, de nombreuses populations de cellules souches progénitrices peuvent être isolées du muscle squelettique : les cellules souches dérivées du muscle, une population de cellules musculaires excluant le colorant de Hoechst (cellules de la population marginale ou mSP, muscle side-population) et des progéniteurs CD133+ dérivés du muscle. Toutes ces cellules sont capables de proliférer rapidement, de fusionner avec les fibres musculaires dystrophiques (chez l'animal) et peuvent être distribuées par les vaisseaux sanguins, palliant ainsi les difficultés liées à la transplantation de myoblastes (Farini 2009). Une autre population de cellules souches musculaires, les MuStem, caractérisées par leur propriété d'adhérence retardée *in vitro*, a également montré son effet thérapeutique chez le chien *GRMD*. L'injection systémique de cellules MuStem induit une expression à long-terme de dystrophine, avec une amélioration du profil histologique musculaire et une stabilisation de l'état clinique des chiens traités (Rouger 2011).

En complément, d'autres cellules telles les cellules dérivées de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques ou encore les péricytes et les mésangioblastes (issus des vaisseaux sanguins) sont capables de contribuer à la régénération musculaire après une lésion ou dans le cadre de la DMD. L'équipe de Sampaolesi a par exemple montré que des mésangioblastes de chien sain transplantés par voie intra-artérielle à des chiens *GRMD* permettaient une restauration de l'expression de la dystrophine dans les muscles ainsi que la restauration de la fonction musculaire (Sampaolesi 2006).

Malheureusement, la plupart de ces cellules ne sont pas encore suffisamment caractérisées et n'ont été testées que chez l'animal (le plus souvent la souris) (Skuk 2015). De même, leur survie après transplantation et leur migration dans les muscles depuis les vaisseaux restent trop peu efficaces pour une utilisation en clinique. Les effets secondaires

liés à l'utilisation d'immunosuppresseurs lors de la transplantation doivent également être pris en considération mais pourraient être évités dans le cadre de l'utilisation de cellules autologues corrigées *ex vivo* par thérapie génique (Sampaolesi 2006, Farini 2009).

C- La thérapie génique par addition d'un gène thérapeutique

Au début des années 2000, en parallèle des 1^{ers} résultats insatisfaisants de la thérapie cellulaire via la transplantation de myoblastes, d'autres approches de traitements de la DMD ont vu le jour, et notamment les approches de thérapie génique. La stratégie de thérapie génique de remplacement, qui consiste à apporter une copie fonctionnelle d'un gène défectueux, est typiquement utilisée pour soigner des maladies monogéniques récessives pour lesquelles le gène en cause a été identifié. Aujourd'hui la perspective du traitement de ces maladies génétiques ou d'autres plus complexes en une seule et unique administration est à portée de main grâce au développement d'outils de transfert de gènes sûrs et efficaces et à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires des maladies humaines.

Outre la masse importante de muscles squelettiques à soigner et l'atteinte cardiaque à traiter (le cœur étant un muscle difficile d'accès), une autre difficulté liée à la thérapie génique apparaît pour le traitement de la DMD. En effet, la grande taille du gène *DMD* exclut un certains nombres de possibilités de traitement par remplacement du gène muté, à cause notamment de l'impossibilité d'insérer son ADNc complet (11kb) dans la plupart des vecteurs viraux de transfert de gène. Pour autant, cette limitation a justement permis de développer un très grand nombre de traitements alternatifs, applicables à un large panel de patients DMD ou BMD et même à d'autres maladies. Effectivement, de nombreuses stratégies, aujourd'hui en clinique chez l'Homme, ne consistent qu'à restaurer une partie seulement de la protéine dystrophine (qui sera tronquée mais fonctionnelle). D'autres stratégies ont été développées pour restaurer la totalité de la protéine dystrophine. D'autres encore, visent plutôt à traiter la maladie via d'autres protéines ou en complément de la restauration de la dystrophine. Une partie de ces différentes stratégies sera détaillée dans ce chapitre.

Les premiers outils de thérapie génique utilisés pour le traitement de la DMD ont été de simples plasmides injectés par voie intra-musculaire (IM) ou intra-veineuse/artérielle (IV, IA). Chez la souris *mdx* il a été montré que l'ADNc complet du gène *DMD* humain injecté par voie IM (quadriceps) pouvait être exprimé dans le muscle et permettait la restauration d'un

faible niveau de dystrophine dans $\approx 1\%$ des fibres musculaires (Acsadi 1991). Pour autant, l'expression de dystrophine complète n'a pas été associée à une amélioration fonctionnelle chez les patients, et ce malgré la bonne tolérance du traitement et l'absence de réponse immunitaire contre la protéine dystrophine néo-synthétisée (Romero 2004).

Bien que partiellement efficace et a priori bien toléré par le système immunitaire, le transfert d'ADN nu dans les tissus ne paraît pas être la stratégie la plus adaptée pour atteindre l'ensemble des muscles du corps et les corriger à long terme. En effet, la plupart des stratégies de thérapies géniques d'aujourd'hui utilisent des vecteurs, notamment de vecteurs viraux, pour faciliter le transfert de gène *in vivo*.

1) Les vecteurs viraux de thérapie génique

Dans le cadre d'un transfert de gène *in vivo*, les vecteurs viraux dérivés de virus sauvages, ont largement démontré leur efficacité à délivrer le gène d'intérêt, directement dans les cellules cibles ou dans l'organisme entier. C'est la capacité naturelle des virus à se répliquer en transférant leur propre information génétique dans les cellules hôtes qui est alors exploitée. Pour la conception de vecteurs recombinants, les gènes viraux potentiellement nocifs et non essentiels sont remplacés par le transgène d'intérêt thérapeutique, pour finalement conduire à la génération de particules virales non répliquatives.

Aujourd'hui, plus de 1200 essais cliniques ont confirmé le pouvoir des différents types de vecteurs viraux recombinants pour le transfert de gène chez l'Homme. Dans le cadre des dystrophies musculaires, trois types de vecteurs viraux sont particulièrement utilisés : ceux dérivés des rétrovirus (lentivirus), ceux dérivés des adénovirus et ceux dérivés des virus associés aux adénovirus (AAV) (figure 9).

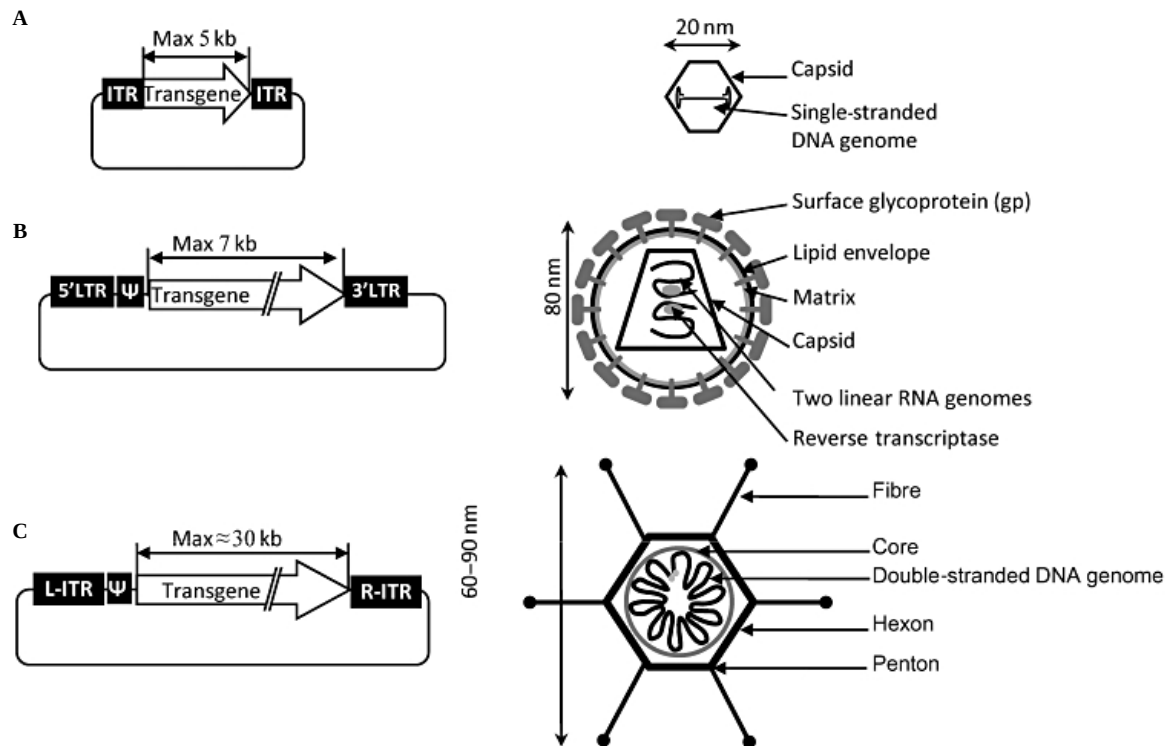


Figure 9 : Représentations schématiques des plasmides et particules virales des trois principaux vecteurs viraux de thérapie génique utilisés dans le cadre de stratégies thérapeutiques de la DMD. A: Vecteur AAV recombinant, B: Vecteur rétroviral recombinant, C: Vecteur adénoviral « gutless » ou « helper dependant adenoviral vector » (HDAd) (tirée de Bouard 2009).

Chaque virus confère au vecteur qui en découle des particularités propres, mais un certain nombre de points communs restent critiques et doivent être investigués pour chacune des approches thérapeutiques utilisant ces vecteurs (Bouard 2009, Goyenvallé 2011, Evans 2015).

Le risque de réponse immunitaire à l'encontre du vecteur recombinant doit être considéré dans la mesure où cela peut *i)* empêcher le vecteur d'atteindre sa cible, *ii)* détruire les cellules transduites, annihilant tout effet thérapeutique et *iii)* empêcher des injections multiples (ré-injections) du vecteur. De façon plus dramatique, au début des années 2000, une forte réaction immunitaire contre un vecteur adénoviral visant à traiter un déficit en ornithine transcarbamylase a été responsable du décès d'un patient (Raper 2003).

Afin de maintenir l'effet thérapeutique à long terme, le génome doit également pouvoir être conservé dans les cellules cibles et maintenir l'expression du transgène. La question de l'intégration au génome de l'hôte est à prendre en considération pour les vecteurs

rétroviraux notamment puisqu'elle peut conduire à la mutagenèse insertionnelle et à l'activation de proto-oncogènes (Hacein-Bey-Abina, 2003).

Un autre point critique dans l'utilisation des vecteurs viraux comme « Cheval de Troie » en transfert de gène est le ciblage des cellules d'intérêt. En effet, une transduction importante de cellules ou de tissus non ciblés par la thérapie induirait potentiellement des effets cliniques non prévus, voire indésirables, en plus de diminuer la biodisponibilité du vecteur pour le tissu d'intérêt. Dans ces cas, la restriction de l'expression du transgène aux cellules cibles par l'utilisation de promoteurs tissu-spécifiques ou inductibles est envisageable (Bouard 2009).

Les risques de dissémination sont également à prendre en compte. La dissémination du vecteur via les fluides corporels (urine, salive, sang et autres fluides biologiques) des animaux ou patients injectés, bien que transitoire, doit être suivie et prise en charge par l'utilisation d'équipements adaptés et de mesures de confinement permettant de contrôler cette dissémination. La transmission verticale du vecteur viral par les fluides séminaux est également une préoccupation majeure des agences de réglementations sanitaires. Dans plusieurs essais pré-cliniques mais aussi cliniques utilisant des vecteurs AAV recombinants (AAVr), il a été montré que des copies de transgène pouvaient être retrouvées dans les gonades et/ou dans le sperme, mais pas dans les cellules germinales. Le risque de transmission à la descendance paraît donc faible, mais doit tout de même être vérifié et contrôlé dans le cadre des essais pré-cliniques et cliniques (Dismuke 2013, Manno 2006, Nathwani 2011b, Nathwani 2014).

Enfin, pour qu'un transfert vers la clinique soit possible, une production de vecteurs à grande échelle doit être mise en place. L'amélioration et le développement de nouveaux procédés de production et de purification des vecteurs permettent l'obtention de lots avec des rendements de production améliorés et des vecteurs de meilleure qualité pour une utilisation chez l'Homme (Merten 2004, Galibert 2011, Kotin 2011, Mietzsch 2014). Dans le cadre du développement d'un médicament, les coûts de production devront également être diminués. Par exemple, le Glybera[®], le 1^{er} et à ce jour unique médicament de thérapie génique AAV sur le marché, et approuvé par l'agence du médicament européenne pour le traitement du déficit en lipoprotéine lipase (LPL), pourrait coûter jusqu'à 1 million d'euros par patient (Ylä-Herttuala 2015).

2) Les vecteurs rétroviraux/lentiviraux

Les vecteurs rétroviraux sont issus des rétrovirus, une famille de virus enveloppés sphériques d'environ 80nm de diamètre et à ARN simple brin. Ces vecteurs sont très attractifs en thérapie génique de par leur capacité à transduire les cellules en division et à intégrer leur génome dans celui de la cellule hôte, conférant ainsi une correction thérapeutique stable sur le long terme. De plus, les vecteurs rétroviraux ont une immunogénicité intrinsèque plutôt faible (comparée aux autres vecteurs) et une capacité d'encapsulation de 7 à 9 kb (figure 9). Ils ont été utilisés avec succès en biologie et médecine moléculaire, notamment comme outils de thérapie génique, de transgénèse ou bien encore en imagerie. Les vecteurs lentiviraux (en particulier ceux dérivés du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1)) sont un sous-type de vecteurs rétroviraux. Ils sont privilégiés notamment pour les essais de thérapie génique dans le muscle, puisque contrairement aux autres rétrovirus, les lentivirus sont capables d'infecter les cellules quiescentes aussi bien que les cellules en division (Naldini 1996).

Bien que l'aspect intégratif des vecteurs lentiviraux soit un avantage pour le maintien du transgène à long terme, c'est également un facteur de risque de génotoxicité. En effet, au début des années 2000, les premiers signes de mutagénèses insertionnelles *in vivo* dues à l'intégration des vecteurs rétroviraux sont observés (Li Z. 2002, Rothe 2013). Plusieurs enfants traités pour une immunodéficience combinée sévère liée à l'X (SCID-X) ont notamment développé une leucémie après que la cassette thérapeutique se soit intégrée au génome hôte et provoque finalement l'activation du proto-oncogène LMO2 (Hacein-Bey-Abina, 2003).

De nombreuses modifications ont été apportées aux constructions pour améliorer la sécurité de ces vecteurs. Ainsi, dans les premières générations de vecteurs lentiviraux, les gènes codant les protéines régulatrices ont été supprimés sans impact sur l'efficacité du vecteur. Puis les vecteurs SIN (self-inactivating) ont été créés en supprimant la région promoteur/enhancer du LTR 3' minimisant ainsi les risques d'interférence avec les promoteurs des gènes endogènes (le transgène thérapeutique étant dorénavant sous le contrôle d'un promoteur choisi). Finalement les vecteurs lentiviraux non intégratifs ont été développés (IDLV, integration deficient lentiviral vectors) en inactivant le gène de l'intégrase et sont utilisés pour des stratégies visant des cellules quiescentes (Bouard 2009, Escors 2010, Rothe 2013).

Parmi les applications des vecteurs lentiviraux/rétroviraux en thérapie génique, on trouve l'immunothérapie des cancers, le but étant alors de casser la tolérance du système immunitaire envers les antigènes tumoraux en transduisant *ex vivo* les cellules dendritiques du patient (Escors 2010). Les vecteurs rétroviraux sont également utilisés pour des stratégies de thérapie génique pour des maladies génétiques comme notamment la β -thalassémie, l'hémophilie, le déficit immunitaire combiné sévère lié au chromosome X ou le syndrome de Wiskott-Aldrich (Rothe 2013).

Concernant la DMD, les injections de vecteurs lentiviraux directement dans le muscle n'étant pas très efficaces, les essais les plus notables avec ce type de vecteurs sont des stratégies de transduction *ex vivo* de cellules souches myogéniques ou autres précurseurs du muscle, associant finalement une approche de thérapie génique avec une stratégie de thérapie cellulaire (Li S. 2005, Goyenvallé 2011). Par exemple, la transduction de cellules musculaires de la population marginale mSP (Bachrach 2004) ou de mésangioblastes (Sampolesi 2006) avec un vecteur lentiviral portant un transgène de type mini-dystrophine peut offrir au muscle une source continue de dystrophine après transplantation des cellules transduites.

3) Les vecteurs adénoviraux

Contrairement aux vecteurs lentiviraux, les vecteurs adénoviraux (Ad) ne s'intègrent pas au génome de l'hôte mais persistent sous forme épisomale à plus ou moins long terme, ce qui écarte les risques de génotoxicité, mais peut nécessiter des injections répétées pour obtenir une expression du transgène à long terme. Leur très grande capacité d'encapsidation (jusqu'à 30 kb) leur confère un gros avantage par rapport aux autres vecteurs utilisés en thérapie génique (figure 9). Les vecteurs Ad sont capables de transduire de nombreux types cellulaires en division ou non et sont produits à très haut rendement.

Les adénovirus sont de grands virus non enveloppés de 60 à 170 nm de diamètre (figure 9). Il existe plus de 50 sérotypes d'Ad, les plus caractérisés étant l'Ad2 et l'Ad5.

Dans les premières générations de vecteurs Ad, seules certaines régions du génome viral étaient remplacées par le transgène d'intérêt, empêchant l'activation des gènes viraux responsables de la réplication virale. Mais après infection des cellules cibles, une petite quantité de protéines virales était tout de même produite grâce aux autres gènes de l'Ad. Les fortes réactions immunitaires cytotoxiques provoquées par cette « fuite » de protéines virales conduisaient à la destruction des cellules transduites empêchant ainsi l'expression du

transgène à long terme (Capasso 2014). Un vecteur adénoviral de ce type a notamment été responsable du décès d'un patient, 4 jours après une injection dans le foie par la veine porte pour le traitement d'un déficit en ornithine transcarbamylase. Le patient a développé une réaction inflammatoire systémique favorisée par la transduction massive des cellules présentatrices d'antigènes du foie et de la rate, qui, une fois activées, ont conduit à la production massive de cytokines pro-inflammatoires (Raper 2003).

Afin de minimiser les réactions immunitaires contre les antigènes viraux, les vecteurs Ad ont été modifiés chimiquement (par exemple avec du polyéthylène glycol) et de plus en plus de constructions ont été générées par délétion des autres gènes viraux essentiels (Capasso 2014), l'aboutissement étant le développement du vecteur Ad « gutless » ou Ad dépendant d'un plasmide de complémentation. On parle alors de HDAd (helper dependent adenoviral vector), aussi appelé HCAd (high capacity adenoviral vector). Sans ses séquences virales, le HDAd est moins immunogène et permet une expression du transgène à plus long terme (Jager 2009).

Aujourd'hui, les vecteurs Ad sont principalement utilisés dans des protocoles de vaccination (étant donné la haute capacité de l'Ad à transduire les cellules présentatrices d'antigènes) et en thérapie génique du foie (Vetrini 2010). Concernant le muscle, plusieurs études ont montré la possibilité d'utiliser le HDAd pour restaurer l'expression de dystrophine complète dans les muscles de souris *mdx* (Jiang 2004, Eghtesad 2010) puisqu'il est possible d'y encapsider l'ADNc complet de la dystrophine. Une injection IM d'HDAd-dystrophine à des souris *mdx* néonatales permet par exemple une amélioration de la force et de la résistance musculaire en corrélation avec le nombre de fibres dystrophine positives (jusqu'à 52%), ainsi qu'une restauration du complexe DAPC. Ces observations sont faites un an après l'injection, ce qui démontre l'expression à long terme du transgène médié par l'HDAd, et ce malgré une réponse humorale contre la dystrophine murine (Duddley 2004).

Pourtant, l'efficacité des vecteurs adénoviraux pourrait être limitée par plusieurs choses chez les patients. En effet, la transduction de l'Ad est limitée dans le muscle adulte de par la sous-expression du récepteur CAR (coxsackie and adenovirus receptor) à la surface des cellules musculaires matures (Larochelle 2010). De plus, du fait d'une infection antérieure par l'Ad sauvage, une grande partie de la population humaine possède une immunité pré-existante contre l'Ad (près de 50% de la population pour l'Ad5). Si la présence d'anticorps neutralisants anti-HDAd ne semble pas empêcher l'efficacité d'un traitement local (injection IM) chez la souris (Maione 2001), il est fort probable qu'un HDAd injecté par voie

intraveineuse soit neutralisé par cette immunité pré-existante avant d'atteindre sa cible. Sachant que seule une injection par voie intraveineuse devrait permettre d'atteindre l'ensemble des muscles, dont le cœur, ce type de vecteur ne semble donc pas être le meilleur candidat pour le traitement de la DMD.

4) *Les vecteurs dérivés des virus associés aux adénovirus (AAV)*

Découverts en 1965 comme contaminants d'une préparation d'adénovirus (Atchison 1965), l'AAV est aujourd'hui l'un des vecteurs viraux les plus utilisés en thérapie génique des maladies monogéniques, cela grâce à son innocuité, sa capacité à transduire un large panel de tissus et de cellules quiescentes ou non, ainsi qu'à maintenir l'expression du transgène sur le long terme sans pour autant s'intégrer au génome de l'hôte. L'AAV appartient à la famille des *Parvoviridae* du genre *Dependovirus* puisque sa répllication est dépendante de la co-infection d'un autre virus, dit « helper » tel que l'adénovirus ou l'herpesvirus par exemple. Une douzaine de sérotypes et de multiples variants naturels de l'AAV ont été isolés à partir de différents tissus de mammifères (humains, rongeurs, primates non-humains). L'ensemble de ces sérotypes et variants confèrent à l'AAV un large tropisme cellulaire. L'AAV sauvage n'a été associé à aucune maladie humaine. Il a cependant été montré très récemment que l'intégration du génome de l'AAV2 dans des gènes à l'origine de cancer pouvait provoquer une mutagénèse insertionnelle à l'origine de tumeurs hépatiques (Nault 2015). De plus, il existe une séroprévalence importante dans la population générale aboutissant à la production d'anticorps et de facteurs neutralisants (prévalence d'anticorps IgG : AAV2: 72%, AAV1: 67%, AAV9: 47%, AAV6: 46%, AAV5: 40% et AAV8: 38%) (Boutin 2010).

L'AAV fait partie des plus petits virus connus : sa capside icosaédrique non enveloppée d'environ 20 nm de diamètre enferme un tout aussi petit génome d'ADN simple brin d'environ 4.7 kb (figures 9 et 10). Ce génome est constitué de deux gènes *rep* et *cap* et de séquences terminales inversées et répétées (ITR) de 145 pb. Les ITR forment deux structures « T » en épingle à cheveux aux extrémités 5' et 3' qui jouent le rôle d'origine de répllication et sont indispensables notamment à la synthèse du second brin d'ADN. Le gène *rep* utilise ses deux promoteurs (p5 et p19) pour coder quatre protéines de régulation : Rep78, Rep68, Rep52 et Rep40 (nommées en fonction de leur poids moléculaire). Ces protéines sont impliquées dans la régulation de la synthèse et de l'accumulation des génomes viraux simple brin avant leur encapsidation dans les nouvelles particules virales produites, ainsi que de l'intégration du

génome. En effet, l'AAV sauvage possède la capacité unique de s'intégrer préférentiellement à un site spécifique du génome humain, le site S1 dans le bras long du chromosome 19 (Kotin 1990, Smith 2008), même s'il a récemment été montré qu'il pouvait s'intégrer à d'autres locus provoquant des mutagénèses insertionnelles (Nault 2015). Le gène *cap*, quant à lui permet la production des trois protéines de la capsid VP1, VP2 et VP3 à partir d'un seul transcrit (promoteur p40) alternativement épissé (Gonçalves 2005, Buning 2008, Grieger 2012). VP1, VP2 et VP3 ne diffèrent donc que par leur région N-terminale. Leur ratio moléculaire dans la capsid est estimé à 1:1:10 respectivement pour VP1, VP2 et VP3 (Johnson 1971).

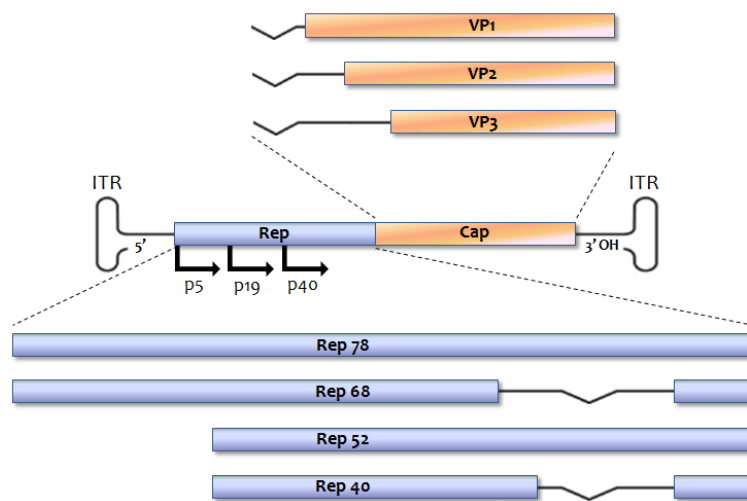


Figure 10 : Représentation schématique du génome de l'AAV sauvage. Il est organisé en 2 cadres ouverts de lectures (ORF, *open reading frame*) entouré des ITR en épingle à cheveux. Le premier ORF code, à partir des promoteurs p5 et p19, pour les 4 protéines Rep (Rep78, 68, 52 et 40) impliquées dans la réplication virale, la régulation de la transcription, l'intégration du génome et l'assemblage des virions. Le second ORF Cap, utilise le promoteur p40 et code les 3 protéines de la capsid (VP1, 2 et 3).

Les différents sérotypes d'AAV possèdent des séquences protéiques VP différentes et n'utilisent par conséquent pas les mêmes récepteurs cellulaires pour l'entrée dans les cellules, ce qui leur confère leur tropisme spécifique. La figure 11 regroupe les tropismes préférentiels des sérotypes d'AAVr les plus couramment utilisés. La plupart des AAV utilise des glycanes comme récepteurs primaires. L'AAV2, le sérotype le mieux caractérisé, utilise par exemple les protéoglycanes héparanes sulfates (Summerford 1998).

Dans le cadre du traitement de la DMD, l'ensemble des muscles squelettiques, le diaphragme et le myocarde doivent pouvoir être atteints par le vecteur AAVr pour obtenir un bénéfice clinique optimal. Les premiers essais de thérapie génique de la DMD avec AAVr ont été

réalisés avec l'AAVr-2, le premier sérotype identifié. L'AAVr-2 est aujourd'hui de moins en moins utilisé à cause de sa grande séroprévalence dans la population humaine, ainsi que l'identification d'autres sérotypes plus efficaces pour la transduction musculaire. Les sérotypes AAVr-1, 6, 8 et 9 permettent tous une transduction du muscle cardiaque et des muscles squelettiques, mais ont chacun leurs spécificités (Wang D. 2014). Ainsi, l'AAVr-8 est très efficace pour la transduction des muscles squelettiques et du diaphragme car il est notamment capable de passer la barrière endothéliale des vaisseaux après une injection intraveineuse (Wang Z. 2005, Le Guiner 2014). L'AAVr-1 a été le premier utilisé pour la transduction du cœur ; il a notamment été injecté à des patients atteints d'insuffisance cardiaque (Jessup 2011) mais depuis, l'AAVr-6 et l'AAVr-9 ont démontré leur supériorité, au moins chez les rongeurs, pour la transduction du myocarde (Gregorevic 2004, Bish 2008, Zincarelli 2010).

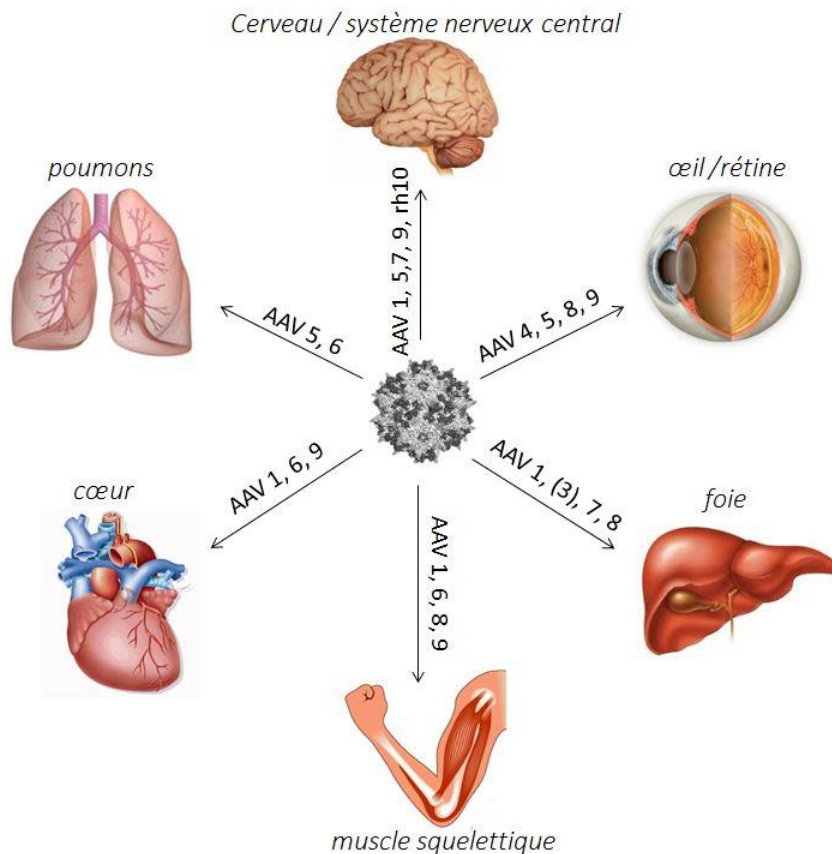


Figure 11 : Tropisme des vecteurs AAVr dérivés des sérotypes naturels d'AAV. Basée notamment sur Asokan 2012, Dismuke 2013, Wang D. 2014. L'AAVr-2 (non présenté dans la figure) a un tropisme assez large et peut transduire beaucoup de tissus, pourtant à cause de sa grande séroprévalence, il est assez peu utilisé aujourd'hui dans les essais clinique chez l'Homme. Concernant l'AAVr-3, il est connu pour très bien transduire les cellules cancéreuses hépatiques *in vitro* et son co-récepteur est le facteur de croissance des hépatocytes humains (HHGF), suggérant une efficacité dans la transduction du foie chez l'Homme (Glushakova 2009, Ling 2010).

Il est possible de changer le tropisme cellulaire de certains AAVr afin, par exemple de diminuer l'affinité d'un sérotype pour un tissu (Buning 2008, Guenther 2014). Ainsi, les AAVr mosaïques partagent des sous unités protéiques de capsides de plusieurs sérotypes combinant ainsi les avantages des sérotypes parents. Les AAVr chimères sont créés en assemblant par épissage les gènes *cap* de plusieurs sérotypes aboutissant à la formation d'une capside totalement hybride. D'autres variants peuvent également être créés en remaniant l'ADN de plusieurs vecteurs chimères (*in silico* à partir des bibliothèques de capsides chimères). L'AAVr-2i8 est par exemple un vecteur chimère issu de l'AAV8 qui préserve son efficacité de transduction du muscle mais permet de dé-cibler le foie (Rotundo 2013). Un variant AAVr-M41 a aussi été créé en remaniant les gènes des capsides AAVr-1 à 9 puis sélectionné *in vivo* chez des rongeurs. Il présente un tropisme très fort pour le myocarde, plus efficace encore que l'AAVr-6 (Yang 2009). Des modifications chimiques peuvent également modifier le tropisme ou l'immunogénicité d'un AAVr (Guenther 2014). En effet, le développement de nouveaux variants AAVr permet également d'éviter la reconnaissance des capsides AAVr par des facteurs neutralisants pré-existants. Cette nouvelle propriété permettrait d'élargir les autorisations d'essai cliniques aux patients séropositifs pour les sérotypes les plus communs (Tse 2015).

Pour la production des vecteurs AAVr, les ITR étant les seuls éléments indispensables à la réplication et l'encapsidation du génome, les gènes *rep* et *cap* sont remplacés par la cassette d'expression du transgène thérapeutique et apportés par un plasmide de complémentation. Afin de standardiser la production d'AAV de sérotypes différents, les ITR de l'AAV2 sont toujours utilisés. Seuls les gènes *rep* et *cap* du plasmide de complémentation changent en fonction du sérotype souhaité. Ainsi les différents vecteurs AAVr ne diffèrent que par la nature de leur capside (Rabinowitz 2002). La méthode de production des vecteurs AAV la plus couramment utilisée aujourd'hui est la méthode de tri-transfection de cellules humaines HEK293 (figure 12). Comme évoqué précédemment, la réplication de l'AAV est dépendante de la présence d'un adénovirus ; mais au lieu d'infecter les HEK293 avec un adénovirus sauvage, les gènes de l'Ad essentiels à la production d'AAVr ont été regroupés sur un troisième plasmide ce qui permet la production des particules AAVr uniquement et à un meilleur titre (Xiao 1998).

Une autre technique de production, développée plus récemment permet l'obtention de vecteurs AAVr en grande quantité et à très haut rendement. Cette méthode est basée sur l'utilisation de cellules d'insecte (Sf9) infectées par des baculovirus recombinants portant

respectivement les gènes *rep*, *cap* et la cassette thérapeutique de l'AAVr (Urabe 2002, Galibert 2011).

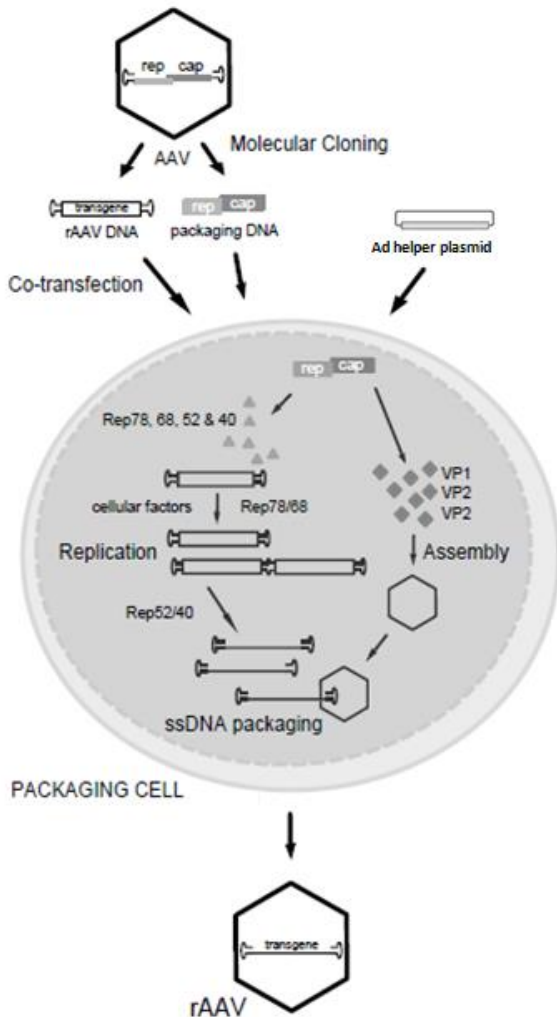


Figure 12 : Méthode de production des vecteurs AAVr par tri-transfection. Trois plasmides sont nécessaires à la reconstitution d'une particule virale d'AAVr contenant une copie du transgène d'intérêt. Un plasmide contient le transgène thérapeutique et les deux ITR, seuls éléments de de l'AAV sauvage indispensables à la réplication du génome et à son encapsidation. Un autre plasmide, de complémentation contient les gènes *rep* et *cap* de l'AAV sauvage, et un troisième plasmide « helper » contient les gènes viraux de l'Ad indispensables à la production de particules AAV. Après transfection dans des cellules productrices (HEK293), les fonctions de complémentation de l'Ad permettent l'activation des différentes phases du cycle de l'AAV. Le gène *cap* permet la production des protéines VP qui s'assemblent pour former des capsides vides d'AAV. L'ADN polymérase cellulaire ainsi que les protéines Rep68 et 78 permettent la réplication du génome. Une copie simple brin du génome est alors encapsidée dans une capside vide, grâce aux activités catalytiques de Rep 40 et 52. Les particules virales d'AAVr ainsi formées sont libérées des cellules productrices et sont récoltées par ultracentrifugation (adaptée de Gonçalves 2005).

Après son entrée dans la cellule par endocytose, l'AAVr échappe aux endosomes et est transporté jusqu'au noyau où il est décapsidé. Pour être transcrit, le génome simple brin est convertit en double brin (sauf dans le cas particulier des vecteurs dits « scAAV » où le génome recombinant est déjà sous forme double brin, McCarty 2003). De nombreuses études ont montré que l'expression du transgène persistait à très long terme *in situ* et notamment dans le muscle (Clark 1997, Manno 2003, Rivera 2005, Nathwani 2011b). En effet, les génomes double brins recombinants persistent de façon stable dans le noyau sous une forme extra-chromosomique principalement épisomale. Le génome est retrouvé sous forme de monomères ou de concatémères (après recombinaison intermoléculaire de plusieurs génomes) associés à la chromatine (Duan 1998, Yang 1999, Penaud-Budloo 2008). Au contraire de l'AAV sauvage, l'AAVr ne s'intègre pas à un site spécifique du génome mais des phénomènes d'intégration aléatoire pu être observés *in vitro* et *in vivo*. Même si l'intégration du génome AAVr est un

phénomène rare ($<0.0001\%$) par rapport à l'occurrence des formes extra-chromosomiques (Nakai 2001, Schnepf 2003, Nowrouzi 2012), il doit être pris en compte pour évaluer la sécurité des approches de thérapies géniques médiées par l'AAVr.

Les domaines d'application des vecteurs AAVr sont très diversifiés puisqu'ils sont capables de délivrer un transgène thérapeutique dans de nombreux tissus tels la rétine, le système nerveux central, le foie, les muscles (Mingozzi 2011). Des essais cliniques ont été développés pour plusieurs maladies génétiques monogéniques (Amaurose congénitale de Leber, hémophilie B et déficit en $\alpha 1$ anti-trypsinose notamment). Le Glybera[®], un traitement AAV pour un déficit en lipoprotéine lipase (Gaudet 2010) a été approuvé par l'EMA (European Medicines Agency) en 2012. Il s'agit du tout premier médicament de thérapie génique mis sur le marché en Europe. Des traitements basés sur l'utilisation d'AAVr pour d'autres maladies plus complexes ou idiopathiques comme la maladie de Parkinson, l'insuffisance cardiaque ou l'arthrose sont également en cours d'évaluation chez l'Homme (Jessup 2011, Mingozzi 2011, Kotterman 2014).

Concernant la thérapie génique de la DMD à l'aide de vecteurs AAVr, une des principales limitations concerne les réactions immunes à l'encontre de la capside.

L'immunité pré-existante anti-AAV dans la population humaine peut en effet être une limitation à l'inclusion de patients dans un essai ou à l'utilisation de certains sérotypes. L'exemple le plus notable est l'AAV2 pour lequel 60 à 70% de la population humaine présente une immunité pré-existante (anticorps neutralisants). Ce chiffre est réduit à 20-30% pour l'AAV8 (Calcedo 2009, Boutin 2010). Outre la présence d'anticorps (Ac) pré-existants anti-AAV, des réponses humorales impliquant la production d'Ac spécifiques de la capside sont quasi-systématiquement observées à la suite de l'administration d'un vecteur AAVr mais ces réponses sont généralement sans conséquence sur l'efficacité du transfert de gène (Nathwani 2007, Haurigot 2010, Flotte 2011, Ferreira 2014). Par contre, la présence de ces Ac empêche l'utilisation du même vecteur si une réadministration est nécessaire.

Pour surmonter ces limitations, il est possible d'avoir recours à une immunosuppression transitoire ou d'utiliser d'autres sérotypes d'AAV dont la prévalence est plus faible dans la population générale (Boutin 2010), mais il y a des risques de cross-réactivité des Ac entre les différentes capsides d'AAV (Basner-Tschakarjan 2014). Des protocoles de plasmaphérèse, permettant de réduire le taux d'Ac anti-AAV circulants avant administration du vecteur sont aussi actuellement évalués. On sait également que certaines voies d'injection permettent de

minimiser le plus possible le contact du vecteur avec les Ac neutralisants (Calcedo et Wilson 2013, Chicoine 2014a).

Une autre préoccupation majeure dans l'immunité anti-AAV concerne les réponses cellulaires T spécifiques dirigées contre la capsid de l'AAV (Basner-Tschakarjan et Mingozi 2014). Les vecteurs AAV ont longtemps été considérés comme peu immunogènes, surtout lorsqu'ils étaient comparés à d'autres types de vecteurs viraux, tels que les vecteurs adénoviraux, qui engendrent systématiquement une importante réponse inflammatoire et cellulaire (Zaiss 2002). Cependant, la première preuve de l'importance de la réponse cellulaire anti-AAV a été mise en évidence lors d'un essai clinique dans lequel des patients atteints d'hémophilie B injectés avec un AAV2-FIX ont développés des réponses T cytotoxiques envers la capsid de l'AAV2, provoquant la destruction des hépatocytes transduits. La perte de l'expression du transgène thérapeutique FIX coïncide avec un pic d'élévations des enzymes hépatiques (transaminases), reflétant la destruction des cellules (Manno 2006, Mingozi 2007). Pour limiter ces réponses T cellulaires, diverses stratégies ont été envisagées, telles que la réduction de la dose de vecteur, l'utilisation d'inhibiteurs du protéasome ou d'immunosuppresseurs (Basner-Tschakarjan et Mingozi 2014). Une stratégie récemment appliquée lors d'un essai clinique chez des patients hémophiles injectés avec un AAVr-8-FIX, a consisté en l'administration d'une immunosuppression transitoire à base de stéroïdes (prednisolone). Chez les patients traités, cette immunosuppression a permis de limiter le développement de la réponse cellulaire anti-AAV8 et d'éviter la perte de l'expression du transgène thérapeutique (Nathwani 2011b, Nathwani 2014).

Un autre inconvénient majeur des vecteurs AAVr est sa faible capacité d'encapsulation, inférieure à 5kb. Nous verrons dans la suite de ce chapitre (*Chapitre 2, D-*) quelles sont les différentes approches qui permettent de contrecarrer ce dernier inconvénient, et qui permettent de dire qu'aujourd'hui les vecteurs AAVr sont des outils prometteurs dans le développement d'un traitement de la DMD.

D- Les stratégies de thérapie génique d'addition pour le traitement de la DMD

1) Thérapie génique d'addition par transfert d'une dystrophine tronquée (mini ou micro-dystrophine)

Bien que les AAVr soient les vecteurs de choix pour le transfert de gènes dans le muscle, seul un transfert d'un mini-gène *DMD* est envisageable puisque la capacité d'encapsulation de ces vecteurs est inférieure à 5kb alors que l'ADNc de la dystrophine s'étale sur 11 kb. Comme évoqué dans le *Chapitre 1*, l'idée de créer des mini-gènes *DMD* est apparue lors de l'observation de phénotypes BMD chez des patients ayant de très larges délétions dans la dystrophine (England 1990). Chez ces patients, des mutations dans les domaines répétés ou N-terminal de leur dystrophine conduisaient à un phénotype léger ou moyen par rapport aux patients DMD portant une mutation dans la partie C-terminale, suggérant que les domaines répétés et N-terminal pourraient ne pas être essentiels à la liaison au DAPC. Toutefois, des mutations dans la région N-terminale altérant la liaison avec la F-actine étaient à l'origine d'un phénotype BMD sévère (Matsumura 1994).

Depuis, de nombreux groupes ont investigué différentes constructions de transgènes codant des minidystrophines ou microdystrophines répondant à deux critères : avoir une taille optimale permettant d'être encapsidée dans un vecteur AAVr et montrer une efficacité thérapeutique. De nombreuses équipes ont travaillé sur la génération de constructions contenant donc seulement certains des domaines de la protéine dystrophine native. Leur fonctionnalité a été principalement testée chez des modèles murins de la DMD injectés avec les différentes versions de ces AAVr-mini ou microdystrophine (Wang B. 2000, Fabb 2002, Sakamoto 2002, Harper 2002, Gregorevic 2006, Yue 2006, Foster 2008, Wang B. 2009a). Lorsqu'exprimé à un niveau suffisant, la plupart de ces diverses constructions (un aperçu en figure 13) ont démontré l'amélioration du phénotype DMD : restauration du complexe DAPC au sarcolemme, améliorations histologiques et morphologiques des fibres, stabilisation de la dégénérescence musculaire, amélioration de la fonction et de la force musculaire, résistance aux contractions excentriques. Des améliorations cardiaques ont également pu être observées (Bostick 2012).

Δ 17-48		MW	DAG	Central Nucleation	EB Dye	CK levels	Specific Force	Reference:
Δ DysAX2	[Diagram: H1 1 2 3 24 H4 CR CT]	150 kD	+	ND	ND	ND	ND	(Yuasa et al, 1998) ⁵⁰
Δ DysAX11	[Diagram: H1 1 2 23 24 H4 CR CT] (4.4 kb)	150 kD	+	Lowered	ND	Low	No Effect	
Δ DysAH3	[Diagram: H1 1 2 24 H4 CR CT]	138 kD	+	ND	ND	ND	ND	
Δ DysM3	[Diagram: H1 1 24 H4 CR CT] (3.7kb)	125 kD	+	Lowered	ND	Lowered	No Effect	
Δ DysCS1	[Diagram: H1 1 2 3 H2 24 H4 CR CT] (4.9 kb)	165 kD	+	Abolished	ND	Normal	Improved	(Sakamoto et al, 2002) ⁴³
Δ 3990*	[Diagram: H1 1 2 H3 22 23 24 H4 CR] (4.1kb)	~140 kD	+	Abolished (<1%)*	Excluded	ND	ND	(Wang et al, 2000 & Watchko et al., 2002) ⁵²
Δ 4173	[Diagram: H1 1 2 3 22 23 24 H4 CR] (4kb)	~140 kD	+	Abolished (2.3%)	Excluded	ND	Improved	
Δ 3849	[Diagram: H1 1 2 22 23 24 H4 CR] (3.8kb)	~130 kD ~222 kD	+	Abolished (2.8%)	Excluded	ND	ND	
Δ H2-R19* /ex. Δ 17-48	[Diagram: H1 1 2 3 H3 20 21 22 23 24 H4 CR CT]		+	Abolished (<1%, 3%)	Excluded	ND	Restored	(Harper et al, 2002 & Scott et al 2002) ^{48,55}
Δ R4-R23	[Diagram: H1 1 2 3 H2 24 H4 CR CT]	167 kD	+	Abolished (1%)	Excluded	ND	Improved (70%)	
Δ R2-R21+H3	[Diagram: H1 1 H3 22 23 24 H4 CR CT]	169 kD	+	Lowered (52%)	Excluded	ND	Improved (75%)	
Δ R2-R21	[Diagram: H1 1 22 23 24 H4 CR CT]	165 kD	+	Lowered (15%)	Excluded	ND	Improved (75%)	
Δ H2-R19, R20	[Diagram: H1 1 2 3 H3 21 22 23 24 H4 CR CT]	197 kD	+	Lowered (27%)	Excluded	ND	Improved (52%)	
Δ 3788*	[Diagram: H1 1 2 19 H3 20 21 22 23 24 H4 CR] (3.8 kb)	144 kD	+	Abolished	ND	ND	ND	(Fabb et al, 2002) ⁴⁷

Figure 13: Représentation schématique de la structure protéique de la dystrophine complète et de différents exemples de mini ou microdystrophines développées par différentes équipes et testées dans des modèles murins de la DMD. La construction $\Delta 17-48$ correspond à la minidystrophine de référence retrouvée chez un patient BMD (England 1990). Toutes les constructions ont été administrées *in vivo* à l'aide d'un vecteur AAVr. ABD (1 et 2): domaines de liaison à l'actine ; H: région charnière (hinge) ; CR: domaine riche en cystéine ; CT: domaine C-terminal ; CN: noyaux centraux ; MW: poids moléculaire ; DAG: DAPC ; ND: non déterminé (tirée de Athanasopoulos 2004).

Ces études ont permis de mettre en évidence la structure modulaire et flexible de la dystrophine. Ainsi, même si la plupart des domaines répétés ne sont pas essentiels, leur organisation (nombre et périodicité, présence des domaines charnières) paraît critique. La stabilité de la structure est également dépendante de la préservation des conformations en hélice α des domaines répétés. La position des charnières joue aussi un rôle sur la fonctionnalité de la dystrophine : lorsqu'au sein d'une mini/microdystrophine une région charnière se retrouve à côté de domaines répétés normalement adjacents à une région charnière (la même ou une autre) dans la protéine dystrophine native, la construction est plus efficace (Harper 2002).

Il a été montré que l'extrémité C-terminale de la dystrophine pouvait également être retirée de ces constructions sans trop d'impact sur la fonction. Par contre, la région riche en cystéine doit être conservée pour sa liaison aux dystroglycane (Crawford 2000, Yue 2006).

Certaines de ces constructions ont été optimisées en rajoutant le domaine de liaison aux syntrophines et à la dystrobrevine (hélice 1 de la région spiralée C-terminale) (Koo 2011a), ou encore en incorporant les domaines R16/17 pour une relocalisation normale du nNOS au sarcolemme (Lai 2009). Une optimisation de la séquence du transgène elle-même (optimisation des codons basée sur la fréquence d'utilisation des ARN de transfert humains et optimisation du pourcentage de bases GC afin d'améliorer la stabilité de l'ARNm notamment) permet également une augmentation du niveau d'expression de la mini/microdystrophine et finalement une réduction de la dose de vecteur injecté chez l'animal pour obtenir une amélioration du phénotype musculaire (Foster 2008)

Le premier essai clinique de thérapie génique pour la DMD, utilisant un vecteur AAVr, a été mené par Jerry Mendell et ses collaborateurs sur 6 patients DMD injectés par voie IM avec un AAVr-2.5-CMV-minidystrophine (Mendell 2010, Bowles 2012). Malheureusement, quelque soit la dose injectée et malgré la détection de quelques copies du transgène thérapeutique dans les muscles injectés, aucune expression de protéine dystrophine n'a été observée. Plusieurs phénomènes, plus ou moins cumulatifs, peuvent expliquer ce résultat : la présence d'Ac neutralisants anti-AAV2.5 avant injection chez 2 des patients ; le développement d'une réponse cellulaire anti-AAV2.5 après injection chez 1 des patients ; le développement d'une réponse cellulaire anti-dystrophine après injection chez 4 des patients (Mendell 2010, Bowles 2012). La minidystrophine rassemblant des domaines non adjacents sur la protéine dystrophine native formerait en effet de nouveaux épitopes reconnus par le système immunitaire, pouvant activer une réponse cellulaire T. Un tel résultat suggérerait qu'il ne soit pas envisageable d'exprimer une minidystrophine qui possède les domaines correspondant aux régions délétées sur le gène *DMD* des patients. Ce qui voudrait dire que stratégie de transfert de micro/minidystrophine ne pourrait donc à priori pas être proposée à tous les patients DMD quelque soit leur mutation.

Cependant et de façon surprenante, des cellules T spécifiques de la dystrophine ont également été détecté chez certains des patients, avant même l'injection du vecteur AAVr2.5-minidystrophine. Ces cellules T ont été identifiées comme étant spécifiques des nouveaux épitopes créés par les fibres révertantes, naturellement présentes chez les patients DMD (Mendell 2010). Une étude plus récente réalisée chez 70 patients DMD a également montré que 28% des patients possèdent des cellules T anti-dystrophine, cette fréquence augmentant avec l'âge des patients et diminuant chez les patients traités par corticostéroïdes (Flanigan 2013). La fonction de ces cellules n'est aujourd'hui pas clairement établie. Elles pourraient en effet

aussi bien avoir un rôle tolérogène qu'un rôle délétère. Quoiqu'il en soit, ces premiers résultats chez l'homme mettent en avant la nécessité de précisément documenter les événements immunitaires lors de l'injection d'un AAVr-micro/minidystrophine chez les patients DMD. Ces prochaines années, l'avancée des connaissances sur la fonction des cellules T anti-dystrophine chez les patients DMD devrait pointer la nécessité, ou non, de tester cette immunité anti-dystrophine pré-existante pour la sélection des patients avant un essai clinique.

Après l'échec thérapeutique du premier essai AAV-minidystrophine, d'autres essais pré-cliniques ont été et sont encore aujourd'hui réalisés chez des modèles animaux, notamment chez les chiens *GRMD*. Selon les études, des protocoles d'immunosuppression doivent souvent être appliqués pour permettre une expression du transgène à long terme (Wang Z. 2007b, Shin 2012, Shin 2013). En parallèle des protocoles d'immunosuppression, les voies d'injection sont également optimisées : la voie intraveineuse locorégionale permet notamment une plus large transduction des muscles et est moins immunogène que la voie intramusculaire (Toromanoff 2008, Toromanoff 2010, Gernoux 2015 en préparation). À noter cependant qu'une injection systémique d'un AAV9-microdystrophine a tout de même provoqué une grosse réaction inflammatoire (défaut de croissance, contractures et atrophies musculaires) chez des chiots *GRMD* injectés à la naissance (Kornegay 2010). Dans ce cas, la nature du promoteur (CMV, ubiquitaire) et du transgène microdystrophine (séquence humaine) pourraient être mises en cause. En effet, l'utilisation d'un promoteur muscle spécifique et d'une microdystrophine canine permet, elle, une expression élevée et stable de la microdystrophine, sans réponse immunitaire, malgré une injection intramusculaire (Koo 2011b).

Récemment, une équipe a montré pour la première fois, chez un petit nombre de chiens immunosupprimés, la faisabilité d'une injection systémique d'un AAV9-microdystrophine à forte dose (1.9 à 6.2×10^{14} vg/kg). Chez ces chiens, aucun effet secondaire n'a été observé, le transgène étant retrouvé dans la plupart des muscles et organes et la protéine microdystrophine étant exprimée dans plus de 25% des fibres dans la majorité des muscles (Yue 2015). Aucune amélioration clinique n'est par contre documentée dans cette étude.

À l'UMR1089, en collaboration avec l'équipe de George Dickson (Royal Holloway, Londres) mais aussi les laboratoires Généthon (Evry) et Institut de Myologie (Paris) et dans l'optique d'un essai clinique proche, nous testons actuellement une construction AAV8-

microdystrophine (transgène « MD1 », sous le contrôle du promoteur synthétique muscle spécifique « Spc5.12 ») injectée chez des chiens *GRMD*. Les voies d'injection intraveineuse locorégionale (LR) et systémique (intraveineuse simple) ont été testées, en l'absence de toute immunosuppression. Après injection LR du vecteur à la dose de 1^{e13} vg/kg chez des chiens *GRMD* âgés de 3 mois, les résultats montrent, à 3 mois post-injection, une restauration de l'expression de la dystrophine dans plus de 50% des fibres dans le membre injecté. Cette expression est associée à une amélioration du profil pathologique musculaire local et de la force. Les résultats préliminaires de l'étude systémique, qui consiste en l'injection intraveineuse de 1^{e14} vg/kg du vecteur thérapeutique chez des chiens *GRMD* âgés de 2 mois, montrent une expression à long terme de la microdystrophine dans les muscles des chiens associée à une amélioration de la locomotion et du statut clinique des animaux, pendant au moins 2 ans post-injection (Le Guiner et al. en préparation).

Pour contrer la limitation de la taille d'encapsulation des vecteurs AAVr et donc pouvoir transférer des transgènes mini-dystrophines plus longs, voire le gène *DMD* en entier, des stratégies basées sur l'utilisation de plusieurs vecteurs AAVr, portant chacun une partie du transgène thérapeutique, ont été testées.

Dans une première approche, appelée « trans-épissage », un vecteur AAVr porte une partie du transgène, suivie d'un site donneur d'épissage et un autre vecteur AAVr porte l'autre partie du transgène, précédé d'un site accepteur d'épissage. Une fois dans les cellules cibles, la recombinaison intermoléculaire des génomes forme une jonction entre les ITR des 2 vecteurs AAVr. Cette jonction est ensuite exclue par la machinerie d'épissage, restaurant la séquence complète du transgène (figure 14A, Duan 2001, Lai 2005, Koo, 2013, Wang 2014).

Une autre approche est elle aussi basée sur l'utilisation de deux vecteurs AAVr mais la restauration du transgène se fait via une réaction de recombinaison entre des séquences homologues présentes dans les 2 génomes AAVr (Duan 2001, Wang D. 2014, figure 14B).

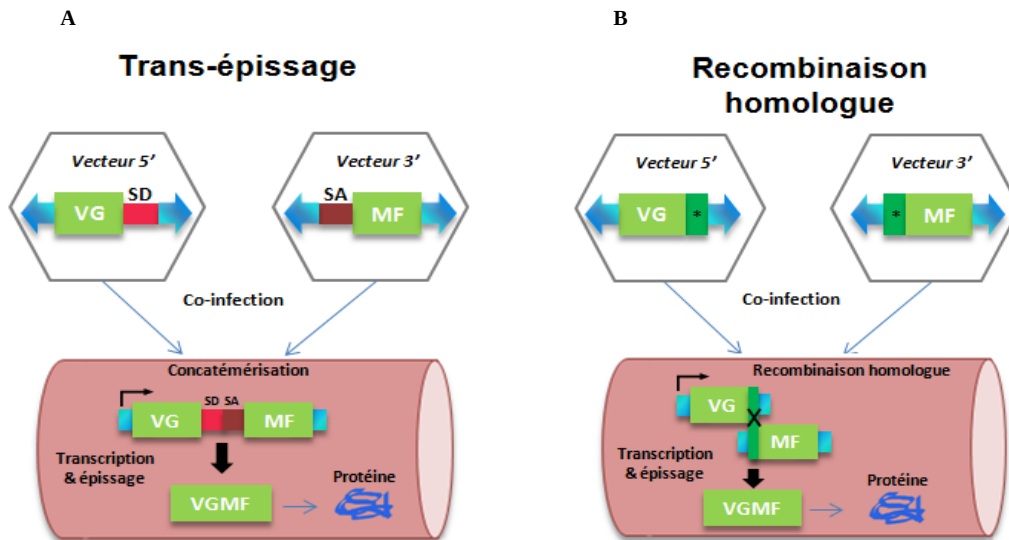


Figure 14: Les stratégies de transfert de gène par double vecteur AAVr. A: Le trans-épissage est une stratégie dans laquelle la cassette thérapeutique est divisée en deux, un site donneur d'épissage (SD) est ajouté au vecteur 5' et un site accepteur d'épissage (SA) est ajouté au vecteur 3'. Après co-transduction dans le muscle, les vecteurs se concatémérisent. Le transgène est transcrit et épissé pour générer une séquence complète du transgène thérapeutique. B: La stratégie de chevauchement ou recombinaison homologue nécessite une séquence chevauchante entre les deux vecteurs 5' et 3' (*). Après co-transduction dans le muscle, une recombinaison homologue entre les deux vecteurs intervient pour produire le transgène complet. VGMF : votre gène musculaire favori (adaptée de Rodino Klapac 2013).

Enfin, la technique du double vecteur hybride combine la recombinaison homologue et le trans-épissage et paraît plus efficace (Ghosh 2008). Cette stratégie a permis la restauration de la dystrophine complète dans le tibialis antérieur de souris *mdx*^{4cv} co-injectées avec 3 vecteurs AAVr portant 3 parties de l'ADNc *DMD* (Lostal 2014). Une limitation importante à cette approche est que le niveau d'expression de la dystrophine dans les muscles reste extrêmement faible, même après avoir augmenté la dose. Cela suggère que l'efficacité de transduction n'est pas suffisante pour avoir un impact sur le phénotype musculaire. Une optimisation de ces techniques innovantes paraît donc indispensable.

2) *Thérapie génique d'addition visant à réguler l'expression d'autres protéines que la dystrophine*

Bien que le transfert d'une mini/microdystrophine semble apporter des bénéfices musculaires dans les modèles murins ou canins de DMD, la dystrophine restaurée est tronquée et donc seulement partiellement fonctionnelle, ne pouvant restaurer qu'un phénotype BMD. Une approche alternative pour la correction de la pathologie DMD est d'essayer de palier le manque de dystrophine en modifiant l'expression d'autres protéines, liées à la dystrophine ou au complexe DAPC ou encore au fonctionnement musculaire. Parmi ces

stratégies de transfert de gène de substitution, nous nous focaliserons sur les approches dont le développement vers la clinique est le plus avancé.

a- Surexpression d'utrophine

L'utrophine est une protéine ubiquitaire, homologue de la dystrophine, localisée au niveau des jonctions neuromusculaires et myotendineuses du muscle adulte, et au niveau du sarcolemme dans les muscles fœtaux ou en régénération (Khurana 1991, Galvagni 2002). Localisé sur le chromosome 6, le gène de l'utrophine code une protéine de 395 kDa qui possède une composition en acides aminés et une structure très proche de celle de la dystrophine, suggérant un gène ancestral commun (80% d'homologie de séquence avec la dystrophine) (Tinsley 1992). L'utrophine possède les mêmes domaines de liaisons protéiques que la dystrophine, notamment à la F-actine (Rybakova 2005) et serait à l'origine de la mise en place du complexe DAPC dans les phases du développement précoce, avant l'apparition de la dystrophine (Lin et Burgunder 2000).

Etant donné ses caractéristiques, il a été envisagé que l'utrophine pourrait compenser en partie le rôle de la dystrophine en son absence. Cette hypothèse se justifie d'autant plus que *i)* l'utrophine est plus exprimée dans les muscles de patients atteints de myopathies (Karpati 1993, Blake 2002) et *ii)* le modèle murin double KO *mdx utrophine* est beaucoup plus sévère que le simple modèle *mdx* (Deconinck 1997, Chun 2012), ce qui suggère que l'absence de dystrophine est effectivement compensée par l'utrophine dans les modèles murins.

Les premières preuves de principe ont été menées chez des souris *mdx* transgéniques surexprimant une utrophine complète ou tronquée sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique. Chez ces souris, la surexpression d'utrophine empêche le développement du phénotype DMD, avec un rétablissement des fonctions musculaires (diminution du taux de CK et du nombre de noyaux centraux, amélioration de la force musculaire, restauration du complexe DAPC) (figure 15, Tinsley 1996, Tinsley 1998, Goudemant 1998). Des résultats similaires ont été observés lors de transferts du gène de l'utrophine médiés par des vecteurs Ad injectés par voie IM chez des souris *mdx* (Gilbert 1999), *mdx utrophine* (Wakefield 2000) ou chez le chien *CXMD_J* (Cerletti 2003). Bien qu'efficaces pour restaurer un phénotype normal, ces stratégies ne permettent qu'une faible diffusion du transgène dans les muscles et pas de correction du muscle cardiaque. Une micro-utrophine (utrophine tronquée dans la région en

bâtonnets) a également été injectée via un vecteur AAVr-6 chez des souris *mdx utrophine* et a montré les mêmes améliorations phénotypiques (Odom 2008).

Plusieurs études ont mis en évidence la supériorité des constructions mini-utrophine par rapport aux constructions minidystrophine pour restaurer les fonctions musculaires (Ebihara 2000, Lin A.Y. 2012). Le fait que l'utrophine soit ubiquitaire et déjà exprimée chez les patients DMD, et donc probablement moins immunogène que la dystrophine, pourrait également faire pencher la balance en faveur des constructions utrophine.

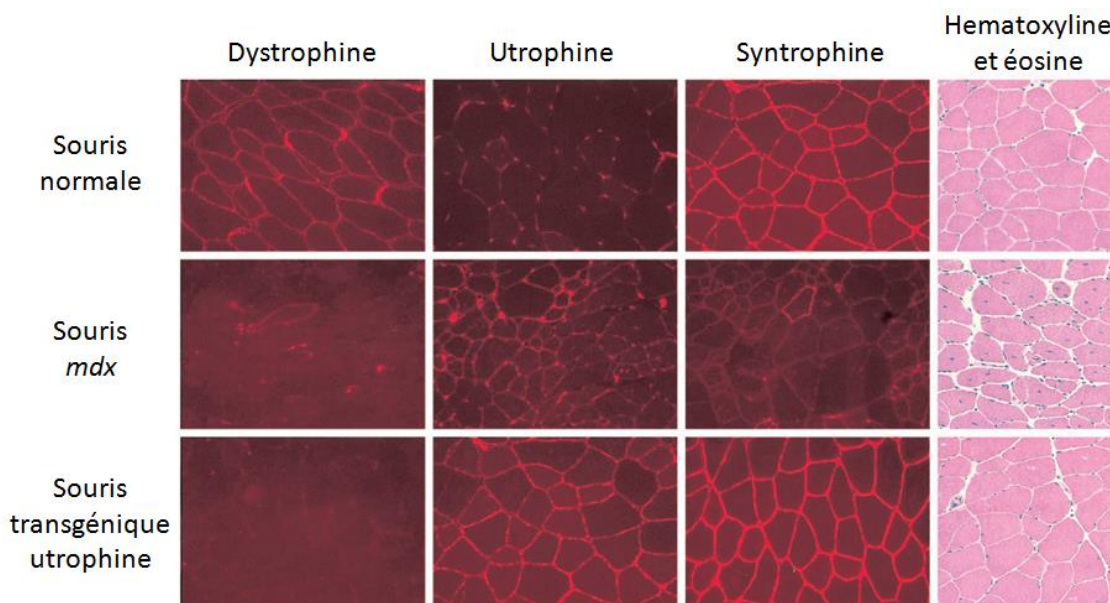


Figure 15 : La surexpression d'utrophine chez des souris *mdx* transgéniques induit la restauration du DAPC et améliore l'histologie des fibres musculaires. Des coupes de tibialis antérieur de souris saine, *mdx* et transgénique pour l'utrophine sont représentées. L'immunohistochimie a été réalisée avec des anticorps anti-dystrophine (1^{ère} colonne), anti-utrophine (2^{ème} colonne), anti- $\alpha 1$ syntrophine (3^{ème} colonne). L'histologie du muscle (4^{ème} colonne, coloration à l'hématoxyline et éosine) est quasi normale chez la souris transgénique utrophine (diminution du nombre de noyaux centraux) (tirée de Blake 2002).

Outre le transfert de gènes, la surexpression de l'utrophine peut également être provoquée en modulant la régulation de son promoteur par des agents pharmacologiques, comme nous l'avons évoqué dans le paragraphe A- 5).

Malgré ces stratégies prometteuses et accessibles à tous les patients quelque soit leur mutation, il n'est pas encore clair si l'utrophine pourrait totalement compenser le manque de dystrophine et restaurer complètement le phénotype DMD. L'utrophine ne permet pas, par exemple, la restauration de la fonction de nNOS, un facteur important de la physiopathologie de la DMD. Des études complémentaires seront donc nécessaires.

b- Inhibition de la myostatine

La myostatine est une protéine membre de la famille du TGF- β spécifiquement exprimée dans le muscle d'où elle est sécrétée. Elle régule négativement la croissance musculaire. Il a en effet été montré que l'inhibition ou des mutations dans le gène de la myostatine induisent une augmentation de la masse musculaire (par hypertrophie et hyperplasie des fibres musculaires) chez la souris (McPherron 1997), les bovins, notamment la race bleue belge (Grobet 1997) et l'Homme (Schuelke 2004). L'inhibition de la myostatine est aujourd'hui investiguée pour de nombreuses applications (cancer, diabète, obésité...) mais constitue également une approche intéressante pour l'amélioration des phénotypes DMD et BMD. La myostatine peut être inhibée par plusieurs voies incluant le blocage des signaux intracellulaires ou de l'activité extracellulaire de la protéine. Nous avons déjà évoqué précédemment l'inhibition par des approches pharmacologiques (anticorps anti-myostatine) qui permettent la restauration de la fonction et de l'histologie musculaire chez la souris *mdx* (Bogdanovitch 2002).

Des stratégies de thérapie génique sont également investiguées pour inhiber la myostatine de façon permanente ; il est par exemple possible d'induire un knock-down du gène de la myostatine par saut d'exon (Malerba 2012).

Comme tous les membres de la famille du TGF- β , la myostatine est produite sous forme d'un précurseur protéique clivé en deux parties : une partie C-terminale biologiquement active et une partie N-terminale qui correspond au propeptide MRPO et qui régule l'activité de la myostatine en la maintenant dans un état latent inactif (Lee 2004). Un vecteur AAV8r a été utilisé pour délivrer le propeptide MRPO de la myostatine, qui constitue un inhibiteur naturel, chez des souris *mdx*. Une augmentation de la masse des muscles a été observée en corrélation avec une amélioration de l'aspect des fibres musculaires (Foster 2009, Qiao 2008).

Un effet inhibiteur peut également survenir lorsque la myostatine circulante interagit avec des protéines telles que la follistatine. Il a été suggéré que la follistatine a un effet régulateur de la masse musculaire via son inhibition de la myostatine mais également via d'autres voies. Des souris issues d'un croisement entre une souris KO myostatine et une souris portant un transgène follistatine, ont en effet une masse musculaire 4 fois supérieure à la normale (contre 2 fois pour une simple inhibition de la myostatine) (Lee 2007). Avec cette idée, le groupe de Jerry Mendell et Brian Kaspar a développé une thérapie génique consistant

à administrer par voie IM un AAVr-1 portant un transgène follistatine (plus précisément une isoforme épissée alternativement et active exclusivement dans le muscle : FS344). Les études pré-cliniques chez la souris normale et *mdx* ont permis de démontrer l'efficacité de cette technique à renverser le phénotype DMD et augmenter la force musculaire même chez les souris âgées et cela sur le long terme (> 2 ans) (Haidet 2008). Puis, les études chez le primate non-humain ont confirmé l'augmentation durable de la taille et de la force des fibres musculaires sans effet indésirable (Kota 2009). Récemment, l'AAVr-1-FS344 a été injecté dans le quadriceps de 6 patients BMD à des doses de 3.10^{11} vg/kg/jambe (cohorte 1) et 6.10^{11} vg/kg/jambe (cohorte 2). Quatre patients ont augmenté la distance parcourue au test de marche de 6 minutes (6MWT : 6 minutes walk test) de 29 à 125 mètres, mais ces observations fonctionnelles ne sont pas en corrélation avec la dose injectée (Mendell 2015). Malgré tout, ces résultats encourageants sont accompagnés d'une amélioration histologique au niveau des biopsies musculaires (diminution de la fibrose endomysiale, réduction des noyaux centraux et meilleure homogénéité de la taille des fibres) et une absence d'effets indésirables.

E- Les stratégies de thérapie génique corrective pour le traitement de la DMD

Ces dernières années, la thérapie génique corrective, différente des thérapies géniques classiques d'addition basées sur le transfert du gène défectueux, s'est considérablement développée. Elle permet la correction du gène (ou de son transcrit) de façon ciblée et s'appuie sur des mécanismes moléculaires propres à la cellule pour corriger le défaut génétique en changeant la séquence ou en incluant / supprimant des parties du gène ou du transcrit. Ceci permet de conserver la régulation endogène du gène ou du transcrit ciblé, ce qui n'est pas le cas avec la thérapie génique d'addition.

1) Altération ciblée du gène DMD

Des stratégies permettent en effet de corriger le gène *DMD* endogène via la stimulation des mécanismes de réparation endogène des cellules, et cela sans interférer avec les éléments de régulations du gène. Certaines stratégies utilisent le principe de génération de cassures double brin (DSB : double strand break) de l'ADN à un endroit spécifique du gène *DMD* afin ensuite de réparer la mutation par les mécanismes de réparation des DSB, telles que la recombinaison homologue (RH) et la jonction non homologue des extrémités (NHEJ) (Longhese 2010, Jensen 2011). La RH nécessite la présence d'une séquence identique ou

pratiquement identique utilisée comme modèle pour la réparation du DSB. Le NHEJ réalise une « chirurgie du génome » en réassemblant les extrémités ADN coupées, ce qui rétablit un cadre de lecture mais introduit des indels (micro-insertions ou micro-délétions).

Les DSB peuvent être provoquées par différents types de nucléases. Dans une étude, les chercheurs ont utilisé une méganucléase (MN) capable de couper spécifiquement le gène *DMD* dans l'intron 44 de myoblastes de patients DMD portant une délétion $\Delta 45-52$. Le gène codant cette MN a été inséré dans un vecteur lentiviral (LV-MN). Un autre lentivecteur portant une séquence modèle pour la RH avec les exons 45 à 52 a également été utilisé. Après co-transduction des myoblastes DMD avec ces deux LV, un knock-in ciblé du gène *DMD* et une expression de son ARNm complet ont été observés (Poplewell 2013). Bien qu'efficace au niveau moléculaire, la fréquence de coupure par les MN est cependant trop faible (10%) pour restaurer l'expression de la protéine dystrophine. De plus, cette technique devra être testée *in vivo* par transplantation des myoblastes corrigées chez la souris *mdx* par exemple.

D'autres études ont montré également la faisabilité de réparation du gène *DMD* par NHEJ ou RH après une cassure induite par des nucléases plus récemment développés et plus efficaces que les MN, telles que les nucléases TALENs ou CRISPR/Cas9. Que ce soit dans des myoblastes de patients DMD (Ousterout 2013) ou des cellules iPS (induced pluripotent stem) (Li H.L 2015a), le cadre de lecture du gène *DMD* peut être restauré et permet la production d'une dystrophine quasi complète (ou complète dans le cas de RH).

Si elles sont séduisantes, les approches de correction ciblées du gène *DMD*, montrent encore une trop faible efficacité de correction pour envisager un transfert en essai clinique chez des patients DMD, que ce soit via une approche combinée de thérapie cellulaire (par correction des cellules avant transplantation) ou une approche de correction directe *in vivo*. Des études supplémentaires devront être menées pour améliorer cette efficacité, tout en limitant les risques importants de coupures off-targets (au niveau de sites non ciblés) par les nucléases.

2) Translecture des codons stop

Les mutations non-sens entraînant l'apparition de codons stop prématurés sur le gène de la dystrophine représentent environ 15 % des cas DMD (revoir figure 7). Une approche

moléculaire basée sur la translecture des mutations non-sens par le ribosome est aujourd'hui en passe d'être acceptée sur le marché.

Le principe est basé sur l'utilisation de molécules, et notamment d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides, qui ont la capacité de se fixer aux ribosomes et d'altérer leur reconnaissance, au niveau de l'ARNm, d'un codon/anticodon de terminaison illicite lié à une mutation non-sens. Cela permet finalement l'incorporation d'un acide aminé à la chaîne polypeptidique au niveau du site du codon muté, permettant à la traduction de se poursuivre (Palmer 1979, figure 16). La preuve de principe de cette approche pour le traitement de la DMD a été réalisée pour la première fois *in vivo* chez la souris *mdx* qui possède une mutation non sens dans l'exon 23. La gentamycine administrée aux souris par voie sous-cutanée a permis la restauration de la dystrophine complète localisée au sarcolemme dans 10 à 20 % des fibres musculaires (Barton-Davis 1999).

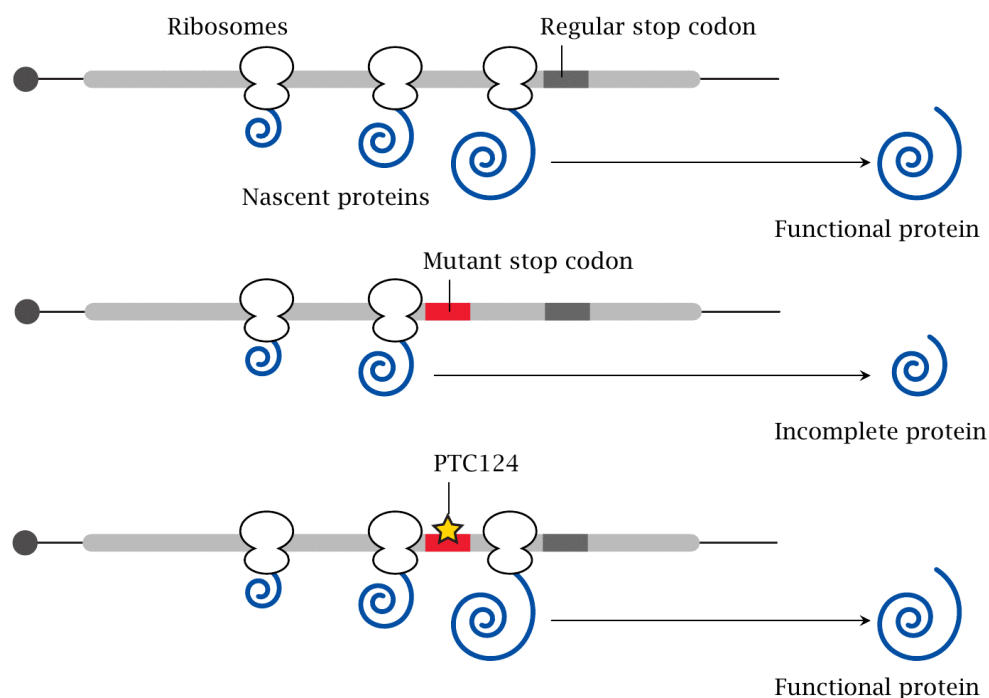


Figure 16 : Représentation schématique de la stratégie de correction génique par translecture de mutations non-sens. Le PTC 124 (Premature Terminaison Codon) est une molécule de translecture qui permet l'incorporation d'un acide aminé dans la chaîne polypeptidique au niveau du codon stop prématuré. Au lieu du désassemblage du complexe ribosomique, la traduction se poursuit pour obtenir une protéine fonctionnelle (©Michael Palmer).

Les essais cliniques avec la gentamycine qui ont suivi ont montré qu'il était possible d'induire une translecture des codons stop du gène *DMD* chez des patients avec une mutation non-sens (quelque soit la mutation). Cependant, la faible restauration de dystrophine dans les fibres musculaires (<20%) n'était pas accompagnée de bénéfices fonctionnels (diminution du taux

de CK uniquement) (Malik 2010). De plus, un traitement à base de gentamycine sur le long terme présente des risques de toxicité importants (néphrotoxicité, ototoxicité) et des inconvénients liés au fait de devoir réaliser des injections intraveineuses quotidiennes.

Le PTC124 (Premature Terminaison Codon, PTC Therapeutics) a été identifié par screening haut débit de petites molécules chimiques capables de restaurer l'expression d'un gène rapporteur portant une mutation non-sens. Il s'agit d'un composé ((3-[5-(2-fluorophenyl)-[1,2,4]oxadiazol-3-yl]-acide benzoïque ; $C_{15}H_9FN_2O_3$) administrable par voie orale, capable d'induire une translecture des codons stop prématurés mais pas des codons stops naturels, non toxique *in vivo*, et capable de restaurer la dystrophine et la fonction musculaire chez la souris *mdx* (Welch 2007). Même si son mécanisme d'action reste controversé (McElroy 2013, Ryan 2014), le PTC124 (ou Ataluren, ou Translarna[®]) a été testé en clinique chez des patients volontaires sains en phase I puis chez des patients DMD en phase IIa chez qui une augmentation de l'expression de dystrophine a été observée (Finkel 2013, Ryan 2014). Un essai de phase IIb multicentrique, randomisé et en double aveugle chez des patients atteints de dystrophinopathies (DMD et BMD) a ensuite été mené. Les patients ayant reçu une faible dose d'Ataluren (20mg/kg/jour pendant 48 jours) ont montré une amélioration significative de la distance parcourue au 6MWT, par rapport aux patients ayant reçu le placebo. De façon surprenante, les patients ayant reçu une plus forte dose (40mg/kg/jour pendant 48 jours) n'ont eux pas montré d'amélioration significative par rapport aux patients ayant reçu le placebo, suggérant que l'Ataluren aurait une courbe de dose-réponse inhabituelle (Bushby 2014). Suite à ces résultats, un essai de phase III, randomisé et en double aveugle, a été lancé chez 174 patients DMD pour tester un traitement d'Ataluren à la dose de 20mg/kg/jour. Les premiers résultats ont confirmé l'efficacité et l'innocuité de ce traitement. Une autorisation de mise sur le marché conditionnelle du Translarna[®] a été délivrée par l'Union Européenne en juillet 2014 pour le traitement des mutations non-sens chez les patients DMD ambulants âgés de 5 ans et plus. Celle-ci sera réévaluée au regard des résultats finaux d'efficacité et de sécurité de l'essai de phase III toujours en cours en France et dans d'autres pays européens (Ryan 2014).

3) *Le saut d'exon*

Une autre stratégie de correction au niveau de l'ARNm *DMD*, qui sera plus particulièrement développée dans ce manuscrit, est le saut d'exon. Comme pour le

développement des mini-gènes, l'utilisation du saut d'exon comme approche thérapeutique de la DMD est basée sur la « règle de Monaco » et plus particulièrement la présence de mutations ne respectant pas le cadre de lecture chez les patients BMD, mais permettant la production d'une protéine dystrophine tronquée mais fonctionnelle. Chez ces patients, un phénomène de saut d'exon naturel sur l'exon muté ou adjacent à la mutation permet en effet de restaurer le cadre de lecture et donc la production de dystrophine (figure 17).

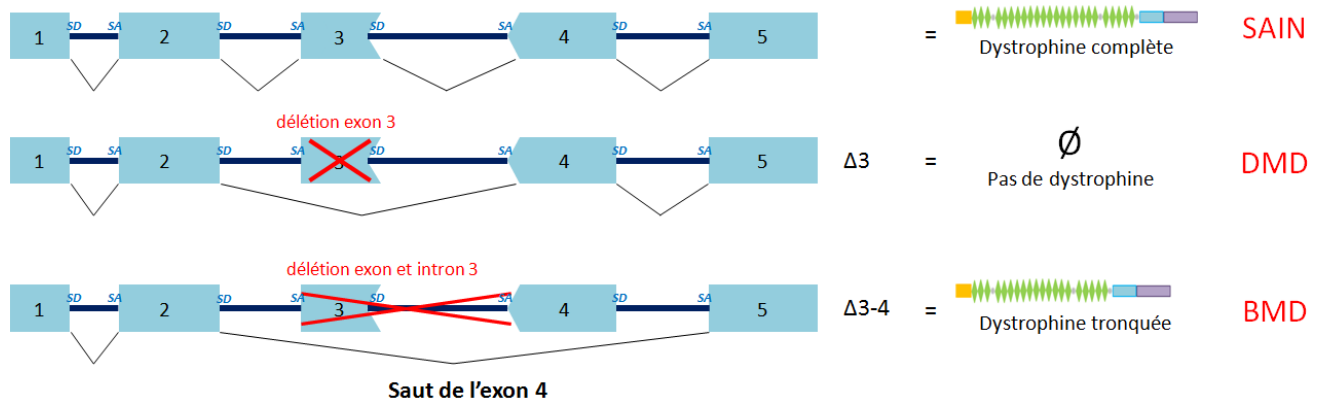


Figure 17 : Représentation schématique du saut d'exon naturel de l'ARN pré-messager *DMD* qui est une des situations permettant la traduction d'une protéine dystrophine tronquée mais fonctionnelle chez certains patients BMD. Chez les patients DMD de cet exemple, la délétion de l'exon 3 ne modifie pas l'épissage des exons 2 et 4 adjacents ce qui entraîne un cadre de lecture hors phase de l'ARNm, et l'absence de traduction de la dystrophine. Chez les patients BMD de cet exemple, la région délétée est plus grande (exon 3 + intron 3) mais inclut le site accepteur d'épissage (SA) de l'exon 4. Ainsi, l'épissage de l'exon 4 est perturbé et celui-ci n'est pas inclus dans l'ARNm mature (saut naturel de l'exon 4). Le cadre de lecture étant en phase, une protéine tronquée des régions correspondant aux exons 3 et est traduite. SD : site donneur d'épissage ; SA : site accepteur d'épissage.

Un saut d'exon « forcé » dans un but thérapeutique permet de passer outre une mutation décalant le cadre de lecture chez les patients DMD. Une dystrophine fonctionnelle mais plus courte (Δ 1 exon dans la plupart des cas) sera produite. Le principe est finalement le même qu'avec les mini-gènes *DMD* : passer d'un phénotype DMD à un phénotype BMD beaucoup moins sévère. A noter que dans la majorité des cas, la dystrophine tronquée par saut d'exon sera tout de même plus grande que les mini/microdystrophines pouvant être délivrées par des vecteurs viraux, notamment par des vecteurs AAV (<5kb). On imagine facilement que la préservation de plus de domaines protéiques dans la dystrophine pourrait permettre une meilleure préservation de sa fonctionnalité. Une étude a justement mis en évidence que les protéines dystrophine produites par saut d'exon (tronquées d'un ou deux exons) ont une stabilité équivalente à celle de la protéine entière de 427 kDa. La stabilité des

mini/microdystrophines est par contre beaucoup plus variable, en fonction des domaines tronqués dans la construction (McCourt 2015).

Le *Chapitre 3* qui suit est consacré plus spécifiquement à la thérapie de la DMD par saut d'exon. Le phénomène de saut d'exon correspond à une modification d'une réaction d'épissage au niveau d'un exon, le début du chapitre sera donc consacré à un rappel sur les mécanismes d'épissage des ARN messagers. Puis la fin du chapitre sera focalisée sur les différents outils utilisés aujourd'hui dans le cadre du saut d'exon pour la DMD.

CHAPITRE 3 :

Le saut d'exon comme thérapie de la dystrophie musculaire de Duchenne

A- Les mécanismes d'épissage des ARN pré-messagers

1) Le spliceosome

C'est en 1977 que les travaux de Richard Roberts et Phillip Sharp (Prix Nobel de médecine 1993) ont permis la mise en évidence de la structure introns/exons des gènes et de la réaction d'épissage, découvrant alors qu'un mécanisme biochimique permettait l'exclusion d'une partie du matériel génétique de l'ARN avant qu'il ne soit traduit en protéine. Le mécanisme d'épissage des ARN pré-messagers a une fonction fondamentale pour l'expression des gènes dans les cellules eucaryotes. Il consiste en l'excision des introns de l'ARN pré-messenger puis à la ligation des exons adjacents pour former un ARNm mature. C'est cet ARNm épissé qui correspond à la séquence codante du gène et qui est ensuite traduit en protéine. L'épissage doit intervenir de façon efficace et fidèle afin de préserver la connexion entre la séquence codante du gène et la protéine traduite. Une erreur d'épissage peut effectivement conduire à la production d'une protéine aberrante ou tronquée, comme c'est le cas quand un site d'épissage est muté chez les patients DMD (Ward et Cooper 2010).

La réaction d'épissage est menée par un complexe appelé spliceosome, qui fait partie d'une énorme machinerie macromoléculaire faisant intervenir des centaines de particules et caractérisée par un ensemble d'interactions ARN-ARN, ARN-protéine et protéine-protéine (Wahl 2009). Le spliceosome permet *i)* de reconnaître et d'interagir avec les séquences délimitant les exons et les introns, *ii)* d'ignorer les séquences introniques qui ressemblent à des exons (pseudo-exons) et *iii)* de relier entre eux les exons d'un même gène, dans le bon ordre et sans en omettre. Les séquences consensus permettant d'identifier les jonctions exons/introns sont aussi appelées séquences d'épissage et comprennent le site donneur d'épissage (site 5'), le point de branchement (BP), la séquence polypyrimidique (PPT) et le site accepteur d'épissage (site 3') (figure 18A).

La réaction d'épissage consiste en deux réactions de *trans*-estérification consécutives. Premièrement, le pont phosphodiester du site 5' est attaqué par la fonction 2'-hydroxyle d'une adénosine du BP, ce qui génère une structure en lasso de l'intron. Puis la fonction 3'-hydroxyle de l'exon libéré attaque la liaison phosphate du site 3' laissant libre la structure intronique en lasso et permettant la ligation des deux exons (figure 18B, Wahl 2009).

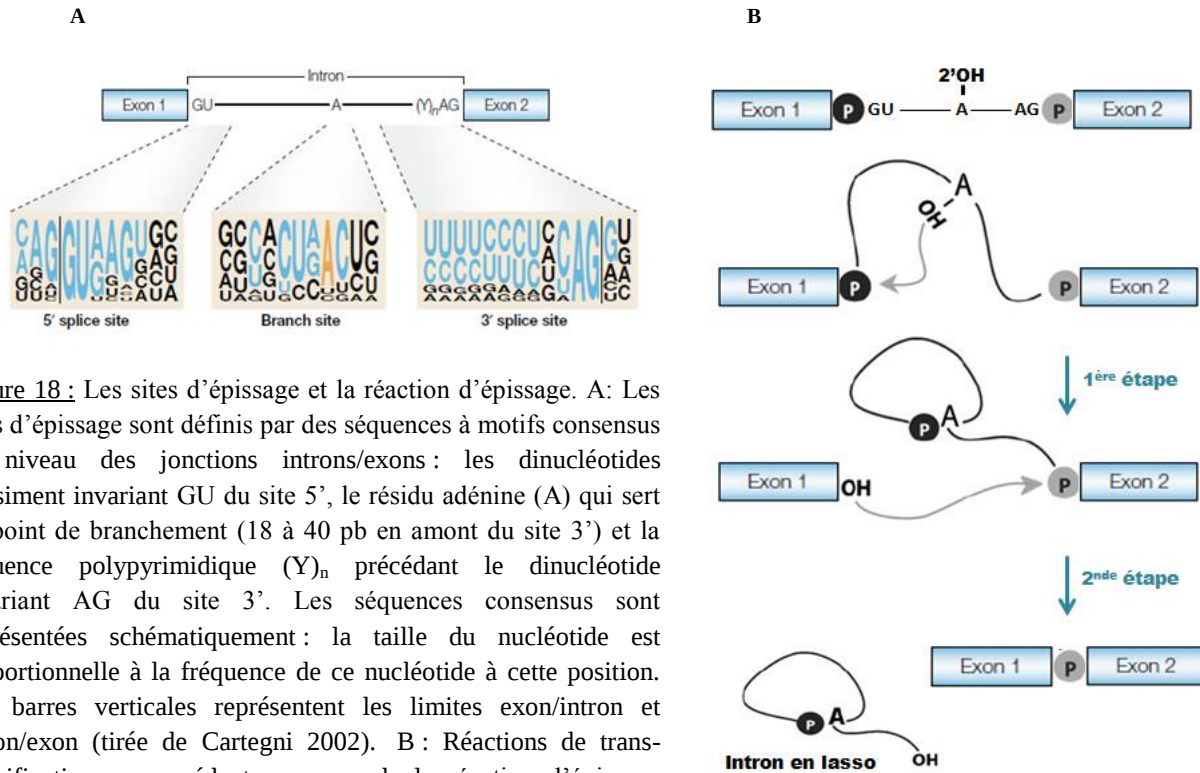


Figure 18 : Les sites d'épissage et la réaction d'épissage. A: Les sites d'épissage sont définis par des séquences à motifs consensus au niveau des jonctions introns/exons : les dinucléotides quasiment invariant GU du site 5', le résidu adénine (A) qui sert de point de branchement (18 à 40 pb en amont du site 3') et la séquence polypyrimidique (Y)_n précédant le dinucléotide invariant AG du site 3'. Les séquences consensus sont représentées schématiquement : la taille du nucléotide est proportionnelle à la fréquence de ce nucléotide à cette position. Les barres verticales représentent les limites exon/intron et intron/exon (tirée de Cartegni 2002). B : Réactions de trans-estérification se succédant au cours de la réaction d'épissage (adaptée de Turner 2004).

La reconnaissance et l'appariement corrects du spliceosome aux séquences d'épissage sont permis par 5 petites ribonucléoparticules, les UsnRNP (uridin rich small nuclear ribonnucleoparticles) : U1, U2, U4, U5 et U6 qui sont les composants essentiels du spliceosome. Chaque UsnRNP consiste en un petit ARN nucléaire, le UsnRNA et en un corps protéique formé de sept protéines Sm (B/B', D1, D2, D3, E, F et G) rassemblées en un anneau protéique au niveau du site Sm du snRNA. U6 est lui composé d'un corps protéique fait de protéines Sm-like : les Lsm 2 à 8 (Patel et Bellini 2008). En plus des protéines Sm, il existe une myriade d'autres protéines qui entourent spécifiquement chaque UsnRNP.

Le rôle des snRNA est de se lier spécifiquement aux sites d'épissage de l'ARN pré-messager par complémentarité de séquence et d'engager le complexe catalytique du spliceosome. L'assemblage du spliceosome a été principalement caractérisé par des systèmes *in vitro* et s'opère en plusieurs étapes alternant des associations/dissociations des snRNPs à l'ARN pré-messager ; des mécanismes pour la plupart ATP-dépendants.

- Le complexe E

Initialement, le U1snRNP se fixe au site donneur d'épissage par un appariement entre la région 5' de son snRNA et de la séquence consensus CAG/GURAGU de la jonction

exon/intron en 5' (site donneur d'épissage). En parallèle, la première phase de l'assemblage comprend la fixation des protéines SF1/BBP et U2AF (facteur auxiliaire de U2) respectivement au niveau du site BP et de la séquence PPT en aval du BP. U2AF est un hétérodimère constitué de deux sous-unités, l'une de 65kDa est liée à SF1/BBP et l'autre de 35kDa se lie au dinucléotide AG du site accepteur d'épissage en 3'. L'ensemble de ces facteurs, avec le U1snRNP, forme le complexe E qui joue un rôle crucial dans la reconnaissance des sites d'épissage délimitant un intron (figure 19, Wahl 2009, De Conti 2013).

- Le complexe A

Ensuite, le U2snRNP remplace SF1/BBP en interagissant avec le BP de l'ARN pré-messager, et forme le complexe A. Les liaisons ARN-ARN étant généralement assez faibles dans l'assemblage du spliceosome, le complexe A est stabilisé par les protéines SF3a et b et la sous unité de 65kDa de U2AF (figure 19, Wahl 2009)

- Les complexes B, B* et C

Le U5snRNP est ensuite recruté avec le di-usnRNP U4/U6 au niveau du site d'épissage 5' sous la forme d'un tri-snRNP pré-assemblé U4/U6.U5, afin d'empêcher la formation d'un noyau catalytique précoce (Turner 2004) : il s'agit du complexe B. L'activation du spliceosome nécessite en effet la déstabilisation et la libération de U1 et U4 ainsi que l'association du complexe PrP19/CDC5L impliqué dans l'ancrage du U6 au site 5' (à la place de U1) et le renforcement de la liaison de U5 à l'ARN pré-messager (figure 19). Le complexe B* ainsi formé permet de catalyser la première réaction de trans-estérification. Quelques réarrangements des snRNP sont encore nécessaires à la deuxième réaction de trans-estérification médiée par le complexe C. U5 est notamment responsable du rapprochement des sites d'épissage 5' et 3' de l'ARN pré-messager (Turner 2004). Enfin, le spliceosome se dissocie libérant un ARNm mature. Les composants U2, U5 et U6 sont, eux, prêts pour un autre cycle d'épissage (Wahl 2009, De Conti 2013) (figure 19).

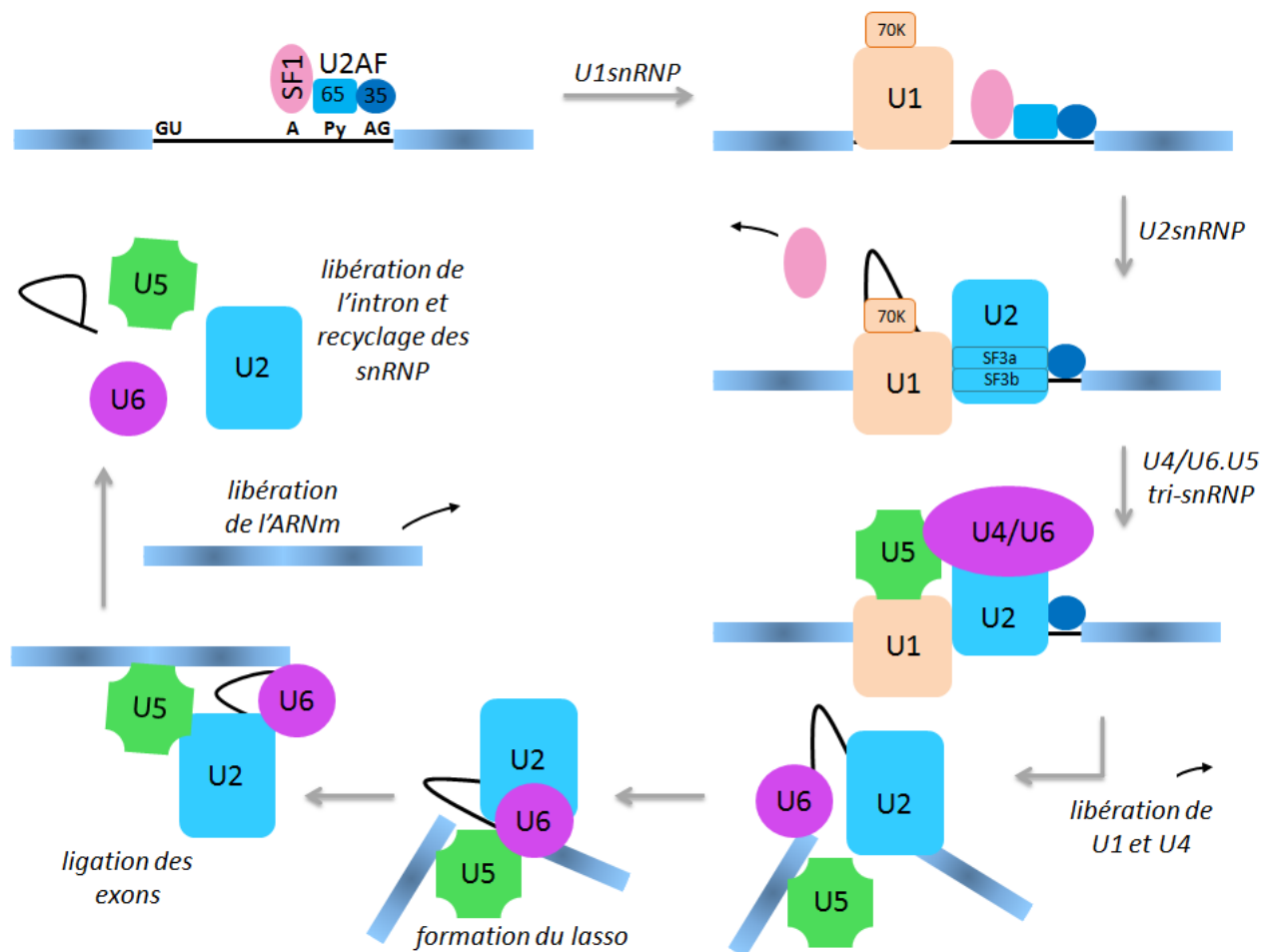


Figure 19 : Représentation schématique de l'assemblage des principaux composants du spliceosome au cours de la réaction d'épissage (adaptée de Rymond 2007).

Un ensemble de protéines associées aux snRNP ou non, est essentiel à la mise en place successive de ces différents complexes au sein du spliceosome. C'est une trentaine de protéines non-snRNP qui sont ainsi impliquées dans la transition du complexe A au complexe B, en complément du complexe PrP19/CDC5L et de ses protéines associées. Au niveau du complexe C, des hélicases ARN-dépendantes et des RNAPases de la famille DExD/H box (également ATP-dépendantes) ainsi que des isomérases sont nécessaires au remodelage des interactions du spliceosome notamment en facilitant les transitions des appariements ARN-UsnRNP. Un autre exemple est la protéine Prp8, associée aux U5snRNP qui régulerait des ATPases de la famille DExD/H box et qui pourrait être le site actif du spliceosome via son domaine catalytique RNase H (Turner 2004, Wahl 2009). D'autres étapes liées à l'expression des gènes dans la cellule se déroulent en parallèle de l'épissage des ARN pré-messagers et notamment la transcription du gène. Certains facteurs communs à ces deux mécanismes sont donc retrouvés associés au spliceosome (Pandya Jones 2011).

2) *Les éléments introniques et exoniques régulateurs de l'épissage*

Une des caractéristiques remarquables du spliceosome est sa capacité à reconnaître spécifiquement les sites d'épissages corrects parmi la multitude de séquences similaires sur l'ARN pré-messager. En effet de nombreuses séquences le long du transcrit sont similaires aux séquences consensus d'épissage des sites 5' et 3' (qui sont assez peu conservés) (Baralle 2005). Ces sites « candidats » sont pourtant rarement utilisés pour l'épissage ; ils définissent ce qu'on appelle des pseudo-exons qui ne sont quasiment jamais inclus dans l'ARNm mature (Sun et Chasin 2000). Les séquences consensus ne paraissent donc pas suffisantes pour que le spliceosome reconnaisse les jonctions exons/introns. En effet, la fidélité du spliceosome est optimisée grâce à la présence de séquences cis-actives qui favorisent ou inhibent la reconnaissance des sites d'épissage. Ces éléments régulateurs peuvent aussi bien être localisés dans les exons que dans les introns (dans une zone d'environ 50 nucléotides entourant les limites de l'exon (Zhang 2005)). Il s'agit des ESE/ISE (Exonic/Intronic Splicing Enhancer) et des ESS/ISS (Exonic/Intronic Splicing Silencers) (De Conti 2013).

a- Les enhancers d'épissage

La plupart des ESE ont été identifiés dans des exons tissu-spécifiques ou régulés en fonction du stade développemental avec des sites d'épissage faibles. Ils assistent généralement la formation des complexes précoces du spliceosome en interagissant avec les éléments du complexe E.

Cette stimulation est permise par des protéines de la famille des protéines riches en sérine-arginine (SR) qui se fixent spécifiquement aux ESE. Les protéines SR sont capables d'interagir avec l'ARN pré-messager via leur domaine RRM (RNA recognition motif) ou avec d'autres protéines via leur domaine RS (Blencowe 2000). Par exemple des protéines SR peuvent se fixer à une protéine liée à U1snRNP (U1-70kb) pour favoriser la liaison de U1 au site 5' ou encore se lier à U2AF pour ancrer la sous-unité U2AF-35kDa au site 3'. Ainsi, au sein du spliceosome, les protéines SR favorisent l'épissage d'un exon (c'est-à-dire son inclusion dans l'ARNm mature) en aidant à la reconnaissance des sites d'épissage et en formant des interactions entre les exons et les introns et/ou entre les enhancers et les sites d'épissages (figure 20, Liu 1998, De Conti 2013).

Une vingtaine de protéines SR sont aujourd'hui connues, et même si leurs fonctions peuvent être redondantes, elles reconnaissent toutes un motif consensus spécifique sur les ESE (Liu

1998). Ainsi, il est possible de prédire les sites de fixation de certaines protéines SR, notamment SF2/ASF, SC35, SRp40 et SRp55 et ainsi prédire *in silico* la localisation des ESE sur l'exon à l'aide d'outils informatiques (logiciel ESEFinder, Cartegni 2003).

D'autres éléments favorisant l'inclusion des exons dans l'ARNm mature sont situés dans les introns : les ISE. Ces séquences souvent riches en pyrimidines sont regroupées dans les 100 premiers nucléotides après le site 5' d'épissage (Venables 2007). Les protéines capables de se fixer et de gérer les effets enhancers des ISE sont beaucoup moins connues que les protéines SR des ESE mais elles fonctionnent sur le même principe, en recrutant divers facteurs d'épissage au niveau du site 5' principalement.

Certaines mutations introniques étant à l'origine de l'exclusion d'exons dans l'ARNm mature, l'étude spécifique de ces gènes mutés a permis de localiser les ISE et d'identifier les protéines s'y fixant. Par exemple la protéine TIA-1, une protéine importante des ISE, a été identifiée grâce à sa fixation sur un ISE entre +47 et 62 en aval de l'exon 9 du gène CFTR. L'exclusion de l'exon 9 du gène CFTR est en effet associée au développement de la mucoviscidose (Venables 2007).

b- Les inhibiteurs d'épissage

En parallèle, pour équilibrer les effets des enhancers, des inhibiteurs d'épissage favorisent l'exclusion des exons dans l'ARNm mature. La plupart de ces inhibiteurs caractérisés sont localisés dans les introns (ISS), mais d'autres se trouvent dans les exons (ESS). Ces séquences fonctionnent en interagissant avec des régulateurs négatifs appartenant aux protéines de la famille des hnRNP (ribonucléoprotéines nucléaires hétérogènes), et notamment les hnRNP-A1 à -U (Cartegni 2002). Les hnRNP-I, plus connues sous le nom de PTB (polypyrimidine tract binding protein), -A1 et -H sont les mieux caractérisées (Spellman et Smith 2006, Del Gatto-Konczak 1999, Fiset 2010).

Ces protéines possèdent des domaines RRM de liaison à l'ARN et se lient également entre elles via des domaines riches en glycine (GRD). Elles ont un rôle antagoniste à celui des protéines liées aux enhancers et empêcheraient la formation du spliceosome par encombrement stérique ou en générant des structures secondaires de l'ARN pré-messager non compatibles avec l'épissage (figure 20, De Conti 2013). La protéine PTB a par exemple un effet antagoniste de TIA-1. En effet, via son affinité pour la séquence PPT en amont du site 3'

d'épissage, PTB bloque l'accès à l'ARNm aux facteurs d'épissage et perturbe les interactions entre U1 et U2AF (d'habitude facilitées par TIA-1) (Spellman et Smith 2006).

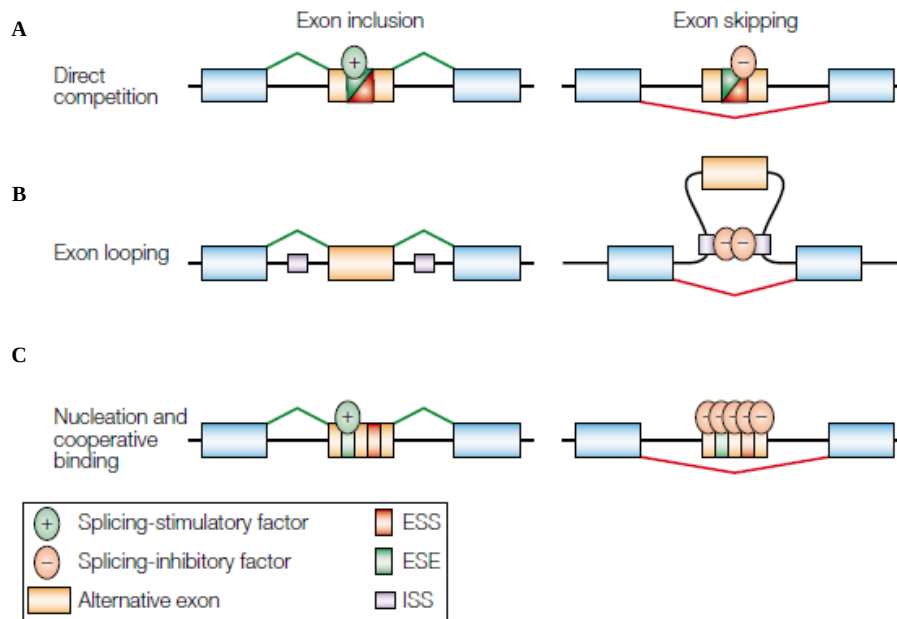


Figure 20 : Modèles de régulation de l'épissage. A: Inhibition de l'épissage par compétition directe entre les facteurs positifs (+, protéines SR) qui se lient aux ESE et les facteurs négatifs (-, hnRNP) qui se lient aux ESS. B: Inhibition de l'épissage par une boucle de l'exon lorsque des hnRNP se lient à deux ISS entourant l'exon. La dimérisation des hnRNP permet la juxtaposition des ISS et contraint l'exon à prendre une structure secondaire en boucle et à être exclu de l'ARNm. C: Inhibition de l'épissage par coopération de liaison. Un certain nombre d'éléments ESE et ESS sont présents sur l'exon à une certaine distance les uns des autres. En l'absence de facteurs négatifs, les ESS sont inoccupés et les protéines SR peuvent se fixer aux ESE pour favoriser l'inclusion de l'exon. En cas de liaison préalable d'une hnRNP à un ESS, d'autres protéines inhibitrices font se fixer à leur tour et empêchent la liaison des protéines SR aux ESE, favorisant l'exclusion de l'exon (tirée de Cartegni 2002).

Bien que l'épissage constitutif de chacun des exons d'un ARN pré-messager semble être lié à une balance de pouvoir entre les facteurs favorisant ou inhibant l'épissage, ces mécanismes sont en fait bien plus complexes. Les enhancers peuvent ainsi avoir des effets inhibiteurs sur l'épissage d'un ARN en favorisant l'épissage d'un autre exon par l'utilisation d'un site cryptique d'épissage qui, en compétition avec le « bon » exon, inhibe l'inclusion de ce dernier dans l'ARNm. L'inverse, avec les inhibiteurs qui favorisent l'épissage est également vrai (Venables 2007). De plus, puisque 80% des gènes sont transcrits et épissés de façon concomitante, la nature du promoteur, ainsi que les facteurs de transcription peuvent influencer l'épissage. L'épissage peut également être dépendant du statut chromatinien et/ou des modifications des histones autour du gène, ou encore de la structure secondaire de l'ARN pré-messager (De Conti 2013).

Il paraît donc difficile aujourd'hui de prévoir quels mécanismes d'épissage seront activés pour un gène donné, mais le développement de nouvelles techniques, telles que les puces ADN, les puces à exons et surtout le séquençage haut débit (RNAseq) permettent d'étudier l'épissage de façon globale et plus précise.

3) *L'épissage alternatif*

Les phénomènes d'épissages alternatifs compliquent davantage la compréhension des mécanismes à l'origine des ARNm matures mais sont également de formidables outils pour la diversification du transcriptome chez les mammifères. En effet la production de plusieurs ARNm à partir d'un même gène est possible par des épissages alternatifs. Chez l'Homme près de 90% des gènes codants subissent un épissage alternatif ce qui explique en partie la grande diversité du protéome humain alors que notre génome n'est constitué que d'environ 25 000 gènes.

L'ensemble des acteurs de l'épissage décrits précédemment, et plus particulièrement les régulateurs ESE, ISE, ESS et ISS, sont capables de moduler l'utilisation de certains exons qui sont alternativement épissés. L'épissage alternatif est en effet contrôlé spatialement et temporellement permettant une expression de nombreux variants dans différents tissus, dans différentes cellules au sein d'un tissu, ou encore dans le même tissu mais à différents stades de développement ou en réponse à un changement physiologique/pathologique. Il a en effet montré son importance dans de nombreux phénomènes biologiques et en particulier dans le renouvellement et la différenciation des cellules souches, dans la morphogénèse des organes et du système neural ainsi que dans la diversification et la spécialisation du système immunitaire (particulièrement les gènes du complexe majeur d'histocompatibilité) (Gamazon 2014). L'épissage alternatif est par exemple à l'origine de l'expression d'isoformes de composition et de fonction différentes de la protéine dystrophine (les nombreuses isoformes de Dp71).

L'exclusion ou l'inclusion d'un exon entier est l'évènement d'épissage alternatif le plus fréquent (environ 40%) mais un épissage alternatif peut également résulter de l'utilisation de sites d'épissage alternatifs, d'une rétention d'intron ou encore de l'exclusion mutuelle de 2 exons (figure 21, Gamazon 2014).

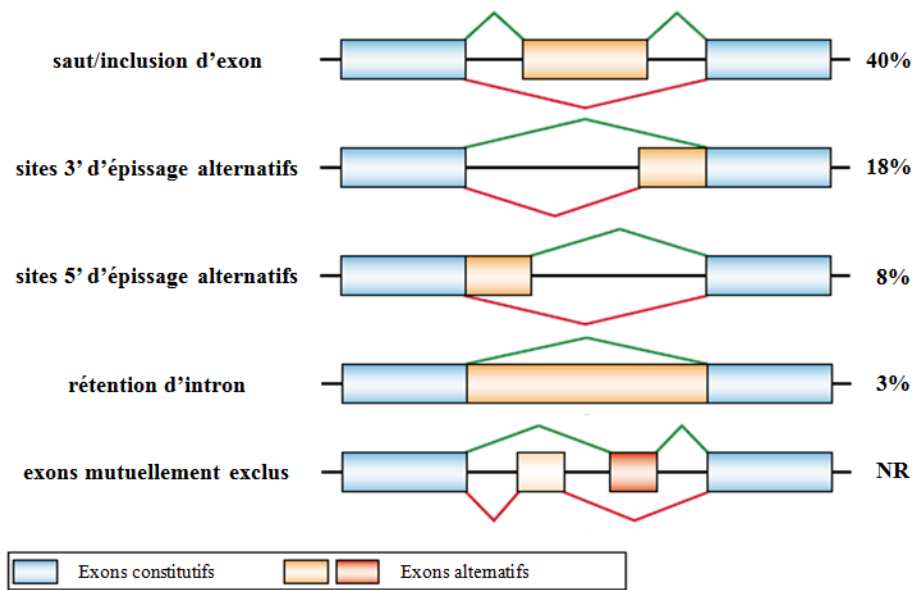


Figure 21 : Les cinq modes classiques d'épissage alternatif. Dans chaque cas, une voie d'épissage est représentée en vert, l'autre en rouge. Dans le cas de la rétention d'intron, il n'y a justement aucun épissage. Les chiffres indiquent le pourcentage auquel se produit chaque évènement d'épissage alternatif chez l'Homme (Gamazon 2014) et NR : non renseigné (adaptée de Cartegni 2002).

4) Les mutations perturbant l'épissage

Les modifications ou les défauts de régulation de l'épissage sont à l'origine de nombreuses maladies génétiques et de cancers. La dérégulation des épissages constitutifs et alternatifs peut être provoquée par des mutations *en cis*, ne touchant que le gène affecté ou bien par des mutations *en trans* affectant les composants du spliceosome (Ward et Cooper 2010). Dans le cas de mutations *en cis*, les sites d'épissage consensus sont très fréquemment la cible de mutations provoquant généralement le saut de l'exon adjacent. Seules ces mutations sont nommées mutations d'épissage. Pourtant d'autres mutations ponctuelles dans l'exon ou l'intron peuvent perturber l'ensemble du profil d'épissage du transcrit, notamment en mutant les éléments régulateurs, en créant des sites ectopiques d'épissage ou encore en activant des sites cryptiques d'épissage. Une mutation ponctuelle au niveau d'un exon, si elle est localisée dans un ESE peut en effet entraîner non pas une simple substitution d'une paire de base, mais la délétion d'un exon entier dans l'ARNm (Cartegni 2002).

Pour corriger ces défauts d'épissage de façon spécifique, une approche consiste à utiliser de courtes séquences ADN, des oligonucléotides antisens (AON), qui ciblent une région spécifique de l'ARN pré-messager, par exemple des sites d'épissage ou de régulation, pour favoriser l'inclusion ou le saut d'un exon (Kurreck 2003). Comme nous l'avons évoqué à

la fin du *Chapitre 2*, dans le cas de mutations sur le gène *DMD*, une modulation de l'épissage pour provoquer un saut d'exon et restaurer le cadre de lecture est une des approches de thérapie les plus développées à l'heure actuelle.

Le principe est basé sur l'utilisation de courtes séquences antisens, notamment des AON, pour masquer soit *i)* un (ou plusieurs) site(s) d'épissage (5', 3' ou BP), soit *ii)* un élément de régulation positive de l'épissage (ESE, ISE) sur l'ARN pré-messager. Sans la reconnaissance des séquences d'épissage par le spliceosome, l'exclusion de l'exon ciblé est favorisée. Contrairement aux stratégies de thérapie génique plus classiques, le saut d'exon utilise des mécanismes naturels de la cellule et va permettre de conserver les mécanismes de régulation endogènes du messager corrigé. Cela évite notamment une surexpression potentiellement nocive du transgène apporté lors d'une thérapie génique d'addition. De plus, la taille du gène *DMD* n'est alors plus un obstacle.

Les sous-parties qui suivent détaillent les outils de saut d'exon et les essais thérapeutiques menés chez l'animal et chez les patients *DMD*.

B- Utilisation des oligonucléotides antisens (AON) pour le saut d'exon de la DMD

1) L'outil AON

a- Les différentes générations d'AON

Un AON est un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) simple brin d'environ 15 à 25 nucléotides qui peut se lier spécifiquement à un ARN par une complémentarité standard des bases, telle que décrite par Watson et Crick. En fonction de leur séquence ou des modifications chimiques qui leur sont apportées, les AON peuvent modifier la fonction d'un ARN et donc l'expression du gène par divers mécanismes. Certains AON sont capables d'inhiber l'expression d'un gène via un clivage par la RNase H, d'autres empêchent sa traduction en protéine, et enfin les AON peuvent également être utilisés pour moduler l'épissage des ARN pré-messagers.

Les AON ADN sont en effet généralement utilisés pour induire un knock-down de l'expression d'un gène via un clivage de l'ARN par la RNase H qui reconnaît et clive spécifiquement les hétéroduplex ADN:ARN. Depuis la première utilisation d'un tel AON par Zamecnik et Stephenson en 1978 pour inhiber la réplication du virus du sarcome de Rous

(Zamecnik et Stephenson, 1978), de nets progrès ont été réalisés sur le développement et l'efficacité des AON, notamment par des modifications chimiques des ribonucléotides.

En effet, un AON non modifié injecté *in vivo* est rapidement attaqué par les endo- et exonucléases des fluides biologiques et passe difficilement les membranes plasmiques à cause de sa charge globale. Des modifications chimiques sont nécessaires pour augmenter sa résistance aux nucléases, prolonger sa demi-vie *in situ*, augmenter son efficacité et son affinité à la cible ARN et diminuer les effets toxiques non-dépendants de la séquence. Ainsi, 3 types de modifications chimiques peuvent être effectuées sur les AON: un changement des bases naturelles, une modification au niveau du sucre (principalement la position 2' du ribose) et/ou une altération des phosphates (figure 22).

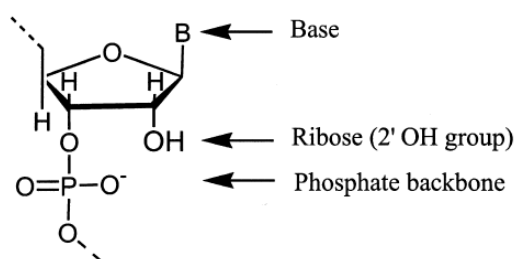


Figure 22 : Sites de modifications chimiques des ribonucléotides sur les AON. La base B peut être une adénine, cytosine, guanine ou thymine (tirée de Kurreck 2003).

La première génération d'AON est représentée par les oligodesoxynucléotides phosphorothioates (PS) dans lesquels un atome d'oxygène est remplacé par un soufre dans la liaison phosphate entre les nucléosides (figure 23). Pour diminuer les risques de toxicités dus aux PS et augmenter leur affinité à l'ARN cible, les AON de deuxième génération, représentés par les 2'-O-méthoxyl-ethyl (2'MOE) et les 2'-O-méthyl (OMe) ribonucléosides ont été générés (figure 23, Kurreck 2003, Chan 2006).

Pourtant, ces modifications alkyles en 2' du ribose ne permettent plus le clivage de l'ARN par la RnaseH (Zamaratski 2001). Ainsi, le knock-down des gènes via les AON se fait maintenant par des AON dits « gapmer » sur lesquels seuls les nucléotides des extrémités sont modifiés pour résister aux nucléases, un « cœur libre » de 10 nucléotides, nécessaire à la reconnaissance de la Rnase H, étant conservé (Kole 2012). Un 2'MOE gapmer, le mipomersen pour le traitement de l'hypercholestérolémie, a montré son efficacité en clinique (Raal 2010) et a été approuvé aux USA par la FDA (Food and Drug Administration) en 2013 (Kynamro™, Isis Pharmaceuticals & Genzyme).

En parallèle des AON gapmer, d'autres ont été spécifiquement développés pour justement ne pas activer la Rnase H et induire un blocage de l'ARN cible par encombrement stérique. La cible de l'AON sur l'ARN varie selon l'objectif souhaité. Ainsi lorsque le site d'initiation de la traduction, ATG, est ciblé, l'encombrement stérique sur l'ARN empêche la liaison des deux sous-unités du ribosome et inhibe la traduction protéique. Lorsque l'on souhaite moduler l'épissage d'un ARN pré-messager, les sites d'épissages sont ciblés et l'encombrement stérique empêche l'assemblage du spliceosome. Les Dr. Kole et Dominski ont été les pionniers de la modulation de l'épissage en 1993 puisqu'ils ont pour la première fois utilisé un AON 2'OMe ciblant un site cryptique d'épissage du pré-messager de la β -globine muté pour restaurer le l'épissage normal de l'ARN *in vitro* (Dominski et Kole 1993).

Les AON de troisième génération ont principalement été développés pour une approche de modulation de l'épissage par encombrement stérique. Ces AON comprennent des analogues ARN ou ADN avec des modifications au niveau du lien phosphate, du ribose ou encore des modifications chimiques au sein des bases nucléotidiques (anneau de furanose) (figure 23), améliorant davantage l'affinité à la cible ARN, la résistance aux nucléases et la pharmacocinétique (Kurreck 2003, Chan 2006).

Les chimies les plus utilisées pour le saut d'exon thérapeutique sont les AON 2'OMe (2^{ème} génération) et les AON LNA (locked nucleic acid) de 3^{ème} génération, chargés négativement ainsi que les AON PNA (peptide nucleic acid) et les PMO (phosphoroamidate morpholino oligomer) de 3^{ème} génération à charge neutre (Saleh 2012).

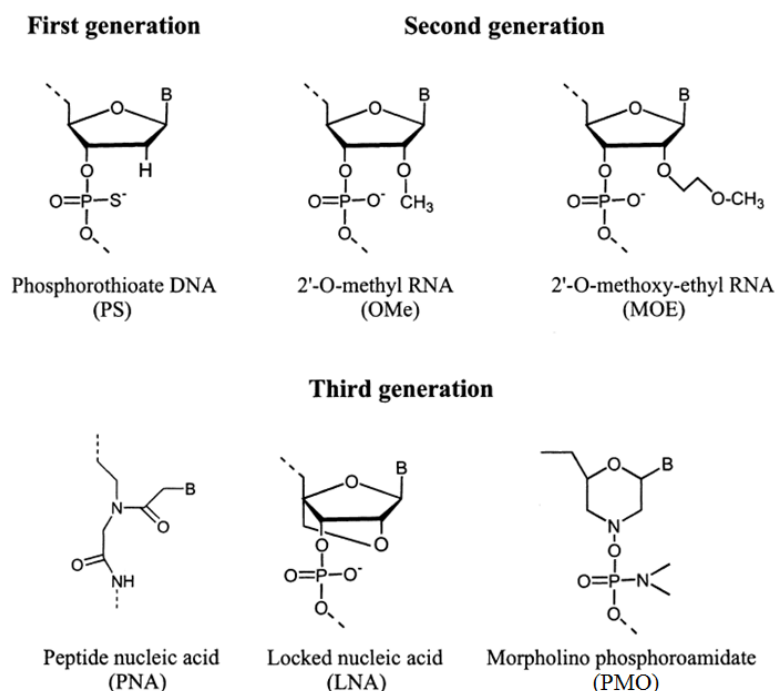


Figure 23: Représentations schématiques des principaux AON de première, deuxième et troisième génération. La base B peut être une adénine, cytosine, guanine ou thymine/uracile (adaptée de Kurreck 2003).

b- La conception des AON pour la modulation de l'épissage

Outre les modifications chimiques, plusieurs autres paramètres doivent être pris en compte pour la conception d'un AON. En effet, un des facteurs déterminant pour l'efficacité d'un AON est l'accessibilité de la cible : la structure secondaire de l'ARNm doit être compatible avec une hybridation de l'AON (Popplewell 2009, Aartsma Rus 2005). Plusieurs logiciels existent pour tenter de prédire *in silico* la structure secondaire de l'ARNm, parmi lesquels le serveur m-fold qui prédit toutes les structures optimales et sous-optimales que peut prendre un ARNm (Zuker 2003).

La stabilité thermodynamique de l'hybridation est également à prendre en considération. Il est décrit que la liaison AON/ARN doit au moins avoir une énergie de 8 kcal/mol alors que l'énergie de liaison d'un homoduplex AON/AON doit être plus élevée (≥ 11 kcal/mol) (Chan 2006, Aartsma Rus 2009). L'énergie de liaison dépend évidemment de la nature de la séquence de l'AON, de sa composition en bases GC et de sa taille. Même si la taille optimale d'un AON est de 20pb, il a été montré que certains AON étaient plus efficaces lorsqu'on augmentait la longueur (Harding 2006, Popplewell 2009). Un AON plus long permettrait également d'éviter les cibles off-target puisque sa séquence est alors statistiquement moins

représentée dans le génome. Une conception *in silico* précise des AON permet d'ailleurs d'éviter une homologie trop importante avec d'autres séquences ARN (voir *Chapitre 4*).

Le choix de la séquence cible est aussi un challenge important pour la conception d'AON modulant l'épissage, et dépend des objectifs thérapeutiques. Comme nous l'avons déjà évoqué, dans le cas de la DMD, la stratégie est de restaurer le cadre de lecture en provoquant un saut d'exon. Les sites d'épissages 5', 3' et le BP peuvent être ciblés : l'encombrement stérique provoqué par l'hybridation de l'AON empêche le spliceosome de s'assembler ; l'exon n'est pas reconnu et n'est pas incorporé à l'ARN pré-messager (figure 24 A). Les sites régulateurs, particulièrement les ESE peuvent aussi être ciblés. Dans ce cas, l'encombrement stérique de l'AON empêche les protéines SR de se fixer sur leur cible ESE. Sans intervention de l'enhancer d'épissage, il y a un saut de l'exon masqué par l'AON (figure 24 B). Les enhancers ciblés sont exclusivement des ESE car ils sont mieux caractérisés que les ISE et leur séquence peut être prédite *in silico* notamment avec le logiciel ESE Finder. Il est également possible de favoriser l'inclusion d'un exon en ciblant les inhibiteurs ESS ou ISS (figure 24 C).

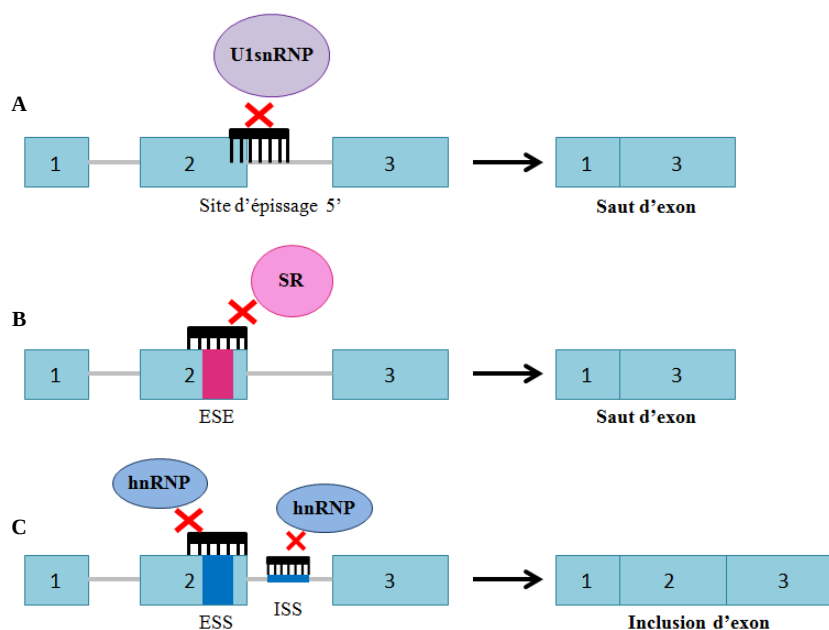


Figure 24 : Représentation schématique des approches thérapeutiques basées sur les modulations de l'épissage par les oligonucléotides antisens (AON). Les AON qui ne dégradent pas leur cible via la RNase H sont capables de moduler l'épissage en se liant aux sites d'épissage consensus (A), ou à des enhancers d'épissage (B) ou à des inhibiteurs d'épissage (C), afin d'abolir la régulation de l'épissage par les protéines correspondantes et aboutir à un saut ou à une inclusion d'exon (adaptée de Ward et Cooper 2010).

Cibler les ESE plutôt que les sites d'épissage avec un AON présente un certains nombres d'avantages. Le choix des cibles ESE est d'abord bien plus large puisqu'il existe une multitude de séquences exoniques différentes jouant le rôle d'enhancer d'épissage. Ensuite, contrairement aux sites d'épissage consensus, les sites ESE sont des séquences uniques, les AON sont donc souvent plus spécifiques. Des plus, les structures secondaires autour des ESE sont généralement ouvertes pour permettre la fixation des protéines SR ; l'hybridation de l'AON n'en est que facilitée (Aartsma Rus 2005). Enfin, il a été montré que même si certains AON ciblant les sites 5' et BP sont efficaces, les AON des ESE le sont davantage, et notamment pour le saut d'exon du gène *DMD* (Errington 2003, Aartsma Rus 2010). Les cibles privilégiées pour un AON semblent également être les ESE proches du site 3' d'épissage (à environ 70nt), et les sites de fixation des protéines SF2/ASF et SC35 (Aartsma Rus 2005, Popplewell 2009).

2) Les essais pré-cliniques *in vitro* et *in vivo* utilisant des AON

Si les pionniers de la modulation de l'épissage ont commencé par le gène de la β -globine, les essais sur le transcrit *DMD* ont très vite suivis puisque Pramono et ses collègues ont montré pour la première fois en 1996 la faisabilité du saut d'un exon sur le messenger dystrophine (exon 19) médié par un AON, cela dans des cellules lymphoblastoïdes humaines (Pramono 1996).

La souris *mdx* possède une mutation ponctuelle dans l'exon 23 du gène *DMD* qui provoque l'apparition d'un codon stop prématuré. Un saut forcé de l'exon 23 permet une restauration du cadre de lecture et la production d'une protéine tronquée (Wilton 1999). A la suite de ces observations, de nombreuses études avec des AON 2'OMe et des PMO ont été menées chez la souris *mdx* et ses homologues.

L'efficacité de saut d'exon sur l'ARNm issu du gène *DMD* par la stratégie antisens a en effet été rapidement démontrée *in vitro*, dans des cellules de patients DMD en culture (van Deutekom 2001, Takeshima 2001) ou des muscles isolés (Arechavala-Gomez 2007) et *in vivo* après injection IM chez la souris *mdx* (Mann 2001, Lu 2003). Par la suite, des AON 2'OMe ou PMO spécifiques de l'exon 23 ont été injectés par voie systémique intraveineuse chez la souris *mdx* (Lu 2005, Alter 2006) permettant la génération d'un ARNm tronqué mais en phase (dans lequel il manque l'exon 23) et la restauration de la protéine dystrophine dans tous les muscles.

De plus, le nombre de fibres positives et le niveau d'expression de dystrophine peuvent être augmentés en injectant plusieurs doses hebdomadaires d'AON. Après 7 injections hebdomadaires successives de PMO-ex23, la dystrophine corrigée est exprimée jusque dans 70% des fibres, en corrélation avec une meilleure distribution spatiale des fibres positives et une meilleure homogénéité de l'intensité d'expression (Alter 2006). Aucun effet toxique, ni problème immunologique n'ont été observés dans ces premières études. Par contre, aucune expression de dystrophine n'a été détectée dans le muscle cardiaque avec l'un ou l'autre des AON (Lu 2005, Alter 2006), même si les PMO semblent un peu plus efficaces que les AON 2'OMe chez la souris (Heemskerk 2009).

Les PMO sont également efficaces chez le chien *CXMD_J* (Yokota 2009). Chez les chiens, une mutation dans l'intron 6 décale le cadre de lecture par délétion de l'exon 7. Cette mutation peut être corrigée par un double saut d'exon (exons 6 et 8). Dans cette étude, bien que le nombre d'animaux soit faible et que les fréquences d'injections (et les doses) soient variables, il a été montré que des injections intraveineuses systémiques d'un cocktail de PMO-ex6 et PMO-ex8 permet une restauration de l'expression de la dystrophine (en moyenne à 26% du niveau normal) chez le chien *CXMD_J*. Comme chez la souris, les niveaux d'expression de dystrophine sont extrêmement variables entre les muscles et la restauration dans le cœur est très faible. Pourtant, le niveau de restauration de dystrophine est suffisant pour observer des améliorations cliniques : une diminution des signaux inflammatoires (histologie et IRM) et une meilleure rapidité pour une course de 15m chez les 3 chiens traités (Yokota 2009).

3) Les essais cliniques utilisant des AON

Chez l'Homme, même si la stratégie de saut d'exon peut en théorie être applicable chez 85% des patients, il s'agit d'une thérapie « à la carte » dans la mesure où les AON doivent être conçus en fonction de la mutation du patient. Le fait que les mutations sur le gène *DMD* soient généralement situées dans des « hotspots » rend malgré tout le saut d'un seul exon applicable à un grand nombre de patients (Tableau 1, Aartsma Rus 2009). Ainsi le saut des exons 51 et 53 pourraient bénéficier aux plus grands groupes de patients (environ 13% et 8% respectivement, selon la base de données de patients DMD de Leiden).

Tableau 1 : Applicabilité du saut d'exon chez les patients DMD selon la nature de leur mutation génétique (tiré de Koo 2013).

<i>Exon to skip</i>	<i>Therapeutic for DMD deletions (exons)^a</i>	<i>Applicability (%)</i>
2	3–7	1.9
8	3–7, 4–7, 5–7, 6–7	2.3
43	44, 44–47	3.8
44	35–43, 45, 45–54	6.2
45	18–44, 44, 46–47, 46–48, 46–49, 46–51, 46–53	8.1
46	45	4.3
50	51, 51–55	4.0
51	50, 45–50, 48–50, 49–50, 52, 52–63	13.0
52	51, 53, 53–55	4.1
53	45–52, 48–52, 49–52, 50–52, 52	7.7

^aDMD deletions were reported in the Leiden DMD mutation database (www.dmd.nl/) (van Deutekom *et al.*, 2001; Aartsma-Rus *et al.*, 2009).

DMD, Duchenne muscular dystrophy.

Des AON 2'OMe et PMO conçus pour le saut de l'exon 51 du gène *DMD* humain ont été testés chez des patients DMD dans le cadre de deux essais cliniques de phase I/IIa dont le principal objectif était d'évaluer la sûreté de l'approche. L'injection des AON 2'OMe (PRO-051) (van Deutekom 2007) et des PMO (AVI-4658) (Kinali 2009) par voie IM n'a montré aucun effet secondaire clinique sévère et le saut de l'exon 51 a été efficace, au niveau local, pour restaurer le cadre de lecture et l'expression de dystrophine (jusqu'à 20% du niveau normal) chez tous les patients.

Ces deux types AON ont ensuite été testés par voie systémique dans de nouveaux essais cliniques de phase I/II (Goemans 2011, Cirak 2011).

L'AON 2'OMe PRO-051 a été administré à 12 patients DMD par des injections hebdomadaires sous cutanées (dans l'abdomen) pendant 5 semaines à des doses variant de 0.5 à 6 mg/kg. L'analyse des biopsies musculaires a montré la présence de dystrophine chez 10 patients dans plus de 50% des fibres musculaires mais à une intensité correspondant en moyenne à 15.6% du niveau normal. L'absence de biopsies musculaires pré-injection complique par contre l'interprétation de ces données. Dans une extension de l'étude, 10 patients ont reçu la dose maximale de 6 mg/kg pendant 12 semaines. Les améliorations cliniques ont été mesurées par le 6MWT. Une très légère amélioration de la distance parcourue sur 6 minutes par rapport aux données avant traitement (moyenne de + 35.2 mètres, +/- 28.7 mètres) a été observée chez les patients traités (Goemans 2011).

Le PMO AVI-4658 a quant à lui été administré à 19 patients DMD par voie intraveineuse une fois par semaine à des doses allant de 0.5 à 20 mg/kg pendant 12 semaines.

Une restauration significative de l'expression de dystrophine (intensité variant de 8.9 à 16.4% du niveau normal) a été observée de façon dose dépendante. Chez un patient (traité avec la dose maximale), jusqu'à 55% de fibres dystrophine positives ont pu être observées. Une diminution des infiltrats inflammatoires musculaires a également été relevée, pourtant, aucune amélioration notable n'a pu être observée au 6MWT (Cirak 2011).

Ces deux essais thérapeutiques ont également mis en évidence une différence de toxicité entre les AON 2'OMe et les PMO. Alors qu'aucun effet secondaire n'a été relié à l'administration de PMO, des cas de protéinurie et des douleurs / inflammations au niveau du site d'injection sous-cutanée ont été relevés chez les patients ayant reçu les AON 2'OMe. Malgré la sévérité modérée de ces effets secondaires, il semble que la dose de 6mg/kg de 2'OMe ne puisse pas être augmentée, au risque d'augmenter ces effets secondaires indésirables. Au contraire, il a été montré chez des modèles animaux que les doses de PMO pouvaient être encore augmentées sans effet toxique. Avec leur charge neutre, les PMO s'accrochent moins aux protéines plasmatiques, ce qui permettrait une élimination par les urines plus rapide et donc moins de risque d'accumulation dans les reins ou le foie (Koo 2013, Hoffman et McNally 2014, Kole 2015).

Un essai clinique de phase III pour l'AON 2'OMe PRO-051 (alors baptisé Drisapersen®) a ensuite été lancé. 186 patients DMD ont été inclus dans cet essai randomisé et réalisé en double aveugle avec injection sous-cutanée de 6mg/kg par semaine de Drisapersen® ou de placebo, pendant 48 semaines. Malheureusement, cet essai n'a pas réussi à montrer d'efficacité significative du traitement (Kole 2015). Par contre, dans le cadre du programme de développement clinique du Drisapersen®, un autre essai de phase IIb avait été lancé en parallèle sur des patients à un stade moins avancé de la maladie. Cette fois, les résultats ont montré de meilleures données dans le groupe de patients traités que dans le groupe placebo, notamment au 6MWT (Voit 2014). Une analyse rétrospective de l'histoire naturelle des patients inclus dans ces différents essais explique ces résultats contradictoires. En effet, il a pu être montré que les patients étant capables, au début d'une étude, de parcourir une distance de moins de 350m au 6MWT, déclinent plus vite que ceux étant capables de parcourir plus de 350m (McDonald 2013, Goemans 2013). Ces données expliquent pourquoi l'essai de phase III n'a pas permis de montrer de différence significative entre les groupes traités et placebo. L'ensemble des données obtenues dans les essais de phase IIb menés en parallèle suggèrent clairement aujourd'hui un effet thérapeutique potentiel du Drisapersen®, effet qui s'avère être meilleur quand le traitement est débuté à un jeune âge. Aujourd'hui, avec l'ensemble des

résultats obtenus chez près de 300 patients DMD, avec un recul de plus de 3 ans, des dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché du Drisapersen® ont été déposés et validés par l'EMA et la FDA outre-Atlantique. Les décisions finales de ces agences devraient être connues courant 2016 (biomarin.com).

Le PMO AVI46-58 (également appelé désormais Eteplirsen®) a lui été testé en phase IIb par voie intraveineuse systémique à des doses plus importantes de 30 ou 50 mg/kg chez 12 patients pendant 24 ou 48 semaines (Mendell 2013). Un groupe contrôle a reçu un traitement placebo pendant 24 semaines puis 30 ou 50 mg/kg de PMO. Près de 50% de fibres positives pour la dystrophine ont été détectées chez les patients traités pendant 48 semaines et une amélioration de 67.3 mètres en moyenne au 6MWT a été notée par rapport au groupe placebo. Aujourd'hui, avec un recul du suivi des patients sur plus de 2.5 ans, il est possible de confirmer l'absence de toxicité de l'Eteplirsen® après de multiples injections et un net changement du déclin naturel et de la perte de la marche chez les patients traités (Jerry Mendell, ASGCT 2015 + WMS 2015), même si le faible nombre de patients inclus dans cet essai limite la robustesse de ces conclusions. En novembre 2014, un essai de phase III sur 60 à 80 patients a été lancé et la demande d'autorisation de mise sur le marché par la FDA est actuellement en cours (sarepta.com). En parallèle, un autre essai de phase I/IIa est prévu pour le saut de l'exon 53 de la *DMD* avec un PMO (Muntoni 2015).

Malgré l'évolution de ces essais vers de probables autorisations de mise sur le marché, les résultats ont toutefois mis en évidence la nécessité d'améliorer la conception des essais cliniques chez les patients DMD. Ils pointent la nécessité de connaître l'histoire naturelle de l'évolution de la maladie chez les patients inclus dans les essais. De même, la quantification de l'expression de dystrophine comme bio-marqueur n'est en effet pas encore bien établie dans la mesure où les biopsies musculaires ne sont pas toujours représentatives de l'impact du traitement au niveau d'un organisme entier, et que l'on ignore encore quel niveau de restauration est suffisant pour être associé à un bénéfice clinique. De plus, si les attentes du traitement sont un ralentissement de la progression de la maladie (et non pas un arrêt de cette progression), alors le 6MWT n'est pas forcément le test adéquat puisqu'il devient non réalisable lorsque l'enfant perd totalement la capacité de marcher. Actuellement, de nombreuses équipes travaillent au développement de tests phénotypiques sensibles et robustes, qui permettront à terme de réaliser les évaluations des traitements à venir, quelque soit le statut clinique des patients (Hoffman et McNally 2014, Merlini 2015).

Malgré les potentielles autorisations de mise sur le marché du Drisapersen® et de l'Eteplirsén® il est probable que les améliorations cliniques apportées par ces deux produits thérapeutiques ne seront que partielles. Il paraît donc clair qu'un certain nombre d'optimisations du saut d'exon par les AON sont également à prévoir.

4) *Les méthodes d'optimisation*

Les enjeux pour continuer le développement des AON pour le saut d'exon consistent à *i)* permettre un ciblage des muscles plus large et plus efficace, notamment dans le cœur, *ii)* définir une dose thérapeutique optimale pour un effet à long terme sans toxicité et *iii)* développer le multi-saut d'exon pour que cette thérapie soit applicable à un plus grand nombre de patients DMD.

Puisque la grande majorité des patients DMD souffrent d'insuffisances cardiaques à l'origine de décès prématurés, il est nécessaire d'améliorer l'assimilation des AON afin d'atteindre le cœur, tout en augmentant leur efficacité au niveau des muscles squelettiques. Pour cela, il est possible d'utiliser de courts peptides, chargés positivement appelés peptides de pénétration cellulaire (CPP, cell-penetrating peptides) liés de façon covalente aux AON, comme transporteur non viral. En effet, un complexe cationique CPP-AON permettrait une meilleure affinité de liaison aux protéoglycanes anioniques de la surface cellulaire et favoriserait l'internalisation de l'AON. Sachant que la synthèse chimique des CPP aux AON chargés est complexe, la plupart des approches se sont développées autour des PMO (charge neutre), notamment pour la DMD en utilisant alors des PPMO (peptide-conjugated PMO) (Boisguérin 2015, Yin 2008, Wu 2008).

Plus récemment, les peptides de type « Pip » (PMO-internalization peptides) ont été développés. Ils sont caractérisés par un domaine central hydrophobe entouré de deux domaines riches en arginine. Ces Pip-PMO (Pip5-Pip6) peuvent induire chez la souris *mdx* un très haut niveau de saut d'exon et de restauration de la dystrophine dans l'ensemble des muscles et dans le cœur, après une unique administration intraveineuse à 25mg/kg (Yin 2011, Betts 2012). Le saut d'exon du transcrit *DMD* provoqué par ces Pip-PMO est cinq fois plus efficace qu'avec les PPMO et permet une restauration de 50% du niveau d'expression normal de la dystrophine dans le cœur. Les CPP ont démontré dans les modèles pré-cliniques leur

grand potentiel à favoriser le saut d'exon médié par les AON, mais leur innocuité doit être davantage évaluée avant d'envisager un transfert en essai clinique (Koo 2013, Boisguérin 2015).

D'autres outils permettent d'améliorer l'efficacité de saut d'exon et de distribution des AON, notamment en les protégeant de la dégradation. Ces nanoparticules (NP) sont composées de lipides et/ou de polyéthylène glycol et parfois combinées aux CPP. La NP au cœur cationique, appelée ZM2 a montré une certaine efficacité à restaurer la dystrophine dans 40% des fibres musculaires et son activité résiduelle peut être détectée jusqu'à 90 jours après administration (Ferlini 2010, Bassi 2012). D'autres stratégies visent à améliorer l'efficacité des AON en modulant leur transport intracellulaire et leur éviction des endosomes à l'aide de petits composés chimiques co-administrés avec l'AON (Yang 2015). D'autres composés chimiques, tels que le dantrolène ou le 6-thioguanine, identifiés par criblage à haut débit, peuvent aussi agir directement sur le mécanisme de saut d'exon pour le favoriser et ainsi augmenter la restauration de l'expression de dystrophine (Kendall 2012, Verhaart 2013).

Enfin, afin d'étendre cette « thérapie à la carte » à plus de patients, le multi-saut d'exon, qui consiste à provoquer le saut de plusieurs exons au niveau d'un hotspot de mutations, notamment au niveau des exons 45 à 55 (Aoki 2013), est en cours de développement. Si le double saut d'exon est efficace chez le chien (exons 6 et 8) et sur des myoblastes de patients *in vitro* (Yokota 2012, Aartsma Rus 2004), le multi saut d'exon est plus compliqué à mettre en place puisqu'il fait appel à un cocktail complexe de plusieurs AON. Récemment, la faisabilité d'un saut des exons 45 à 55 a tout de même été montrée chez la souris *mdx52* (Aoki 2012). Un cocktail de 10 PMO, minutieusement choisis, a été injecté par voie systémique et a permis la restauration de l'expression d'une dystrophine tronquée Δ 45-55 (5 à 27% du niveau normal de dystrophine) et du DAPC au sarcolemme. L'administration de ce cocktail de 10 PMO n'est associée à aucune toxicité chez la souris *mdx52*, même après de multiples injections systémiques (Echigoya 2015) et pourrait être bénéfique à 63% des patients DMD (Bérout 2007). L'efficacité de ces multiples sauts d'exons reste pour le moment encore trop faible pour être transféré en essai clinique. De plus, l'utilisation de tels cocktails de PMO doit faire l'objet de tests complets de toxicité.

Afin de diminuer la toxicité due aux injections multiples d'AON, une alternative est de produire les séquences antisens de façon stable afin que la dystrophine soit restaurée sur le long terme sans nécessité de réinjections périodiques. Il est en effet possible de vectoriser la séquence antisens dans un petit ARN de type UsnRNA qui a été modifié pour corriger les

mutations d'épissage. Daniel Schümperli et ses collaborateurs ont été les premiers à décrire le système de vectorisation d'une séquence antisens dans un U7snRNA pour restaurer le cadre de lecture du gène de la β globine (Gorman 1998).

C- Le U7snRNA comme vecteur de séquences antisens

1) Le U7snRNA WT

Comme nous l'avons précédemment évoqué, les UsnRNA sont une famille de petits ARN non codants, métaboliquement stables, non polyadénylés et localisés dans le noyau des cellules. Il existe une quinzaine de UsnRNA caractérisés chez les eucaryotes qui sont tous entourés d'un *core* heptamérique de protéines Sm formant une ribonucléoparticule (=UsnRNP). Les UsnRNA ont été divisés en deux groupes en fonction de leur abondance relative dans la cellule. Ainsi, les UsnRNA majeurs (U1 à U6) sont présents à $2 \cdot 10^5$ – 10^6 copies par cellule alors que les UsnRNA mineurs (U7-U13) sont présents de 10^3 à 10^4 copies par cellule (Phillips et Turner 1992). Les U1, U2, U4/6 et U5 participent au spliceosome, U3, U13 et U8 seraient impliqués dans la maturation des ARN ribosomaux (Kass 1990), U11 dans la maturation 3' des ARNm adénylés, quant à U9, U10 et U12 leur fonction est encore méconnue (Zieve Sauterer 1990).

Le U7snRNA est le plus petit des UsnRNA (de 57 à 71nt chez les vertébrés/invertébrés étudiés, 63nt pour le U7 humain) et joue un rôle majeur dans la maturation 3' des ARN pré-messagers des histones (Mowry et Steitz 1987). Ceux-ci sont des ARNm très longs, régulés durant le cycle cellulaire. Ils ne contiennent ni intron ni queue poly A et leur maturation en ARNm mature consiste en un clivage endonucléolytique à l'extrémité 3', favorisée par le U7snRNP. En amont du site de clivage en 3', une séquence fortement conservée de 26 nucléotides et avec une structure tige-boucle est reconnue par une protéine de liaison à l'ARN : HBP (hairpin binding protein) (figure 25). Le site de clivage consiste en une séquence ACCCA'C (où l'apostrophe désigne le site de clivage le plus fréquent) (Furger 1998). Une seconde séquence conservée en aval du site de clivage correspond à la séquence riche en purines HDE (histone downstream element) qui est complémentaire et s'associe à l'extrémité 5' du U7snRNA, composant du U7snRNP. Il est décrit que la protéine HBP permet de stabiliser la fixation du U7snRNP à la séquence HDE du pré-messager histone (Spycher 1994, Dominski 1999). Après le clivage, HBP reste liée à l'ARNm histone et permet entre autre, son export nucléaire et sa traduction (Müller et Schumperli 1997). Une autre protéine

à doigts de zinc, ZFP100 interagit avec HBP et le U7snRNP pour stabiliser l'ensemble du complexe (Dominski 2002), et permettre le clivage au site correct, généralement au niveau du pont phosphodiester d'une adénine (figure 25). Après le clivage, le fragment 3' de l'ARNm histone est dégradé et le U7snRNP est recyclé.

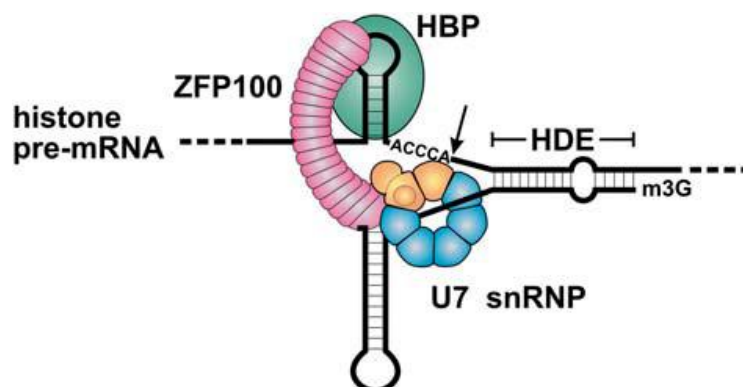


Figure 25 : Mécanismes moléculaires de la maturation 3' des ARN pré-messagers des histones via le U7snRNP. Au niveau du *core* heptamérique de protéines Sm du U7snRNP, les protéines représentées en bleues sont B/B', D3, E, F et G alors que les protéines représentées en oranges sont les Lsm10 et Lsm11. L'extrémité N-terminale de la Lsm11 se lie à ZFP100 (tirée de Schumperli 2004).

A l'origine identifié chez l'oursin (Galli 1983, Strub 1984), le U7snRNA et son gène ont rapidement été caractérisés chez la souris (Soldati et Schumperli 1988) et étudiés dans le cadre de micro-injections dans des ovocytes de *Xenopus* (Galli 1983, Gilmartin 1988, Phillips et Turner 1992).

Le U7snRNA est composé de trois domaines : le premier est une séquence en 5' d'environ 20nt, sensible aux nucléases alors que le reste du U7snRNA en est protégé. C'est cette extrémité 5' qui est complémentaire de la séquence HDE des ARN pré-messagers des histones et qui permet leur maturation 3'. Le second domaine consiste en un site de liaison aux protéines Sm (Sm binding site). Enfin, la région 3' du U7snRNA possède une séquence palindromique qui prend une structure secondaire en tige-boucle essentielle aux fonctions biologiques du U7snRNP (Gilmartin 1988, figure 26).

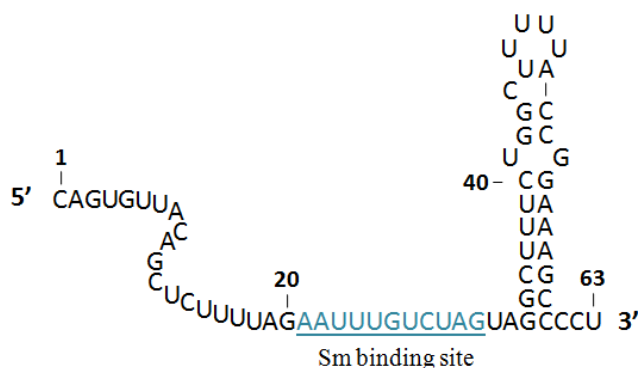


Figure 26 : Séquence du U7snRNA humain. Il est constitué d'une séquence 5' libre complémentaire de la séquence HDE des ARN pré-messagers des histones (20 nt), d'un site de liaison aux protéines Sm spécifique des U7snRNA (souligné et en bleu, 11 nt) et d'une partie 3' en structure tige-boucle (32 nt).

Le U7snRNA est codé par un gène unique (contrairement aux autres UsnRNA qui sont codés par des familles multi-géniques) localisé en 12p13 chez l'Homme (Phillips et Turner 1991). Le U7snRNA est transcrit par l'ARN polymérase II, comme l'ensemble des UsnRNA (excepté le U6snRNA qui est transcrit par l'ARN polymérase III). Son promoteur contient deux éléments en amont du codon start de transcription, le DSE (distal sequene element) qui fonctionne comme un enhancer et le PSE (proximal sequene element), proche du point de vue fonctionnel des TATA box des ARNm classiques, qui est essentiel à la transcription grâce au complexe protéique SNAPc (small nuclear RNA activating protein complex). La relation entre le DSE et le PSE et les protéines qui s'y lient, permettent l'assemblage du complexe d'initiation de la transcription (Phillips et Turner 1992, Hernandez 2001, Jawdekar 2008). En aval du site d'initiation de la transcription, un signal 3' consensus (3' box) est impliqué dans la terminaison 3' des transcrits U7snRNA via le complexe Integrator qui est relié au domaine C-terminal de l'ARN polymérase II (Baillat 2005, Jawdekar 2008, Ezzedine 2011).

Durant sa synthèse, le U7snRNA acquiert une coiffe mono-méthyle guanosine (7mGpppG) en 5' qui permet son export par le pore nucléaire dans le cytoplasme via notamment le complexe CBC (cap binding complex). Dans le cytoplasme, le complexe protéique SMN facilite l'assemblage des 7 protéines Sm de façon ATP-dépendante. L'anneau heptamérique Sm se fixe au pré-U7snRNA autour du site de fixation Sm, ce qui forme la U7snRNP. La coiffe 7mG est ensuite hyperméthylée (elle devient 2,2,7 tri-méthylguanosine) et le U7snRNA mature est formé par le clivage de son extrémité 3'.

La coiffe tri-méthyl et la présence des protéines Sm fournit le signal de localisation nucléaire. Le U7snRNP est réimporté dans le noyau en coopérant avec l'importine β , puis s'accumule

dans les corps de Cajal (Kiss 2004, Stefanovic 1995). Il est également possible que la maturation finale du U7snRNP puisse se faire dans les corps de Cajal, qui sont d'ailleurs localisés aux abords des loci des gènes des histones (Stanek 2006).

Le U7snRNP possède un site Sm non canonique AAUUUGUCUAG, différent du site Sm consensus des autres UsnRNA (figure 27) qui détermine l'assemblage d'un anneau de protéine Sm unique. Les protéines Sm B/B', D3, E, F et G sont communes à U7 et aux autres UsnRNA, mais les Sm D1 et D2 sont remplacées par deux polypeptides spécifiques du U7 : Lsm10 et Lsm11 de la famille des protéines Sm-like (14 et 50kDa respectivement) (Pillai 2001, Pillai 2003, figure 27).

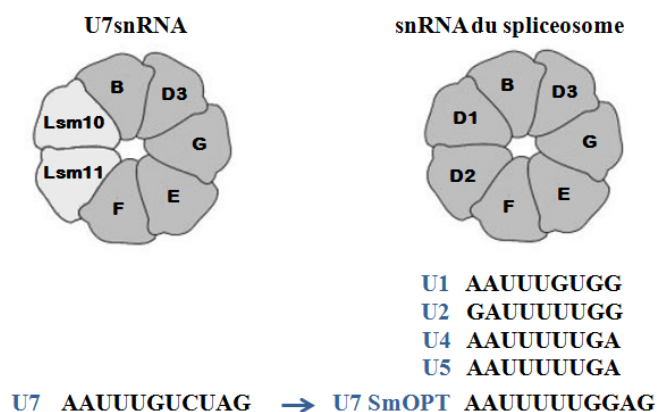


Figure 27 : Structure de l'anneau de protéines Sm spécifique du U7snRNP et des autres UsnRNP du spliceosome. La conversion de la séquence du site de fixation aux protéines Sm du U7 en une séquence consensus dérivée de celles des autres UsnRNA (=U7 SmOPT) induit un assemblage des protéines Sm D1 et D2 au U7snRNP modifié (adaptée de Pillai 2001).

Il a été montré que lorsque l'on remplace la séquence de fixation Sm spécifique du U7snRNA (U7snRNA WT = AAUUUGUCUAG) par une séquence consensus dérivée des autres UsnRNA du spliceosome (U7snRNA SmOPT = AAUUUUUGGAG), le U7snRNP s'assemble de façon beaucoup plus optimale, mais avec les protéines Sm D1 et D2 (au lieu des Lsm) (figure 27). Il s'accumule également de façon plus efficace dans le noyau et devient non fonctionnel pour la maturation des ARN pré-messagers des histones (Grimm 1993). En effet, la protéine Lsm11 est, au moins en partie, responsable de la fonction spécifique du U7snRNA puisque sa partie N-terminale interagit avec ZFP100 pour stabiliser l'association du U7snRNP et de l'ARN pré-messager des histones (Pillai 2003).

Le *core* protéique spécifique du U7snRNA détermine donc sa fonction, son assemblage cytoplasmique, son accumulation nucléaire (Grimm 1993, Stefanovic 1995), sa localisation dans les corps de Cajal (Wu 1996) et également son abondance. Il a en effet été montré que le U7snRNA, avec sa séquence Sm optimisée (U7 SmOPT), était plus abondant que le U7sRNA WT (Grimm 1993). Il est probable que la faible abondance des protéines Lsm10 et 11 (par rapport aux autres protéines Sm) soit à l'origine de la faible capacité d'association du U7snRNA WT aux protéines Sm. Ceci pourrait le rendre plus susceptible aux dégradations nucléolytiques, d'où sa faible abondance dans les cellules.

2) *Le U7snRNA comme outil optimisé pour le saut d'exon*

L'ensemble des caractéristiques du U7snRNA SmOPT décrites ci-dessus ont fait naître l'idée d'utiliser cet outil pour manipuler l'épissage, sur le principe des AON. En effet, l'équipe de Daniel Schümperli a observé que le U7snRNA SmOPT jouait un rôle dominant négatif sur le U7 WT, par compétition pour le site HDE des ARN pré-messagers des histones. Bien que non fonctionnel, le U7snRNA SmOPT peut effectivement toujours se fixer sur sa cible HDE (Schumperli 2004). Un U7snRNA SmOPT transportant une séquence antisens ciblant un site d'épissage (à la place de sa séquence 5' naturelle) pourrait donc être un outil idéal pour modifier l'épissage d'un ARN pré-messager ciblé.

Les premiers essais d'une telle vectorisation de séquences antisens dans un U7snRNA ont été réalisés *in vitro* pour le traitement de la β -thalassémie (Gorman 1998). Outre la DMD (dont nous allons parler en partie 3), le U7snRNA comme outil de saut d'exon peut être utilisé pour de nombreuses applications, telles que l'inhibition du collagène α (Stefanovic 2002), le traitement de la SMA (Marquis 2007, Geib 2009), le traitement de pathologies cardiaques (Gedicke-Hornung 2013) ou encore l'inhibition de la multiplication du VIH (Liu 2004, Asparuhova 2007).

L'utilisation de ces petits ARN U7snRNA pour porter des séquences antisens promotrices d'un saut d'exon présentent de nombreux avantages, notamment par rapport à l'utilisation des AON. En effet, les U7snRNA SmOPT possèdent déjà une localisation exclusivement nucléaire et ne sont plus coincés dans les corps de Cajal (comme leur homologue U7snRNA WT), ils peuvent donc être redirigés facilement vers les sites où les ARN pré-messagers sont épissés (Wu 1996). Les U7snRNA SmOPT sont incapables de cliver

l'ARNm cible et il ne peut y avoir de surexpression du U7snRNA dans la mesure où son expression est contrôlée par son promoteur naturel. En conséquence, ceci confère aux séquences antisens portées par U7snRNA une production ubiquitaire et continue *in situ*, suggérant un effet à plus long terme qu'avec les AON. Leur petite taille, leur structure secondaire et leur interaction avec des protéines Sm (et d'autres protéines associées) font des U7snRNA, ou plutôt des U7snRNP, des transporteurs très stables protégeant les séquences antisens de la dégradation par les nucléases. Afin d'optimiser leur efficacité et leur effet à long terme, il est également possible d'incorporer ces U7snRNA SmOPT modifiés dans des vecteurs viraux, y compris l'AAVr malgré sa faible capacité d'encapsulation.

D'autres snRNA, présentant exactement les mêmes avantages, sont utilisés pour modifier l'épissage des ARN pré-messagers, particulièrement le U1snRNA. Contrairement aux U7snRNA, les U1snRNA sont des UsnRNA majeurs, fortement exprimés et déjà impliqués dans l'épissage des ARN. Leur séquence de fixation aux protéines Sm n'a pas besoin d'être optimisée, seule la séquence 5' est modifiée en fonction de la cible ARN (figure 28). Le U1snRNA est donc un vecteur de séquences antisens très attractif.

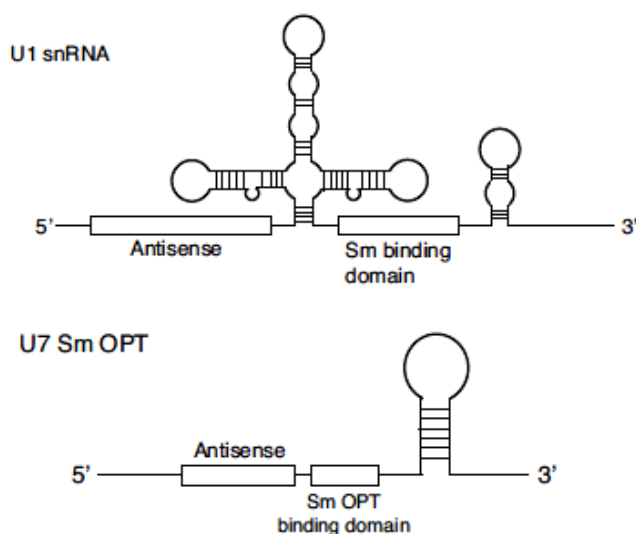


Figure 28 : Représentation schématique des U1snRNA (environ 165 nt) et U7snRNA (environ 60 nt) modifiés pour le ciblage des sites d'épissage des ARN pré-messagers (tirée de Hammond 2011).

Plusieurs études ont effectivement montré que le U1snRNA peut être utilisé comme transporteur de séquences antisens pour sous-réguler l'expression d'ARNm (Yuo et Weiner 1989, Montgomery et Dietz 1997, Havens 2013) et qu'il est notamment efficace pour inhiber la réplication du VIH *in vitro* (Liu 1997, Michienzi 1998). Pourtant, des effets de compétition entre le U1snRNA modifié pour cibler un site 5' d'épissage d'intérêt et le U1snRNA WT qui cible

lui aussi les sites 5' d'épissage pourrait diminuer l'efficacité des constructions U1snRNA (Gorman 2000). Ce genre de compétition n'est en théorie pas observable avec les constructions U7snRNA puisque le U7snRNA WT ne travaille qu'au niveau des ARN pré-messagers des histones.

Pourtant aucune différence d'efficacité n'a été relevée dans une étude où les auteurs ont comparé des constructions AAVr-U1snRNA et AAVr-U7snRNA (ciblant les sites 5' et 3' d'épissage) optimisées pour le saut de l'exon 23 du transcrit dystrophine dans le muscle de souris *mdx* (Denti 2006b). Même si le U1snRNA permet effectivement la restauration du cadre de lecture de la *DMD* (De Angelis 2002, Denti 2006a, Incitti 2010, Cazzella 2012) et qu'il pourrait être un bon outil pour le traitement de la DMD, la suite du manuscrit concernera presque exclusivement les essais avec le U7snRNA puisque c'est cette molécule qui a fait l'objet de mon travail.

3) Le saut d'exon du transcrit dystrophine médié par un U7snRNA

Peu après les premiers essais sur la β -thalassémie, le groupe d'Irene Bozzoni a tenté l'utilisation des UsnRNA pour le saut de l'exon 51 du transcrit codé par le gène *DMD*. Plusieurs constructions U1snRNA, U2snRNA et U7snRNA ciblant les sites d'épissage de l'exon 51 et incorporées dans des vecteurs rétroviraux ont été testées dans des myoblastes immortalisés de patients DMD portant une délétion des exons 48 à 50 ($\Delta 48-50$) dans leur gène *DMD*, corrigéable par saut de l'exon 51 (De Angelis 2002). Les constructions qui ont permis le plus haut niveau de saut d'exon et la restauration d'une protéine dystrophine d'environ 427 kDa, sont les constructions U1snRNA-5' et U7snRNA-double cible (ciblant à la fois les sites 5' et 3' d'épissage de l'exon 51).

Peu après il a été montré *in vitro* sur des myoblastes immortalisés de souris *mdx*, que des constructions U7snRNA ciblant le site 5', 3' ou le BP de l'exon 23 du transcrit dystrophine permettaient une restauration du cadre de lecture l'ARNm et de l'expression de la protéine dystrophine, correctement localisée au sarcolemme (Brun 2003). Cette étude a toutefois montré une diminution de l'expression du U7snRNA avec le temps due à une perte des copies du transgène qui avait été apporté par transfection. Ceci met en évidence la nécessité d'utiliser les vecteurs viraux, notamment les AAVr, pour augmenter l'efficacité de saut d'exon des constructions U7snRNA en permettant leur expression stable dans le temps.

Ainsi, Aurélie Goyenvalle et son équipe ont montré pour la première fois la possibilité de restaurer l'expression de la protéine dystrophine par saut d'exon en utilisant une construction U7snRNA administrée par un vecteur AAVr dans le muscle de souris *mdx* (Goyenvalle 2004). Dans cette étude, des souris *mdx* adultes ont reçu une injection unique d'un AAV1r-U7Dtex23 (double target, ciblant le BP et le site donneur d'épissage en 5') dans le tibialis antérieur à une dose unique de vecteur de 0.2 à 1.10^{12} vg. Quatre semaines post-injection, un saut de l'exon 23 a été observé dans 50 à 80% des transcrits dystrophine, accompagné d'une restauration de l'expression de la dystrophine dans plus de 80% des fibres musculaires du muscle injecté. Dans ces conditions, le complexe DAPC est restauré, suggérant la bonne fonctionnalité de la dystrophine. La force des souris traitées est également augmentée de façon notable. Ces résultats ont été confirmés récemment sur un modèle de souris plus sévère double KO *mdx utrophine* avec un AAVr9-U7ex23 injecté par voie intraveineuse à une dose de 1.10^{13} vg/souris (Goyenvalle 2012a). Cette fois la restauration de dystrophine a pu être observée dans 45 à 95%, des fibres musculaires, y compris dans le cœur et des améliorations phénotypiques ont pu y être corrélées, notamment l'augmentation de la durée de vie des souris.

La faisabilité d'une restauration de dystrophine dans les muscles de gros modèles animaux via un U7snRNA optimisé pour le saut d'exon a également été validée chez le chien *GRMD*. Ces chiens portent une mutation dans l'intron 7 qui peut être corrigée par le double saut des exons 6 et 8 du transcrit dystrophine (Sharp 1992).

Des chiens *GRMD* ont été injectés à l'âge de 5 à 9 mois par voie IM avec un AAVr-1 portant des U7-ESE6 et U7-ESE8 (U7snRNA ciblant une séquence ESE dans l'exon 6 et 8, respectivement du messenger *DMD* canin) (Vulin 2012). L'injection de ce vecteur permet un saut des exons 6 et 8 et une restauration du cadre de lecture dans le transcrit *DMD*, ainsi qu'une restauration de l'expression de la protéine dystrophine, observée par immunohistochimie et western blot sur des biopsies musculaires. Cette restauration est également dose dépendante (de 5.10^{10} à $3,5.10^{12}$ vg/site d'injection IM). Enfin, ces observations sont corrélées avec la diminution des marqueurs de la pathologie DMD : un retour de l'expression d'utrophine à un niveau normal, une diminution du nombre de fibres nécrosées ou surchargées en calcium, ainsi qu'une amélioration du profil pathologique musculaire observé par imagerie NMR, et une augmentation de la force musculaire au niveau du muscle injecté (Vulin 2012). En parallèle, dans la même étude, les auteurs ont démontré l'efficacité des vecteurs AAVr-1-U7-ESE6 et U7-ESE8 injectés par voie intraveineuse

locorégionale chez deux chiens *GRMD*. Des biopsies musculaires itératives ont pu être prélevées chez un de ces chiens de 2 à 56 mois après l'injection. A 2 mois post-injection, de nombreuses fibres positives pour la dystrophine ont pu être observées (environ 40%).

Dans cette même étude, les auteurs mettent cependant en évidence une diminution du niveau de fibres dystrophine positives progressivement dans le temps jusqu'à atteindre <10% à la fin de l'étude, en corrélation avec la diminution du nombre de copies de vecteur dans les mêmes biopsies (Vulin 2012). Une des explications serait qu'à cause de la progression de la pathologie DMD et à la présence des cycles de dégénération/régénération qui provoquent la nécrose des fibres musculaires, les copies de vecteurs aient été perdues au cours du temps (Le Hir 2013). Nous reviendrons sur cette problématique dans la discussion de ce manuscrit.

Puisque l'absence de correction du cœur est une limite majeure des stratégies AON, certaines équipes se sont penchées sur la restauration de dystrophine dans le cœur après saut d'exon par un U7snRNA optimisé. Des chiens adultes ont été injectés par voie percutanée trans-endocardique (Bish 2012, Barbash 2013) avec un AAVr-6-U7-ESE6/ESE8. Un saut d'exon et la restauration de dystrophine dans le cœur ont pu être détectés mais à un très faible niveau. De légères améliorations du phénotype cardiaque ont tout de même été observées au niveau du ventricule gauche par imagerie à résonance magnétique (IRM).

4) L'optimisation des U7snRNA

Bien que très efficace *in vitro* et *in vivo*, le U7 optimisé ne parvient généralement pas à permettre un saut de l'exon ciblé sur 100% des ARN pré-messagers. L'efficacité de saut d'exon est également dépendante de l'exon ciblé. En effet d'un exon à l'autre, la meilleure séquence antisens ne ciblera pas les mêmes zones exoniques, ce qui nécessite une optimisation pour chaque nouvel exon à sauter (Wilton 2007).

Pour optimiser l'efficacité du U7snRNA, il est possible de jouer sur la longueur de l'antisens ou de cibler plusieurs sites d'épissage, en utilisant par exemple deux molécules U7snRNA. Une plus grande synergie est observée lorsque les deux cibles sont portées par le même U7snRNA puisque la molécule double-cible induirait une conformation secondaire en boucle favorisant le saut de l'exon (Suter 1999). Un U7snRNA bi-fonctionnel a également été développé et testé dans des cellules de patients DMD (Goyenvallé 2009). Ce U7snRNA cible le

saut de l'exon 51 du transcrit dystrophine humain mais porte également une séquence inhibitrice d'épissage. En amont de la séquence antisens classique située en 5' du U7snRNA, est ajouté une « queue » correspondant à une séquence de fixation des protéines hnRNP-A1 (qui se fixent d'ordinaire sur les inhibiteurs d'épissages ISS et ESS). Cette construction, insérée dans un vecteur lentiviral, permet un saut de l'exon 51 et une restauration de l'expression de la protéine dystrophine plus importants que ceux observés avec le vecteur ne portant pas de séquence de fixation des hnRNP-A1. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris transgénique portant le gène *DMD* humain, après injection intra musculaire d'AAVr-1-U7 bi-fonctionnel (Goyenvallée 2009).

Afin de favoriser l'expression du U7snRNA et ainsi augmenter la quantité de U7snRNP actifs, sans pour autant devoir augmenter la dose de vecteur viral à injecter, il a également été envisagé d'ajouter une séquence enhancer en amont du promoteur du gène U7snRNA. L'enhancer MCK (murine muscle creatine kinase enhancer) permet une meilleure expression du U7snRNA dans des cellules murines (Brun 2003). Néanmoins, il a été démontré plus récemment que l'expression du U7snRNA ne pouvait être augmentée grâce à un enhancer que dans une certaine mesure. La présence de sous-produits probablement non fonctionnels du U7snRNA (précurseurs U7snRNA ou U7snRNA tronqués en 3') suggère en effet une saturation de la machinerie cellulaire qui ne peut pas prendre en charge une trop grande quantité de transcrits U7snRNA (Eckenfelder 2012).

Il est également possible de combiner une stratégie de saut d'exon par un U7snRNA avec d'autres stratégies pharmacologiques ou anti-symptomatiques. Par exemple, une étude combine un traitement par AAVr-U7snRNA à une stratégie d'inhibition de la myostatine (Hoogaars 2012). Même sans effet synergique clair, les souris *mdx* bénéficient ainsi des avantages des deux approches (restauration de dystrophine et augmentation de la masse musculaire). Enfin, comme nous l'avons évoqué pour les AON, une stratégie de multi saut d'exon peut également être envisagée pour l'approche U7snRNA (Goyenvallée 2012). Il est par exemple possible d'incorporer 3 constructions ciblant 3 exons différents dans le même vecteur AAVr ; l'avantage étant que les trois U7 sont forcément délivrés dans le même noyau, favorisant le multi saut d'exon.

CHAPITRE 4 :

Les potentiels effets off-target des stratégies antisens

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté les AON et les séquences antisens vectorisées dans un des U7snRNA, les outils de saut d'exon utilisés aujourd'hui et qui font partie des outils oligonucléotides. Si nous avons évoqué leur grande efficacité pour cibler spécifiquement une séquence du transcrit *DMD* pour le saut d'exon, nous n'avons pas évoqué les potentiels effets négatifs ou off-targets que ces outils peuvent engendrer. Ce chapitre sera donc consacré à la présentation de leurs effets off-targets au sens large (ou effets indésirables), et leurs effets off-targets spécifiques sur d'autres séquences cibles que celle pour laquelle ils ont été créés.

A- Définition des effets off-targets

Comme nous l'avons évoqué, la thérapie génique corrective permet la correction du gène (ou de son transcrit) de façon ciblée en s'aidant des mécanismes de régulation naturels des cellules. Outre le saut d'exon, le ciblage génétique permet également de supprimer l'expression d'un gène (knock-down) ou d'induire des mutations localisées dans le génome pour étudier la fonction des gènes ou générer des animaux transgéniques. Les récents progrès ont été alimentés par la découverte et l'optimisation de nouveaux outils tels les endonucléases, qui clivent spécifiquement l'ADN en générant des cassures double brins, et le développement des outils basés sur les oligonucléotides.

Les outils oligonucléotides ciblent pour la plupart des séquences ARN spécifiques mais sont variables tant dans leur nature, dans leur taille que dans leur mécanisme d'action. On distingue les oligonucléotides antisens simple brin (AON) et les petits ARN interférents double brin (siRNA). Comme toutes les autres drogues ou médicaments, les oligonucléotides thérapeutiques présentent des risques d'effets secondaires. Ces effets toxiques non souhaités peuvent être séparés, selon si les effets sont dépendants ou indépendants de l'hybridation de l'oligonucléotide à sa cible ARN (Summerton 2007, Lindow 2012).

Les effets dépendants de l'hybridation, que nous appellerons effets off-targets séquence-spécifiques (détaillés en partie B-), émanent d'une hybridation involontaire, souvent imparfaite, de l'oligonucléotide sur des ARN non ciblés, suivant les principes d'appariement des bases de Watson et Crick (figure 29).

La majorité des effets toxiques des AON et siRNA sont néanmoins des effets non dépendants de l'hybridation et correspondent à des interactions de l'oligonucléotide avec d'autres drogues

ou protéines, qui sont principalement dues à la composition chimique et/ou au vecteur utilisé pour l'administration (figure 29).

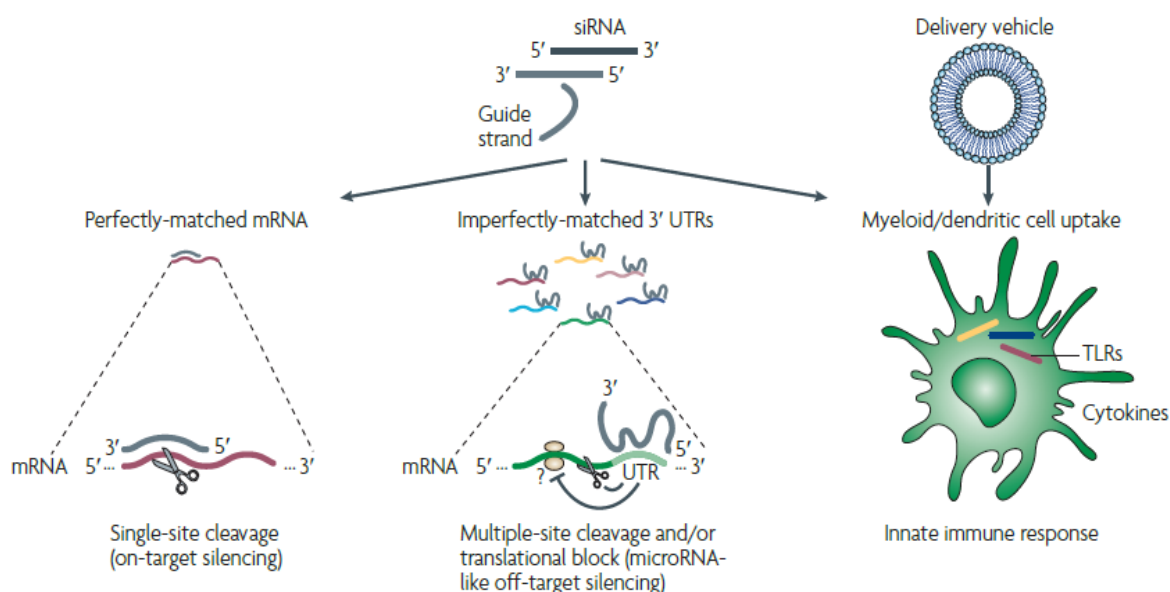


Figure 29: Différents types de off-targets pouvant être observés suite à l'administration d'un oligonucléotide dans un organisme. L'exemple est donné pour un oligonucléotide de type siRNA. En plus de l'inhibition de l'ARN ciblé (à gauche), les siRNA peuvent générer plusieurs effets off-targets. Le brin guide des siRNA peut s'hybrider, via un appariement imparfait, sur des séquences d'ARNm cellulaires non ciblées (le plus souvent dans la région 3'UTR) (au milieu). Les siRNA (ou le vecteur utilisé pour l'apporter dans les cellules) peuvent générer d'autres effets off-targets non dépendants de l'hybridation telles que l'induction de réponses immunitaires innées. TLR : Toll-like receptor (tirée de Jackson 2010).

1) Les effets off-targets non dépendants de l'hybridation à une séquence nucléotidique

Les effets secondaires indépendants de l'hybridation de l'oligonucléotide n'impliquent pas d'appariement de l'oligonucléotide avec une séquence nucléotidique, mais peuvent parfois être malgré tout spécifiques de la séquence, via notamment une fixation sur des facteurs protéiques. Ces effets toxiques sont divisés en 3 groupes selon s'ils sont dus à des liaisons aptamériques, à des mécanismes pro-inflammatoires ou à une accumulation de l'oligonucléotide dans un tissu (Frazier 2015).

Les effets aptamériques correspondent à des interactions de l'AON ou du siRNA à des protéines ou des molécules. Il a été montré que les AON, principalement ceux de 1^{ère} génération, pouvaient se fixer à de très nombreuses protéines telles les laminines, les tyrosines kinases, le fibrinogène, des protéines du VIH (Summerton 2007) ou encore le facteur IX de coagulation (Sheehan Phan 2001). Ces interactions aptamériques sont à l'origine de toxicités

hépatiques (et parfois rénales) qui dans la plupart des cas sont caractérisées par une dégénérescence hépatocellulaire et des nécroses très localisées (Frazier 2015).

Des effets toxiques pro-inflammatoires, séquence spécifiques, peuvent aussi être observés, notamment via l'interaction des oligonucléotides avec des récepteurs Toll-like (TLR). En effet, dans les cellules de mammifères, il existe des motifs moléculaires associés aux pathogènes ou PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), type lipopolysaccharides, peptidoglycannes, ADN bactérien ou ARN viral. Ces motifs sont reconnus par des récepteurs spécifiques TLR et induisent une stimulation du système immunitaire inné. Les siRNA sont reconnus spécifiquement par les TLR 3, 7 et 8 localisés entre le réticulum endoplasmique et les endosomes / lysosomes, ce qui induit la production de cytokines pro-inflammatoires (interférons, $\text{TNF}\alpha$, IL-6) (Sledz 2003, Jackson 2010). Les AON peuvent également stimuler les réactions du système immunitaire inné selon la composition en GC de leur séquence. Il a en effet été montré que l'absence de méthylation des îlots CpG sur les AON de première génération (oligodesoxynucléotides phosphorothioates, PS) pouvait stimuler le système immunitaire inné, de la même façon que lors d'une défense contre un ADN bactérien (les CpG bactériens étant généralement non méthylés) (Summerton 2007). Les AON peuvent également être reconnus par les TLR, induire des réactions pro-inflammatoires en activant la voie du complément, ou encore provoquer des thrombocytopénies (diminution des plaquettes) (Frazier 2015). Ces effets sont observables chez l'Homme sous la forme d'inflammations au niveau du site d'injection et/ou le développement de symptômes grippaux (Frazier 2015). Bien que ces effets secondaires pro-inflammatoires soient réversibles, de par la demi-vie limitée des oligonucléotides *in situ*, ils peuvent se manifester pendant plusieurs semaines voire plusieurs mois après l'administration.

Des toxicités rénales et hépatiques peuvent également être observées suite à une accumulation des AON dans les tissus. Ces accumulations prennent la forme de granules cytoplasmiques, nommées granules basophiles et observées principalement dans les épithéliums hépatiques et rénaux. La sévérité de ces effets secondaires dépend principalement de la concentration en AON accumulés. Des granules sont aussi observables dans les macrophages mais seraient plutôt liés à la production de cytokines stimulées par des mécanismes pro-inflammatoires (Frazier 2015). L'accumulation de siRNA, et plus particulièrement des shRNA (short hairpin RNA) induit une saturation de la machinerie des

ARN interférents qui peut conduire à une toxicité hépatique, via l'altération de l'expression et de la fonction des micro-ARN naturels (Jackson 2010).

Limiter ces effets toxiques des oligonucléotides est envisageable, notamment en diminuant les doses, en changeant le vecteur d'administration ou bien en modifiant la séquence (moins de motifs GC ou GU sur les AON ou siRNA respectivement). Les AON de seconde et surtout de troisième génération, notamment les PMO, ne présentent quasiment plus de toxicité due à des liaisons aux protéines sanguines ou sériques (Summerton 2007).

2) Les effets off-targets dépendants de l'hybridation à une séquence nucléotidique

Un autre type de toxicité peut être apportée par les effets off-targets consécutifs à un appariement base-spécifique de l'oligonucléotide à des ARN ou des ADN cellulaires. En effet, tous les outils de thérapie génique ciblée, y compris les endonucléases que nous avons rapidement évoquées, ont en commun de pouvoir cibler spécifiquement une séquence qui leur est complémentaire sur l'ARN ou l'ADN. La spécificité de séquence correspond à la capacité de l'outil à distinguer sa cible parmi toutes les molécules d'ARN et d'ADN de la cellule.

Un ciblage efficace de la cible peut parfois induire des effets néfastes via un effet pharmacologique exagéré (par exemple dans le cas d'une inhibition), mais peut être corrigé en ajustant la dose.

Par contre, dans le cas d'une similarité de séquence, y compris avec quelques bases non concordantes (mismatches), entre la cible et d'autres molécules d'ARN ou d'ADN, des hybridations off-targets peuvent survenir. Ces hybridations involontaires peuvent avoir de lourdes conséquences sur l'expression des gènes, notamment en diminuant ou augmentant l'expression de certains ARNm et/ou en modifiant l'épissage de transcrits alternatifs. Dans le cas d'hybridation off-targets non décelées, des erreurs d'interprétations de certains résultats expérimentaux peuvent également être commises (Stein et Krieg 1994, Seinen 2010), notamment dans le cas de création de modèles animaux transgéniques.

Bien sûr, l'abondance, la nature et les conséquences de telles hybridations off-targets varient selon les mécanismes d'action des outils. Mais globalement les off-targets sont dépendantes *i)* de la taille de la séquence complémentaire (environ 20 nt pour un AON), *ii)* de la quantité de cibles potentielles dans la cellule (par exemple selon la localisation nucléaire ou cytoplasmique de ces cibles) et *iii)* de la longueur d'hybridation minimale qui peut provoquer un effet (une inhibition dans le cas des siRNA, une coupure double brin dans le cas des

endonucléases ou un saut d'exon dans le cas d'un AON). En se basant sur ces 3 critères, il a été estimé que les AON de première génération (PS) et les siRNA devraient théoriquement présenter plus de off-targets que les PMO (Summerton 2007).

Comme nous allons l'aborder dans les prochains paragraphes, des approches expérimentales ont effectivement confirmé la présence d'effets off-targets prononcés pour un certains nombres d'outils, particulièrement les siRNA et les outils d'édition du génome que sont les endonucléases ZFN, TALEN et CRISPR/Cas9.

B- La mise en évidence expérimentale des off-targets séquence-spécifiques

1) Les effets off-targets des siRNA

L'inhibition de l'expression d'un gène par ARN interférence peut être médiée par deux types de petits ARN non codants : les microARN endogènes (miARN) et les siRNA.

Les miARN sont des petits ARN doubles brins endogènes qui contrôlent ainsi un large réseau de gènes pour la régulation des fonctions biologiques de la cellule. Les miARN sont exprimés dans les cellules sous forme de précurseurs d'ARN double brin et pris en charge par l'enzyme Dicer dans le cytoplasme, pour être maturés en petits ARN double brin de 21 pb. Un des brins du micro-ARN, le brin guide (brin antisens), est incorporé dans le complexe RISC (RNA-inducing silencer complex). Puis ce brin guide dirige le complexe RISC vers les régions 3'UTR des ARNm cellulaires pour arrêter leur traduction et les cliver en petits fragments via l'activation de la protéine Argonaute, le composant catalytique de RISC. (Jackson 2010, Bennett et Swayze 2010).

Les siRNA ou les shRNA sont également des petits ARN doubles brins (21 pb pour les siRNA, 19 à 25 nts reliés par une structure tige-boucle dans le cas des shRNA) mais qui sont eux, exogènes. Ils sont introduits dans les cellules à des fins expérimentales. La machinerie permettant aux siRNA de dégrader un ARNm cible est la même que celle décrite pour les miARN. Ainsi, le brin guide des siRNA se fixe sur différentes cibles ARNm par complémentarité de séquence, principalement grâce aux nucléotides 1 à 8 en 5', la séquence « graine » (ou seed région) (Jackson 2010).

Bien que les premières études aient démontré la spécificité des siRNA pour leur cible ARNm, les validations ne portaient que sur quelques autres ARNm (Tuschl 1999, Elbashir 2001). C'est en 2003 que le groupe de Jackson et Linsley ont démontré pour la première fois l'inhibition directe par un siRNA d'autres ARNm non ciblés, contenant seulement 11

nucléotides contigus communs avec la séquence de l'ARNm cible (Jackson 2003). Dans une analyse un peu plus poussée, cette équipe a produit 6 siRNA ciblant 6 ARNm différents et a analysé à l'échelle globale, par des puces à ADN ou microarrays (> 969 transcrits analysés), la régulation des transcrits après transfection de cellules Hela (Jackson 2006). Ils ont alors montré une large inhibition off-target de transcrits non ciblés. A noter que dans ces transcrits off targets, les séquences cibles de ces siRNA se situaient essentiellement dans les régions 3' UTR des ARNm. Les auteurs ont alors parlé de mécanismes off-target « miARN-like » puisque les miARN endogènes ciblent naturellement les régions 3'UTR d'un très grand nombre d'ARNm pour les réguler (Jackson 2006, Jackson 2010). Il a pu également être montré que ces hybridations off-target sur des transcrits non ciblés provoquent une réelle inhibition des protéines correspondantes (Scacheri 2004, Lin X. 2005, Jackson 2006) et qu'elles sont observables *in vivo* chez la souris (Burchard 2009).

A la suite de ces premières mises en évidence, de nombreuses autres études se sont penchées sur la caractérisation de ces effets off-targets. Il a ainsi été confirmé qu'un siRNA pouvait inhiber une cible off-target via une très courte complémentarité de seulement 7 nt, à partir du moment où les propriétés thermodynamiques sont favorables à l'hybridation (Lin X. 2005). De plus, il a été montré que la présence des off-targets n'était pas un artéfact lié à une trop grande concentration en siRNA. En effet diminuer la dose de siRNA administrés ne suffit pas à éliminer les effets off-targets (Jackson 2003). Enfin, il a été observé que le brin sens des siRNA, et pas seulement le brin guide, pouvait parfois être pris en charge par le complexe RISC et donc induire lui aussi un ensemble de off-targets (Jackson 2003). La co-administration d'un shRNA et d'un leurre ARN capable de se fixer sur le brin sens et de supprimer son activité permet d'alléger les effets off-targets globaux du shRNA (Mockenhaupt 2015).

Afin de passer outre ces effets off-targets pour permettre l'interprétation des données phénotypiques, certains auteurs suggèrent l'utilisation d'un ensemble de siRNA différents ciblant le même gène (et donc avec une signature de transcrits off-target différents) pour analyser les modifications du phénotype de façon plus sûre (Jackson 2006).

Malgré les efforts pour définir précisément les règles de leur développement, les siRNA générés par différents algorithmes ont toujours des effets off-targets. La plupart du temps, l'absence de ces potentiels transcrits off-targets est vérifiée via Blast (Basic Local Alignment Search Tool), un outil informatique qui recherche les cross-réactivités entre les cibles ARNm d'un génome donné et la séquence de 21nt du siRNA. Pourtant, une étude a

montré que 75% des séquences siRNA publiées étaient susceptibles d'induire des off-targets, malgré une recherche Blast négative (Snove 2004). Ceci suggère que BLAST passe à côté des courts alignements, notamment ceux au niveau de la région graine (7nt). De nombreux logiciels ou algorithmes plus sensibles ont été créés dernièrement (Seinen 2010, Sigoillot 2012, Chen 2013b). Un logiciel est par exemple capable de sélectionner les siRNA avec une plus faible stabilité du duplex « région graine/ARNm cible », puisqu'il a été observé une grande corrélation entre les off-targets dépendantes de la région graine et les propriétés thermodynamiques du duplex « siRNA/ARNm cible » (Naito 2012).

2) *Les effets off-targets des nucléases modifiées pour l'édition génomique*

Les nucléases ZFN (zing finger nucleases), TALEN (transcription activator-like effector nucleases) et CRISPR/Cas9 (clustered regions of interspersed palindromic repeats) facilitent la modification du génome en introduisant des cassures double brin (DSB, double strand break) dans une séquence ADN d'intérêt (figure 30). Comme nous l'avons évoqué dans le *Chapitre 2*, lors de DSB, la cellule active des mécanismes de réparation de l'ADN permettant une réparation directe par homologie (recombinaison homologue, RH) ou une recombinaison par jonction des extrémités non homologues (NHEJ), induisant des mutations indels (insertions / délétions) au niveau du site de coupure ADN (Longhese 2010, Jensen 2011). Ces nucléases sont actuellement utilisées dans une grande variété d'applications, notamment l'édition génomique pour la création de modèles animaux ou encore pour le traitement de maladies génétiques ou d'infections virales (Humbert 2012, Wijshake 2014, Riordan 2015). Une cassure double brin entraîne une grande instabilité du génome. Des clivages off-targets en trop grand nombre entraînent donc une cytotoxicité, et la réparation de ces DSB peut créer des réarrangements chromosomiques non souhaités (insertions, délétions, translocations) (Lee 2010, Lee 2012). Il est également tout à fait possible que les coupures off-targets aléatoires du génome entraînent l'activation de proto-oncogènes ou l'inactivation d'un gène suppresseur de tumeurs. Les risques d'effet secondaires indésirables via l'utilisation de ces endonucléases sont donc majeurs, et l'identification et la caractérisation des potentiels cibles off-targets est un enjeu primordial pour permettre leur utilisation dans un contexte biosécuritaire. A ce jour, même si aucune de ces nucléases ne présente de spécificité absolue, de nettes améliorations dans leur conception et leur sélection ont permis de limiter ces effets off-targets.

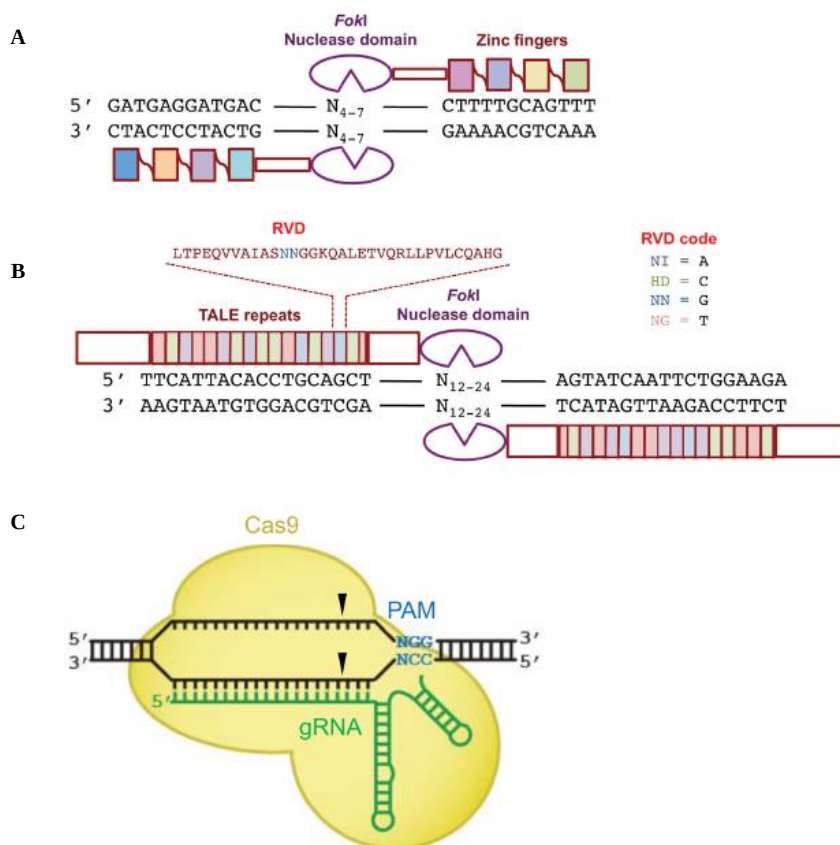


Figure 30 : Architecture et mode d'action des nucléases ZFN (A), TALEN (B) et CRISPR/Cas9 (C). A: Quatre protéines à doigts de zinc sont assemblées et fusionnées au domaine FokI pour former un monomère de ZFN. La fixation de chacun des deux monomères à leur site de fixation sur la molécule d'ADN ciblée permet la dimérisation de FokI et le clivage de l'ADN. B: Chaque monomère de TALEN comprend un effecteur TAL (TALE) constitué de répétitions en tandem, fusionné au domaine FokI. Les 12^{ème} et 13^{ème} acides-aminés de chaque répétition correspondent aux RVD (repeat variable diresidues), qui sont capables de reconnaître une base spécifique sur l'ADN (RVD code). Il faut deux monomères de TALEN pour déclencher la cassure double brin par dimérisation de FokI entre les deux demi-sites de reconnaissance. C: Un complexe constitué d'une protéine Cas9, à activité nucléase et d'un ARN guide (gRNA) qui s'apparie de façon complémentaire sur une séquence ADN, reconnaît un motif de séquence PAM (Protospacer adjacent motif) et entraîne une coupure double brin de l'ADN 3 pb en amont du motif PAM (flèches noires) (tirée de Pattanayak 2014).

α- Les effets off-targets des ZFN

Les ZFN sont des protéines artificielles constituées du domaine de liaison ADN d'une protéine en doigts de zinc (ZFP, *zinc finger protein*) fusionné avec le domaine catalytique de l'endonucléase FokI. La spécificité de coupure ADN est donnée par la ZFP: un domaine autonome en hélice α se lie à l'ADN et est stabilisé par deux cystéines et deux histidines, le tout coordonné par un ion zinc (d'où le nom de la protéine). Une ZFP reconnaît spécifiquement 3 pb sur l'ADN, ainsi les ZFN peuvent être créées pour reconnaître de plus longues séquences en fusionnant plusieurs protéines ZFP.

Le domaine catalytique de l'endonucléase FokI est attaché au domaine C-terminal du module en doigts de zinc. FokI n'est actif que sous forme de dimère, ainsi, pour obtenir un clivage optimal de l'ADN, il est nécessaire de générer deux monomères de ZFN. Ces deux ZFN doivent se lier chacun sur une moitié du site de reconnaissance ADN, sur les brins opposés, dans la bonne orientation et à une distance correcte l'un de l'autre (4 à 7 pb). La liaison de l'ADN par les deux ZFN, permet une hétérodimérisation de FokI et un clivage dans la région séparant les deux motifs ADN (Figure 30 A, Humbert 2012, Wijshake 2014).

Une première alerte de potentiels clivages de gènes non ciblés par les ZFN a été apportée par plusieurs études montrant une mort cellulaire dépendante de la dose de ZFN administrée (Alwin 2005, Porteus 2006). Ces hypothèses ont par la suite été confirmées en montrant que l'expression des ZFN était associée à une activité de clivages off-targets importante.

En se basant sur un modèle de ZFN ciblant le gène *kdrl* du zebrafish, des chercheurs ont étudié en détail les fréquences de lésions off-target de leurs ZFN (Meng 2008, Gupta 2011). Ils ont d'abord identifié *in silico* les potentielles cibles off-targets, contenant entre 1 et 5 mismatches avec la séquence cible (deux séquences de 9 pb espacées de 5 à 6 pb). Ils ont ensuite vérifié par séquençage, s'il y avait effectivement des clivages (présence de mutations indels) dans ces gènes candidats. Bien qu'à une fréquence faible ($\leq 1\%$ contre 20% au site cible), des lésions ont effectivement été observées sur quelques cibles off-targets (Cornu 2008). Certaines positions dans la séquence ZFN semblent toutefois être critiques. En effet, certains gènes, avec 5 mismatches par rapport à la séquence cible *kdrl*, présentent un clivage off-target, alors que des séquences quasi similaires à la cible (1 seul mismatch) ne sont pas clivées (Gupta 2011).

Récemment, de nouvelles méthodes utilisant le séquençage haut débit ont été développées pour identifier et caractériser les sites de coupures off-targets des ZFN (Gabriel 2011, Pattanayak 2011). Une technique consiste à utiliser des vecteurs lentiviraux déficients pour l'intégration (IDLV) dont le génome viral s'intègre uniquement au niveau des sites de cassures double brin de l'ADN (qui correspondent à des sites de coupures off-target). Un séquençage haut débit du génome permet de détecter les sites d'intégration des IDLV et donc tous les sites de coupures pour un ZFN donné (Gabriel 2011). Dans leur exemple, les sites de coupures détectés ont 66.7% d'homologie de séquence avec la cible de leur ZFN-CCR5, tolèrent des mismatches à certaines positions et nécessitent une longueur précise entre les deux monomères de ZFN.

Des logiciels spécialisés peuvent également de concevoir des ZFN en tenant compte du risque off-target (Cradick 2011).

Outre le fait d'identifier les potentielles cibles off-target avant la conception des ZFN, il est possible de diminuer la toxicité des ZFN due aux coupures off-targets en augmentant le nombre de ZFP reliées dans une ZFN (augmentant ainsi la longueur de la séquence de liaison à l'ADN), en jouant sur l'affinité de liaison protéine-ADN, ou en utilisant un couple de ZFN hétérodimères. Il est en effet possible de créer des variants de domaines FokI qui inhibent la formation d'homodimères de ZFN (Humbert 2012, Wijshake 2014). Il a également été montré que l'administration des ZFN directement sous forme de protéines dans les cellules était efficace pour induire des mutations au niveau de la cible, mais provoquait aussi moins de coupures off-targets. Cela peut être expliqué par la demi-vie courte des protéines ZFN ainsi administrées. Cette étude manque toutefois d'exhaustivité puisque seules 9 cibles off-targets ont été analysées (Gaj 2012).

b- Les effets off-targets des TALEN

Les TALEN sont constitués d'une séquence peptidique, zone de liaison à l'ADN, appelée TAL (transcription activator like) et fusionnée avec le domaine nucléase de FokI. La séquence TAL est issue de bactéries *Xanthomonas* et fonctionne comme un facteur de transcription chez les plantes infectées. Ces effecteurs TAL sont capables de reconnaître une séquence ADN spécifique via un domaine de répétitions en tandem. Chaque répétition de 34 acides aminés varie au niveau de 2 acides-aminés (appelés RVD, repeat variable diresidues) qui reconnaissent spécifiquement 1 paire de base sur l'ADN. La spécificité de séquence des TALEN est apportée par ce simple code de reconnaissance RVD/nucléotide au niveau de l'effecteur TAL. Cela permet de cibler une séquence d'intérêt dans le génome (généralement entre 15 et 20 nt). De même que pour les ZFN, puisque FokI ne clive l'ADN que lorsqu'il est sous forme de dimère, deux TALEN doivent être générées pour cibler les brins opposés au niveau du site de clivage sur la molécule d'ADN ciblée, les demi-sites de clivages pouvant être espacés de 12 à 24 pb (figure 30 B, Humbert 2012, Wijshake 2014).

Bien que la recherche de cibles off-targets des TALEN n'ait pas été aussi approfondie que celle des ZFN, il semble que ces nucléases soient moins sujettes au clivage non ciblé. Si

l'efficacité d'édition du génome des TALEN est similaire à celle des ZFN, il semble en effet que leur spécificité soit meilleure (Mussolino 2011, Humbert 2012).

Une analyse des cibles off-targets par séquençage haut débit du génome de différentes souches de levures exposées ou pas aux TALEN, ne révèle aucune mutation indel sur des gènes non ciblés (Li 2011). De même, des chercheurs visant à restaurer le cadre de lecture du gène *DMD* par des TALEN *in vitro* (ciblage de l'exon 51 du gène *DMD*), ont réalisé une analyse assez exhaustive des potentielles cibles off-targets sans parvenir à en mettre en évidence (Ousterout 2013). Les auteurs ont tout d'abord montré qu'aucune cytotoxicité n'était induite et que les TALEN étaient bien tolérés par les cellules humaines. En parallèle, des sites potentiels de off-targets ont été recherchés *in silico* via le serveur web TALE-NT 2.0 spécialisé dans la prédiction de cibles couplées (comme c'est le cas pour les TALEN et ZFN). Cette analyse a été réalisée via un scan du génome humain, à la recherche de séquences identiques à la séquence cible, ou portant jusqu'à 4 mismatches par demi-cibles et étant espacées de 12 ou 13 pb. De façon surprenante, cette analyse *in silico* n'a détecté aucune cible potentielle pour leur TALEN. Il est possible que les critères de sélection des cibles off-targets aient été trop stringents. Toutefois, aucune mutation liée aux TALEN n'a été mise en évidence sur des gènes autre que la cible, et ce malgré un séquençage complet des exomes des myoblastes *DMD* immortalisés dans lesquels des indels ont été repérés dans l'exon 51 du gène *DMD* (Ousterout 2013).

D'autres études ont tout de même mis en évidence quelques événements off-targets suite à l'utilisation de TALEN. Par exemple, 2 cibles off-targets sur 19 testées ont été observées dans des cellules souches humaines, mais avec une fréquence très faible par rapport aux effets sur la cible (Hockemeyer 2011). Une autre étude comparant les deux types de nucléases ZFN et TALEN, a montré que les TALEN avaient une activité de clivage de la cible (le gène *CCR5*) similaire à celle des ZFN les plus optimisés. Par contre, la cytotoxicité induite par les ZFN était beaucoup plus importante, ce qui suggère une meilleure spécificité des TALEN. Effectivement, en étudiant le locus *CCR2* qui possède une séquence très proche de la cible *CCR5*, cette étude a montré que les TALEN induisent des mutations off-targets sur seulement 1 % des allèles *CCR2* contre 11 % avec les ZFN (Mussolino 2011).

Des études à grande échelle ont permis de mieux comprendre la spécificité des TALEN, de caractériser les impacts des mismatches et de leur position afin d'en améliorer la conception (Juillerat 2014, Guilinger 2014). Et, comme pour les ZFN et les siRNA, de nombreux logiciels et

algorithmes ont récemment été développés pour faciliter la conception et l'identification de cibles off-targets des TALEN (Grau 2013, Wisjake 2014).

c- *Les effets off-targets des CRISPR / Cas9*

Les nucléases pour l'édition du génome les plus récemment développées et les plus faciles à produire sont basées sur le système de CRISPR (clustered regions of interspersed palindromic repeats), un système de défense virale retrouvé chez les bactéries et archées. La différence avec les nucléases évoquées précédemment est que la sélection du site de clivage ADN est guidée par un ARN, et non plus par une protéine. En effet, un ARN guide (ARNg) d'environ 20 nt, utilise l'appariement standard des bases selon Watson et Crick pour se fixer sur une séquence ADN d'intérêt et y positionner une nucléase Cas9 (CRISPR associated) qui crée la cassure double brin (figure 30 C).

Chez les bactéries ou archées, lors d'une infection virale, un court fragment de l'ADN du pathogène est intégré à leur chromosome, au niveau du locus CRISPR. Lors de la transcription de ce locus, de courts ARN, les crARN (CRISPR ARN) et les tracrARN (trans activating ARN) sont produits et permettent la liaison par complémentarité sur les séquences ADN étrangères des pathogènes. Le duplex crARN.tracrARN ainsi créé, reconnaît et provoque la dégradation de l'ADN viral étranger en se liant avec un complexe de protéines Cas ayant une activité nucléase (Ma 2014, Wisjake 2014, Riordan 2015).

Pour développer un outil spécifique d'édition du génome, les crARN et tracrARN ont été modifiés en un unique ARN guide simple brin (ARNg) qui recrute toujours la nucléase Cas9 pour cliver l'ADN. Le clivage par la Cas9 dépend de la présence d'un motif PAM (protospacer adjacent motif), généralement NGG, en aval du site de coupure, ce qui limite la flexibilité de conception mais augmente potentiellement la spécificité du système. Par contre, la nucléase Cas9 fonctionne sous forme d'un monomère, ce qui augmente les sites potentiels de coupures off-target par rapport aux TALEN et ZFN pour lesquels deux monomères doivent se fixer sur les brins opposés de l'ADN pour un clivage par FokI.

Effectivement, les CRISPR/Cas9 peuvent aussi générer des DSB sur des gènes non ciblés (Cradick 2013, Fu 2013, Hsu 2013, Pattanayak 2013). Il a été montré sur des cellules humaines que ces sites off-targets sont *i)* souvent localisés dans les gènes codants, *ii)* peuvent avoir jusqu'à 5 mismatches avec la séquence de l'ARNg et *iii)* être clivés à des fréquences aussi importantes, voire supérieures, à celles du site cible (Fu 2013). Avec un système de gène

rapporteur GFP, les auteurs ont également étudié minutieusement l'influence des mismatches sur 3 ARNg différents. Ils ont pu montrer qu'un ou deux mismatches ont des effets variables sur les off-targets, mais que cela ne dépend pas strictement de leur position ; même si les mismatches en 3' (= région graine) sont généralement moins bien tolérés que ceux en 5' (Fu 2013). A noter que cette analyse n'a pas été réalisée avec des techniques de séquençage à haut-débit. On peut penser que si cela avait été le cas, le nombre de off-targets mis en évidence n'en aurait été que plus important, puisque des milliers de potentiels sites off-targets avec 4 ou 5 mismatches sur les 20 nt de l'ARNg existent dans le génome, et ce pour n'importe quelle séquence cible d'intérêt.

En effet, des analyses par séquençage haut-débit ont permis de caractériser davantage les cibles off-targets des CRISPR/Cas9. Une étude faisant appel à l'utilisation de vecteurs IDLV qui s'intègrent aux sites de cassures, confirme les résultats précédents montrant que les coupures off-targets sont observées à une haute fréquence sur des cibles ayant quelques mismatches (Wang X. 2015). Les auteurs mettent même en évidence une cible off-target avec 13 mismatches, sur les 20 nt de l'ARNg ! En parallèle, aucune cible off-target n'a été mise en évidence pour les TALEN testées (Wang X. 2015). Il semble toutefois que les effets off-targets des CRISPR/Cas 9 puissent être minimisés (mais pas supprimés) en diminuant la dose d'ARNg administrée et que l'accessibilité à la chromatine puisse avoir un effet sur l'efficacité de liaison de la Cas9 (Wang X. 2015, Wu 2014).

Contrairement aux ZFN et aux TALEN pour lesquels le nombre de modules ZFP ou TAL peut être augmenté pour allonger la séquence de reconnaissance à l'ADN, les CRISPR/Cas9 ont une spécificité fixée à une vingtaine de paires de bases. De plus, les ZFN et TALEN sont issus de facteurs de transcription qui fonctionnent chez les eucaryotes alors que le système CRISPR est issu de procaryotes, au génome 1000 fois plus petit, ce qui pourrait aussi expliquer les « défauts » de spécificité des CRISPR.

C'est justement en se basant sur les mécanismes d'action des autres endonucléases, que des Cas9 à activité nickase ont été développées, en mutant un site actif de la Cas. Les Cas9 nickases ainsi générées ne clivent l'ADN que sur un seul brin. Deux monomères de Cas9 (associés à l'ARNg) sont alors utilisés pour générer deux cassures simple brin adjacentes sur les brins opposés de l'ADN. La spécificité des CRISPR/Cas9 est ainsi doublée et le nombre de cibles off-targets est clairement diminué (Ran 2013, Cho 2014).

Il a également été montré que la structure et la composition de l'ARNg ont un impact sur les effets off-targets. En effet, l'administration des deux crARN et tracrARN (au lieu du seul

ARNg) et l'utilisation d'un crARN synthétique à la place d'un plasmide d'expression, permettent de limiter le nombre de clivages off-targets (Cho 2014, Ma 2014). Comme cela a été évoqué pour les ZFN, l'administration de protéines plutôt que de plasmides encodant Cas9 permet également de diminuer les mutations off-targets, sans modifier les fréquences de coupures au site cible (Kim 2014).

Enfin, un point important est de sélectionner minutieusement une séquence cible, préférentiellement unique dans le génome (% GC, nombre et position des mismatches) ; la prédiction *in silico* étant plus fiable pour les ARNg des CRISPR/Cas9 que pour les ZFN et TALEN qui dépendent de liaisons ADN/protéine, très souvent contexte-dépendantes. De nombreux serveurs web sont aujourd'hui à disposition pour la conception des ARNg des CRISPR/Cas9 (Ma 2014, Cho 2014, Koo 2015).

3) Les effets off-targets des oligonucléotides antisens

Concernant l'analyse des effets off-targets séquence-spécifiques des AON, aucune étude n'a, à ce jour, mis en évidence d'altération de l'épissage d'autres ARNm que celui ciblé par l'AON. Une étude a également montré qu'un petit AON de type LNA (locked nucleic acid) de 8 nt, inhibiteur de miARN, n'avait pas d'effet off-target, tant au niveau ARN qu'au niveau protéique sur ses sites potentiels off-targets identifiés *in silico* (Obad 2011). De même, un couple U1-U6snRNA modifié pour reconnaître un site d'épissage muté n'a montré aucune dérégulation massive de l'épissage de cibles ARNm off-targets (6 cibles potentielles testées par RT-PCR) (Schmid 2013).

Si l'on considère une séquence antisens de 20 nt, le risque de retrouver exactement la même séquence dans l'ADN est quasi inexistant. Le nombre de transcrits sur lequel l'AON pourrait s'hybrider dépend donc du nombre de mismatches tolérés. Il est également probable que toutes les liaisons off-targets d'un AON à un ARNm n'aient pas d'effet fonctionnel et que tous les sites sur un ARNm ne soient pas accessibles à leur hybridation. En s'appuyant sur ces données et sur le fait qu'aucune cible off-target d'un AON n'a jamais été mise en évidence, y compris lors des essais cliniques déjà réalisés, certains auteurs considèrent le risque d'effets off-targets des AON comme négligeable (Wilton et Fletcher 2005, Lindow 2012).

Cependant, comme décrit précédemment, pour les siRNA et les nucléases clivant l'ADN, il semble que les off-targets soient très site-dépendantes, et que l'influence des mismatches dépende fortement de leur position dans la séquence. De plus, il a été montré que des AON de 15 nt seulement pouvaient provoquer un saut d'exon de manière efficace (Aartsma Rus 2005).

Très peu d'études se sont en fait concentrées sur la recherche de cibles off-targets des AON. Rien n'a par exemple été publié sur la spécificité des AON 2'OMe et PMO utilisés en essai clinique pour le saut de l'exon 51 chez les patients DMD. Ainsi, d'autres auteurs suggèrent plutôt que les effets off-targets des AON ne sont simplement pas encore apparus à une fréquence suffisante pour attirer l'attention, à côté des effets indésirables mieux surveillés aujourd'hui dans ces essais cliniques, tels que la toxicité rénale et l'inflammation (Frazier 2015, Summerton 2007).

C- Techniques d'identification des effets off-targets séquence-spécifiques

Il paraît clairement nécessaire, pour chaque nouvel outil, d'identifier les potentielles cibles off-targets ADN ou ARN, spécialement dans le cas de projets pré-cliniques ou cliniques. Puisque chaque outil fonctionne via un mécanisme différent, aucune méthode universelle n'existe et aucune base de données pour effectuer des recherches *in silico* n'est commune. Les oligonucléotides, par exemple, fonctionnent soit via le complexe RISC (siRNA), soit en clivant l'ARN par la RNase H, soit en bloquant l'accès à l'ARN par encombrement stérique. La stabilité thermodynamique de la cible et le nombre de mismatches auront également des impacts différents pour des hybridations off-targets selon le mécanisme mis en jeu, mais aussi selon la chimie et la séquence de la molécule utilisée (Lindow 2012). Enfin, au-delà de choisir la technique ou l'algorithme adapté, le choix du modèle pour la recherche de cibles off-targets est important.

L'analyse de cibles off-targets d'un siRNA ont été réalisées dans le foie de souris *in vivo* et en parallèle, dans une lignée cellulaire hépatique de souris, *in vitro* (Burchard 2009). Les profils off-targets obtenus par microarrays sont très similaires entre les analyses *in vivo* et *in vitro*, malgré les différences de mode de transfection, de quantité de siRNA disponible *in situ* et de complexité du tissu par rapport à la cellule. Ceci suggère fortement qu'il est envisageable d'utiliser des modèles *in vitro* pour mettre en évidence les cibles off-targets dans une espèce d'intérêt. Il semble par contre que les profils off-targets soient variables selon l'espèce. En effet, bien qu'un siRNA induise un même nombre d'effets off-targets chez l'Homme et la souris (analyses *in vitro*), très peu sont communes aux deux espèces (Burchard 2009). La facilité à identifier des cibles off-targets peut aussi dépendre du tissu analysé (que ce soit *in vitro* ou *in vivo*) ; on sait notamment que les AON ont tendance à s'accumuler dans le foie et les reins.

Une recherche *in silico* des potentielles cibles off-targets est généralement la première analyse réalisée par ceux cherchant à mettre en évidence des effets indésirables séquence-spécifique ; l'idéal étant que cette recherche soit faite au moment de la conception. Dans ce cas, l'algorithme utilisé doit être parfaitement adapté à l'outil d'intérêt (on se rappelle du mauvais exemple de BLAST pour la recherche de cibles off-targets de siRNA) et les critères de sélection des cibles potentielles doivent être pragmatiques. Dans le cas de critères trop stringents pour le screening d'une base de données refseq ou du génome, il y a un risque de passer à côté de potentiels candidats off-targets biologiquement significatifs. Au contraire, si les critères sont trop larges, le nombre de prédictions est trop important pour pouvoir interpréter correctement l'analyse *in silico*. L'interprétation doit, dans la mesure du possible, s'accompagner de données annexes, telles que la localisation subcellulaire du transgène après administration (cytoplasme ou noyau), les tissus dans lesquels le transgène est exprimé, ou encore les conséquences fonctionnelles que pourrait entraîner l'altération de tel ou tel candidat off-target.

La plupart des études évoquées dans les paragraphes précédents (*Chapitre 4, B-*) se sont contentées d'une recherche *in silico* des cibles potentielles (tolérant quelques mismatches) et les ont validé par PCR, PCR quantitative ou séquençage ciblé. Les études utilisant des techniques de haut-débit (Jackson 2006, Burchard 2009, Gabriel 2011, Pattanayak 2012, Li T. 2011, Pattanayak 2013) permettent, elles, de caractériser les cibles off-targets de façon plus globale. Pour les oligonucléotides (siRNA et AON), une analyse transcriptomique peut être effectuée par les techniques de microarrays ou de RNA sequencing, qui analysent l'expression des gènes et l'épissage alternatif à l'échelle du génome.

Les puces à ADN ou microarrays, consistent en un support, généralement composé de verre ou de silice sur lequel une multitude de séquences ADN simple brin représentant un ARNm (= sondes) sont fixées et arrangées. Les ADNc de chaque échantillon à analyser sont marqués par des fluorophores et déposés sur la puce (= cibles). La fluorescence générée par chaque appariement d'une cible sur sa sonde correspondante est enregistrée et interprétée. Il est ainsi possible de monitorer l'expression de milliers de gènes simultanément pour étudier l'effet d'un traitement, d'une maladie ou d'un siRNA (par exemple), dans le cadre de la recherche de cibles off-targets. En fonction des sondes déposées sur la puce, il est possible d'analyser l'expression des gènes d'une espèce donnée, d'un tissu donné ou uniquement de gènes d'intérêt en fabriquant une puce à façon.

Sur les puces de 1^{ère} génération, chaque ARNm était représenté par un nombre restreint de sondes, localisées dans la région 3' UTR des transcrits. Avec le développement des techniques et la nécessité d'analyser le transcriptome à l'échelle des isoformes et des exons, de nouvelles puces sont apparues, avec plus de sondes, localisées le long du gène et dans les exons (Cuperlovic-Culf 2006, figure 31). Si les premières puces à exons (Affymetrix GeneChip[®] Human Exon 1.0 ST) ne représentait un exon que par 4 sondes (Cordero 2008), il existe aujourd'hui des puces « nouvelle génération », regroupant plus de 6 millions de sondes (Affymetrix GeneChip[®] Human Transcriptome Array 2.0), une quinzaine de sondes étant réparties sur chaque exon et jonctions d'exons. Chaque transcrit codant ou non codant est représenté par près de 200 sondes (www.affymetrix.com). Ces puces permettent ainsi d'évaluer les variations de l'expression des gènes entre plusieurs échantillons biologiques à l'échelle des exons individuels mais aussi des jonctions exoniques (figure 31).

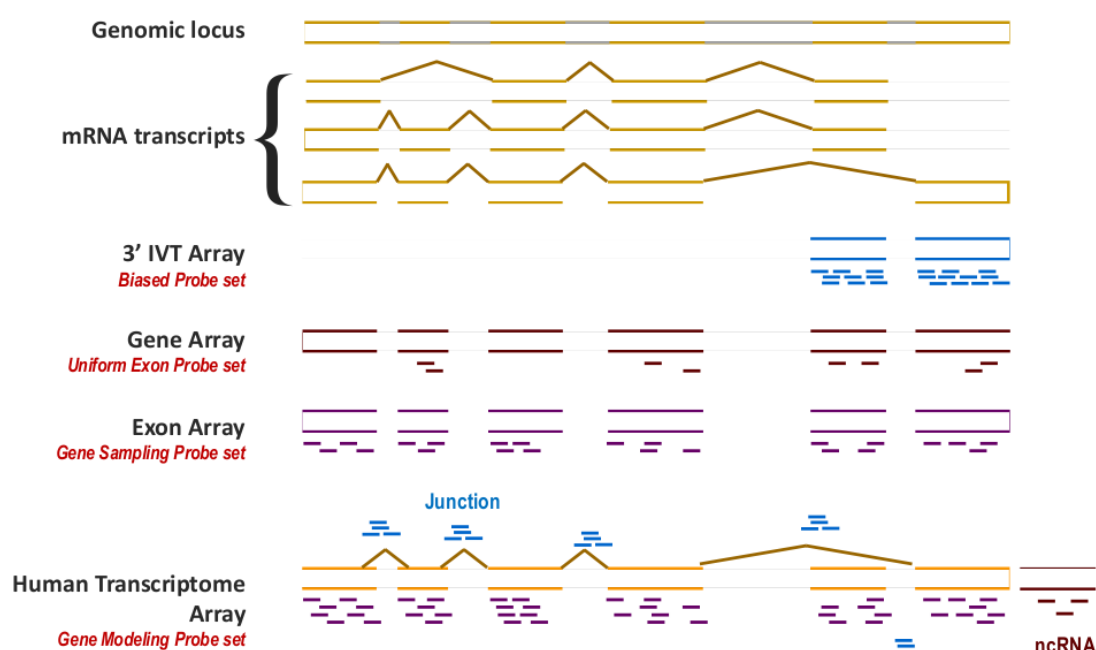


Figure 31 : Représentation schématique des sondes utilisées pour différents types de microarrays. Les sondes des puces « 3'IVT array » ne représentent que l'extrémité 3' du gène, alors que les puces « Gene array » et « Exon array » ont des sondes dispatchées sur toute la longueur du transcrit. La puce « Exon array » a une meilleure résolution de l'expression des exons grâce au nombre de sondes augmentées. La puce « Human transcriptome array » de dernière génération permet l'identification de certains ARN non codants (ncRNA) et des jonctions exoniques afin de mettre en évidence les variants d'épissage (tirée de www.get.genotoul.fr).

Le séquençage à haut-débit de l'ARN (RNA sequencing ou RNAseq) est une technique récente de séquençage de seconde génération (next generation sequencing) qui séquence simultanément, selon la technique de base de Sanger, l'entièreté du transcriptome d'un échantillon. Le RNAseq a transformé la transcriptomique en rendant possible l'analyse

de l'expression d'un gène, avec une résolution à l'échelle de l'exon et cela pour n'importe quel tissu, n'importe quelle espèce et sans connaissance préalable des gènes exprimés, de leur profil d'épissage ou de leur séquence.

Pour une telle analyse, des bibliothèques d'ADNc sont préparées à partir d'ARN total: les ARN sont fractionnés en petits fragments, rétro-transcrits, ligés à des adaptateurs de séquençage, amplifiés par PCR et finalement fixés sur une surface appelée « flowcell ». Une amplification des fragments sur la flowcell permet la formation de faisceaux ou « clusters » qui correspondent à des copies simple brin du fragment d'origine de la bibliothèque. Le séquençage est réalisé, soit à partir d'une seule extrémité (single end), soit à partir des deux extrémités du fragment (paired-end), grâce à des amorces incorporant des nucléotides fluorescents (Feng 2013, figure 32).

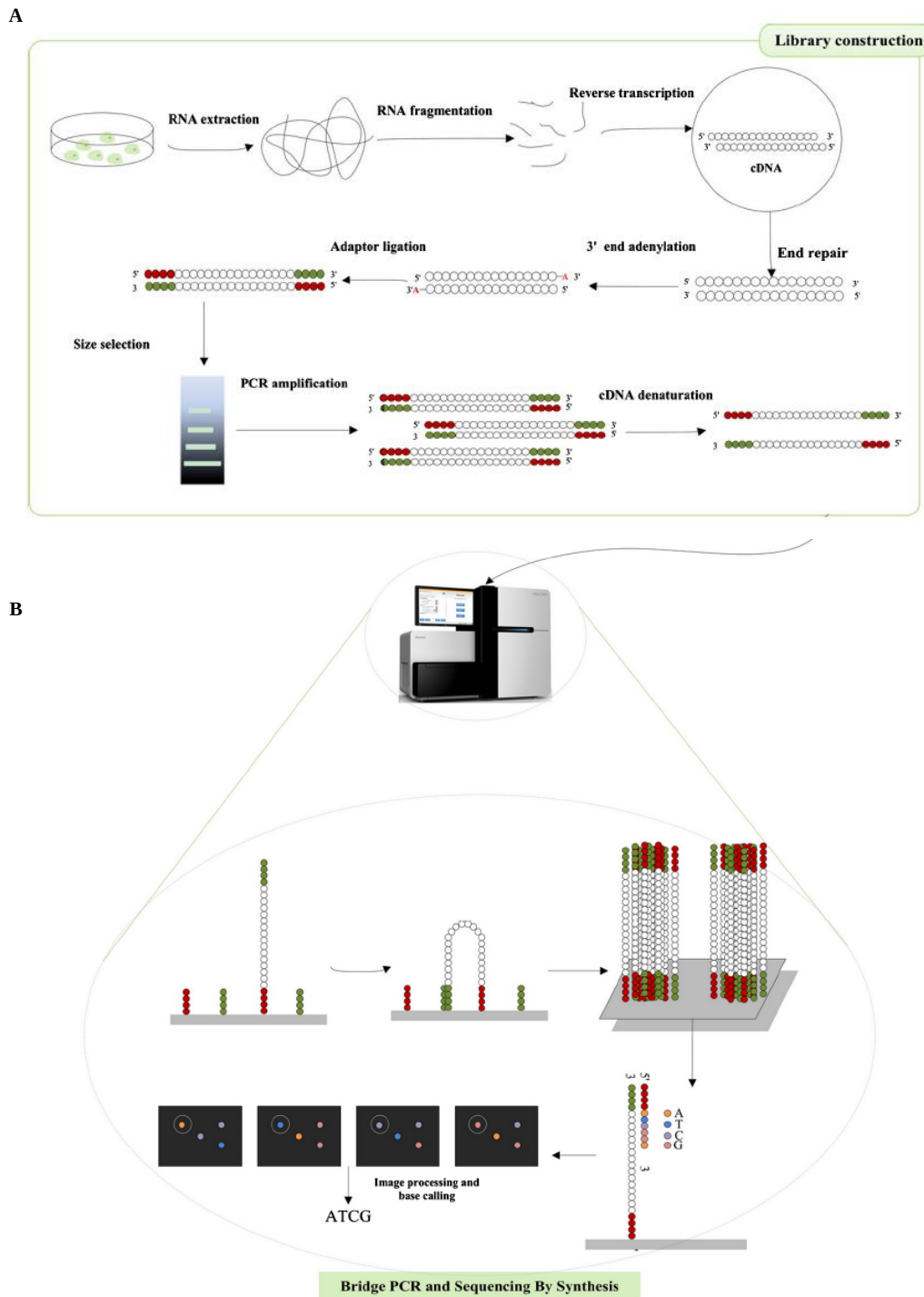


Figure 32 : Représentation schématique d'un protocole de RNAseq (exemple de la plateforme Illumina/Solexa). A: Les différentes étapes pour la préparation de la librairie d'ADNc à partir des ARN totaux extraits de l'échantillon biologique à analyser. B: Séquençage. Les fragments d'ADNc simple brin sont liés à la « flowcell » via les adaptateurs, puis amplifiés en clusters après de cycles de PCR en « pont ». Les dNTPs fluorescents sont incorporés avec des amorces spécifiques des adaptateurs dans chaque cluster et capturés par une série d'images à haute résolution. Les séquences (reads) de ces différents fragments sont lues à partir de ces images par des logiciels adaptés (tirée de Feng 2013).

Pour chaque échantillon d'ARN initial, le séquençage permet l'obtention de plusieurs dizaines de millions de courtes séquences, appelés « reads » (entre 50 et 150 nt pour la technologie Illumina) qui sont ensuite alignés sur un génome de référence pour former une carte du transcriptome de l'échantillon (Trapnell 2009, Vikman 2014). Les transcrits ou exons ainsi identifiés sont quantifiés puis normalisés par rapport à leur taille. En effet, le niveau d'expression de chaque transcrit (ou exon) est déduit à partir du nombre de reads totaux alignés sur ce transcrit, et doit être comparable même entre les transcrits de taille différente. Différents outils bioinformatiques sont spécialisés dans la quantification et permettent de mettre en évidence les différentiels d'expression ainsi que les différentiels d'épissage entre deux échantillons, et ce à l'échelle des gènes, des isoformes ou des exons (Trapnell 2010, Hooper 2014).

Par rapport aux microarrays, le RNAseq *i)* permet d'identifier les limites des transcrits, des introns et des exons, *ii)* permet une lecture avec une précision d'1 pb (essentielle pour l'étude des SNP, single nucleotide polymorphism), *iii)* permet l'identification de nouveaux variants d'épissage et *iv)* n'a pas de limite de quantification, y compris pour les transcrits les plus faiblement exprimés. Excepté son coût élevé (qui varie selon de la profondeur de séquençage souhaitée), le principal désavantage du RNAseq est le temps nécessaire pour analyser la masse de données générées (Wang 2009b, Vikman 2014).

CHAPITRE 5 :

***Contexte et objectifs de la thèse :
développement pré-clinique d'un produit
de thérapie génique pour le traitement de
la dystrophie musculaire de Duchenne***

A- Les caractéristiques du projet DMD/U7

Le projet DMD/U7 a pour objectif de transférer en clinique, dans le cadre d'un essai clinique de phase I/II, un produit de thérapie génique pour le traitement de la DMD par saut d'exon. A la vue des avancées récentes dans les stratégies de traitement de la DMD, le choix pour notre produit clinique s'est porté sur un vecteur AAVr de sérotype 8 portant un transgène U7snRNA optimisé pour le saut d'exon de l'ARNm dystrophine. Cet AAVr-8-U7snRNA sera administré chez des patients DMD non-ambulants dans un membre antérieur par voie intraveineuse locorégionale.

Ce projet s'appuie sur la participation et les expertises complémentaires d'un large réseau de laboratoires français : le Génethon (Evry), l'institut de Myologie (Paris), l'INRA UMR 703 (Atlantic Gene Therapies, Nantes), le Centre de Boisbonne (Atlantic Gene Therapies, Nantes) et notre laboratoire INSERM UMR 1089 (Atlantic Gene Therapies, Nantes). Une partie des résultats pré-cliniques de ce projet DMD/U7 a déjà été publiée (Le Guiner et al. 2014, en annexe).

Le choix du vecteur thérapeutique s'est porté sur l'AAVr-8 car, comme nous l'avons évoqué précédemment, il a une grande capacité à traverser les barrières endothéliales et à transduire les fibres musculaires de façon efficace (Wang Z. 2005). De plus, l'AAVr-8 a une immunotoxicité (Vandenberghe 2006) et une prévalence dans la population humaine (Boutin 2010) plus faible que les autres sérotypes.

Afin de favoriser une large transduction, permettant de toucher le plus de muscles possible chez les patients DMD, une injection du vecteur thérapeutique par voie intraveineuse paraît la plus adaptée. Il est en effet reconnu aujourd'hui qu'une injection directe (intramusculaire) dans le muscle ne permet qu'une diffusion très locale du vecteur AAVr dans les muscles squelettiques. Ce type d'injection peut s'avérer également compliquée à mettre en place si l'on parle de transduction du cœur ou du diaphragme.

L'injection intraveineuse locorégionale d'un vecteur AAVr, qui vise à transduire les muscles squelettiques d'un membre, se positionne aujourd'hui comme une étape intermédiaire entre l'injection intramusculaire, déjà testée en essai clinique chez des patients DMD, et l'injection intraveineuse systémique, que l'on espère pouvoir être appliquée à terme aux patients DMD. Injecter en effet un vecteur AAVr par voie intraveineuse locorégionale devrait permettre de confirmer l'efficacité et l'innocuité de tels vecteurs dans le contexte pathologique sévère de la

DMD, tout en permettant à des patients de conserver une fonction motrice au niveau d'un membre.

Lors d'une injection locorégionale, le membre ciblé est transitoirement isolé de la circulation générale par la pose d'un garrot non traumatique. Après cathétérisation d'une veine (par exemple de la veine céphalique, dans le cas de l'injection d'un membre supérieur) l'administration sous pression du vecteur dans le membre isolé permet une transduction très efficace et homogène de l'ensemble des muscles de ce membre (Su 2005, Toromanoff 2008, Gregorevic 2009, Chicoine 2014b). Du fait que le vecteur se retrouve tout de même exposé à la circulation générale après le relachement du garrot, les autres muscles à distance et certains organes peuvent également être transduits, mais dans une moindre mesure. Une équipe de chercheurs américains a récemment montré la faisabilité et l'innocuité d'une telle injection chez l'Homme et particulièrement chez des patients atteints de dystrophies musculaires, que ce soit dans les membres inférieurs ou supérieurs (Fan 2012, Fan 2015).

Notre essai clinique de phase I/II, dont l'initiation est prévue courant 2016, s'adressera à des patients DMD non ambulants. Une injection du produit clinique dans le(s) membre(s) inférieurs paraissait peu pertinente dans la mesure où les muscles des jambes de ces patients seront probablement trop atteints pour permettre une correction de dystrophine et/ou un effet fonctionnel mesurable. L'injection dans les membres supérieurs n'est pas pour autant un choix par défaut puisque les patients pourraient en tirer un réel bénéfice clinique, dans le cas d'une restauration fonctionnelle des muscles des bras et des mains, en préservant leurs activités manuelles (déplacement du fauteuil, accès à internet, etc).

Au commencement de notre projet, le concept de l'utilisation d'un U7snRNA pour restaurer le cadre de lecture du transcrit dystrophine avait déjà bien été établi, notamment grâce aux travaux d'Aurélien Goyenvalle et de Luis Garcia sur la souris *mdx* (Goyenvalle 2004). Nous avons poursuivi ces évaluations par une étude pré-clinique chez un modèle gros animal pertinent de la DMD, le chien *GRMD*, afin de déterminer l'innocuité et la dose efficace du produit AAVr-8-U7snRNA, tout en optimisant le protocole d'injection locorégionale. Une étude de toxicologie réglementaire a ensuite été réalisée chez le rat et le primate non-humain. Enfin, après la validation du projet clinique par l'ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament), nous serons en mesure de commencer l'essai clinique de Phase I/II chez un petit nombre de patients DMD (figure 33).

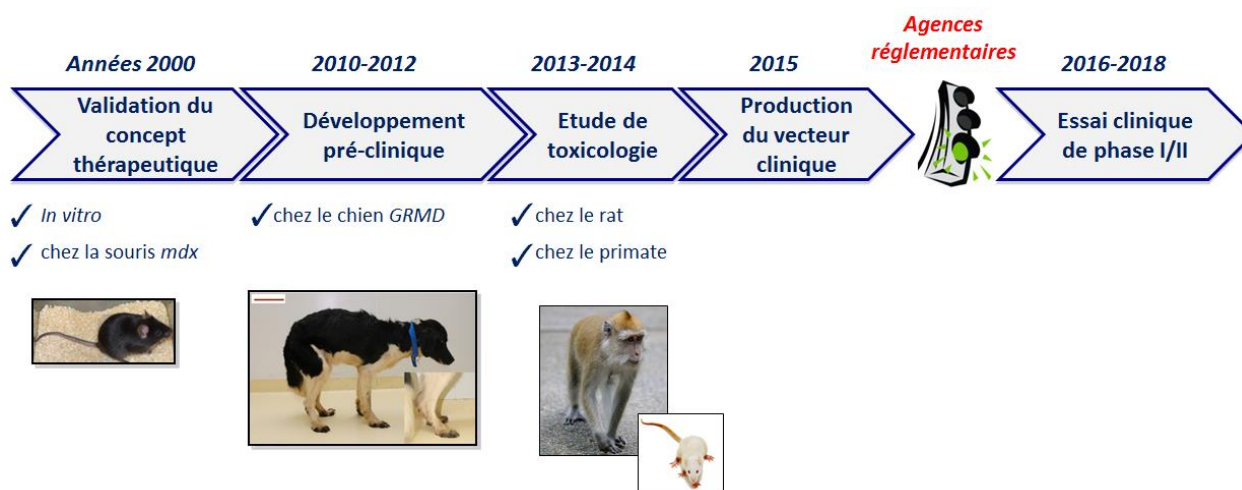


Figure 33 : Représentation schématique des grandes étapes du projet DMD/U7, depuis les preuves de concepts jusqu'à l'essai clinique dont le démarrage est prévu courant 2016.

B- Le projet pré-clinique DMD/U7 : étude de dose chez le chien GRMD

Outre son aspect pathologie dystrophique plus avancée que celui de la souris *mdx*, le chien *GRMD* est un modèle pertinent pour une telle approche de thérapie génique dans la mesure où la grande taille des animaux permet une simulation du contexte humain bien meilleure que ce que pourrait apporter la souris, notamment pour la mise au point du protocole d'injection locorégionale. Comme chez l'Homme, le chien *GRMD* porte une mutation qui peut être corrigée par saut d'exon. Chez ces chiens, la mutation au niveau du site accepteur d'épissage de l'intron 6 provoque l'apparition de transcrits aberrants, notamment avec une rétention de l'intron 6 ou un saut de l'exon 7. Dans les deux cas, le cadre de lecture est décalé et la protéine dystrophine absente des fibres musculaires (Sharp 1992) (figure 34 A). Ainsi l'apport, via des U7snRNA optimisés, de séquences antisens ciblant des ESE dans les exons 6 et 8, permet une restauration du cadre de lecture (figure 34 B). Deux cassettes d'expression U7snRNA, l'une permettant le saut de l'exon 6 (U7-E6) et l'autre permettant le saut de l'exon 8 (U7-E8) ont été insérées entre les ITR d'un vecteur AAVr-8 (figure 34 C).

Introduction - Chapitre 5

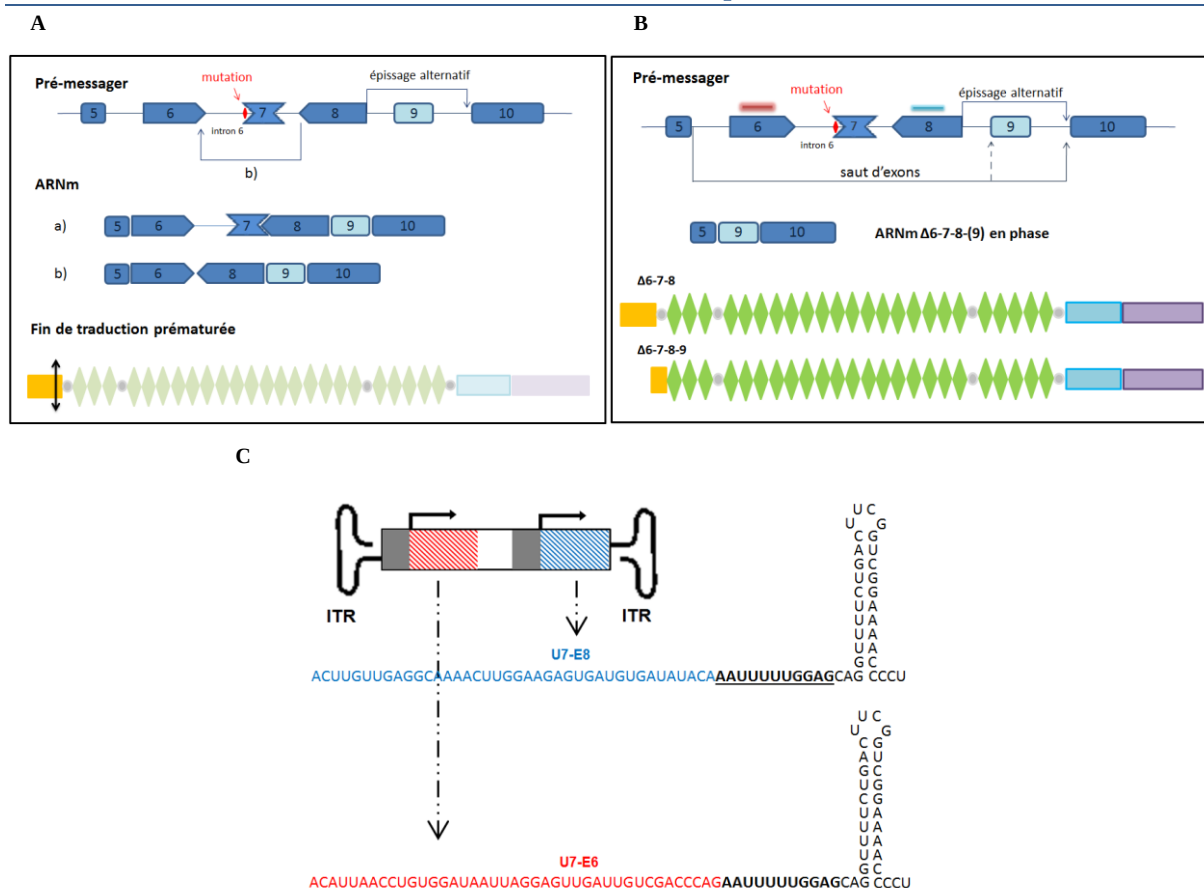


Figure 34 : Modèle de saut d'exon chez le chien *GRMD*. A: Représentation schématique de la mutation chez le chien *GRMD* qui provoque un décalage du cadre de lecture de l'ARN pré-messager *DMD*. L'exon 9 subit un épissage alternatif naturel. B: Représentation schématique de la stratégie de saut d'exon avec des séquences antisens ciblant un ESE dans l'exon 6 (antisens rouge) et un ESE dans l'exon 8 (antisens bleu). Les exons 6 à 8 ou 6 à 9 (puisque l'exon 9 est alternatif) sont exclus de l'ARNm dystrophine, ce qui permet une restauration du cadre de lecture et de la traduction de la protéine dystrophine (tronquée dans une petite partie en N-terminal). C: Représentation schématique du génome du vecteur AAVr-8-U7-E6/E8 et des U7snRNA-E6 et -E8 correspondants, constitués respectivement d'une séquence antisens spécifique de l'exon 6 (rouge) ou 8 (bleu), du transcrit dystrophine canin. Les expressions des U7snRNA-E6 et -E8 sont sous le contrôle du promoteur et des séquences régulatrices du U7snRNA murin naturel (rectangles gris). Les U7snRNA-E6/8 générés après transcription sont composés d'une séquence antisens E6 (rouge) ou E8 (bleu), d'un site de fixation aux protéines Sm (en gras) et d'une structure 3' en tige-boucle.

L'étude pré-clinique chez le chien a eu pour objectif de déterminer la dose thérapeutique, c'est-à-dire la dose minimale avec laquelle des améliorations moléculaires, histologiques et phénotypiques pouvaient être observées dans les muscles traités, et d'optimiser le protocole d'injection locorégionale. Les objectifs primaires de cette étude de dose étaient d'observer *i)* une restauration de l'expression du messager *DMD* et de la protéine dystrophine dans les muscles du membre injecté ; et *ii)* une correction du profil pathologique local dans les muscles du membre injecté. Les objectifs secondaires concernaient une série d'évaluations, notamment de la correction fonctionnelle du membre injecté, c'est-à-dire sa

force, de la biodistribution et de la dissémination du vecteur, ainsi qu'une évaluation des réponses immunitaires dirigées contre la capside du vecteur et contre la protéine dystrophine nouvellement formée. En effet, en parallèle de la détermination de la dose thérapeutique, l'étude pré-clinique chez le chien a permis de regrouper des premiers éléments concernant l'innocuité de l'approche.

Afin de répondre aux différents objectifs fixés, plusieurs cohortes de chiens *GRMD* ont été incluses au projet, avec des doses et des protocoles d'injections variables. Pour autant, chaque chien de l'étude a suivi un plan d'étude commun (figure 35).

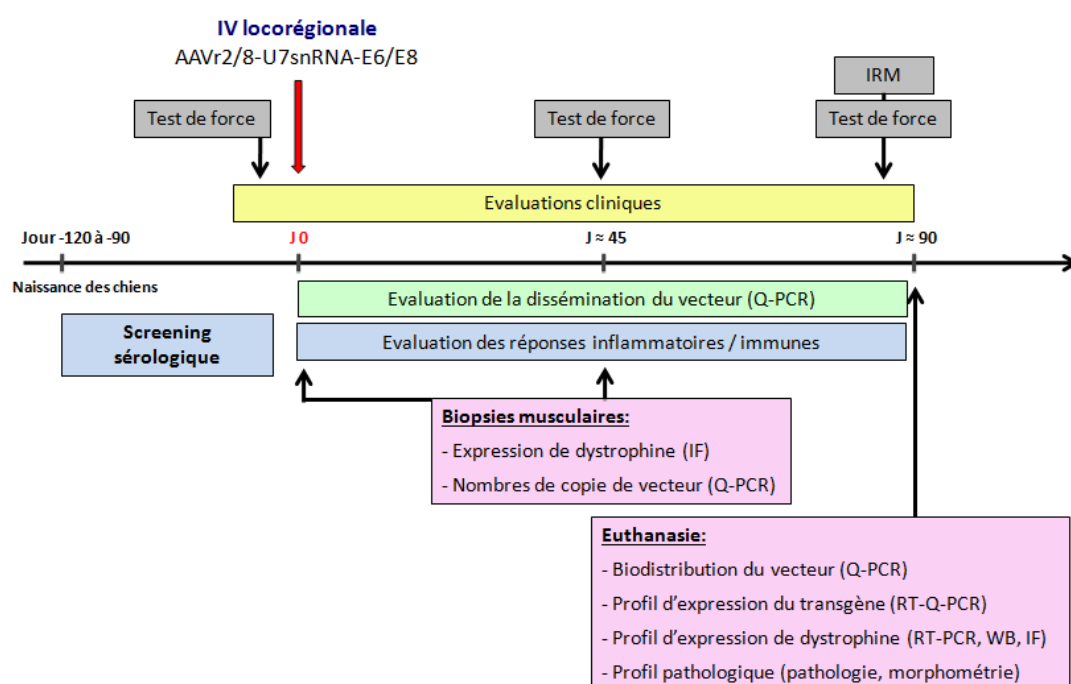


Figure 35 : Représentation schématique du plan d'étude suivi par chaque chien *GRMD* de l'étude pré-clinique DMD/U7. IV: intraveineuse ; IRM: imagerie à résonance magnétique ; Q-PCR: PCR quantitative ; IF: immunofluorescence ; RT-PCR: PCR à partir d'ARN rétro-transcrits ; WB: western blot.

Les différents lots de vecteur thérapeutique rAAV-8-U7-E6-E8 injectés aux chiens *GRMD* de cette étude ont été produits via le système Sf9/Baculovirus (bioréacteurs de 50 et 200L), avec purification sur colonne d'affinité.

Tous les chiens ont été injectés à l'âge de 3-4 mois dans un membre antérieur et suivis durant environ 90 jours après l'injection. Avant leur inclusion au protocole, le sérum des chiens a été testé pour exclure les chiens séropositifs à l'AAV8.

Le protocole d'injection, tel que décrit dans Le Guiner et al. 2014 (annexe), a donc consisté en une injection intraveineuse locorégionale dans membre antérieur. Pour cela, un garrot non traumatique est posé au niveau de l'articulation du coude, après exsanguination du membre. Le vecteur, dilué dans du ringer lactate (volume total équivalent à 40 ou 20% du volume du membre), est administré sous pression via un cathéter posé en distal au niveau de la veine céphalique. Le garrot est maintenu en place durant 15 min après l'injection, puis retiré, amenant la durée totale d'ischémie du membre à environ 30 minutes.

Lors de cette étude, des prélèvements sanguins (sang total, plasma, sérum) et des fluides corporels (urines, salive, fluides nasaux et lacrymaux) ont été prélevés tout au long du protocole afin de monitorer les réponses immunitaires et la dissémination du vecteur. Une biopsie musculaire a été prélevée avant l'injection, comme contrôle pré-traitement dans un membre inférieur ; puis des biopsies musculaires ont été prélevées à mi-protocole dans le membre injecté et le membre controlatéral, afin d'évaluer de façon précoce l'efficacité du transfert de gène.

Les études fonctionnelles des muscles des membres antérieurs ont consisté en des tests de force basés sur l'électrostimulation de certains muscles. Ces tests ont été réalisés avant l'injection, à mi-protocole et juste avant l'euthanasie des animaux. Une analyse par RMN (Résonance magnétique nucléaire) a également été réalisée sur les membres antérieurs des chiens, en fin de protocole, afin d'évaluer de façon plus globale le degré de correction et les améliorations histologiques musculaires (Thibaud 2007, Bonati 2015).

Les chiens ont donc été sacrifiés environ 90 jours après l'injection : chaque muscle des membres antérieurs (injectés et controlatéraux), un grand nombre d'autres muscles à distance (notamment le cœur et le diaphragme) ainsi que tous les organes majeurs, ont été prélevés pour la réalisation des analyses moléculaires et histologiques. Les cellules ont également été isolées de la rate et des ganglions lymphatiques pour la réalisation des analyses immunologiques.

Pour l'étude de dose, 1 chien a été injecté avec du tampon et 3 cohortes de chiens ont été injectées par voie intraveineuse locorégionale avec des doses croissantes d'AAVr-8-U7-E6/E8 : une dose faible de 5×10^{12} vg/kg (génomés viraux par kilogramme), une dose intermédiaire de 1×10^{13} vg/kg et une dose forte de 5×10^{13} vg/kg (groupes 1, 2 et 3 du tableau 2). En s'appuyant sur les résultats d'une équipe américaine parus en cours de cette étude de dose, nous avons modifié le protocole d'injection pour diminuer le volume d'injection de 40-45% à

20% du volume du membre. En effet, dans cette étude, il a été montré qu'une injection locorégionale dans le membre inférieur était bien supportée par les patients, mais dans la limite d'un volume correspondant à 20% du volume du membre. Au delà, un risque de pression élevée dans les loges musculaires (ischémie du membre = syndrome des loges) a été démontré chez ces patients (Fan 2012). Deux cohortes supplémentaires de chiens *GRMD* ont donc été incluses aux doses intermédiaire et forte (groupes 4 et 5 du tableau 2). Afin d'essayer d'optimiser l'homogénéité et l'efficacité de transduction, une injection avec un débit plus élevé (35 mL/min) a également été testée chez 3 chiens *GRMD* avec une dose intermédiaire (groupe 6 du tableau 2).

Afin d'estimer la restauration d'expression de la protéine dystrophine et les bénéfices fonctionnels apportés par une potentielle injection dans les deux avant-bras des patients *DMD* lors de l'essai clinique, une cohorte de chiens supplémentaire a été injectée dans les deux membres antérieurs (groupe 7 du tableau 2). Ces chiens ont donc reçu une dose totale de 1×10^{14} vg/kg (soit 5×10^{13} vg/kg dans chaque membre antérieur). Enfin, afin de mesurer l'effet thérapeutique au delà de 90 jours, un groupe de 3 chiens injectés également dans les deux membres antérieurs, a été suivi jusqu'à 6 mois après l'injection (groupe 8 du tableau 2). Dans ce groupe, les biopsies musculaires intermédiaires ont été réalisées à 90 jours environ après l'injection au lieu de 45 jours pour les autres groupes.

Introduction - Chapitre 5

Tableau 2 : Différentes cohortes de chiens GRMD incluses dans l'essai pré-clinique (adapté de Le Guiner 2014, en annexe).

Groupe	Chien	Nom	Volume d'injection (% du membre)	Type d'injection et dose	Débit d'injection (mL/min)	Lot d'AAVr injecté
Contrôle	C1	EBOUGE	40**	Tampon	19	N/A
Groupe 1	D1	FLOCON	40	AAVr-8-U7-E6/E8	8	STR18
	D2	FAKIR	40	5 ^E 12vg/kg	8	STR18
Groupe 2	D3	EPONGE	40**	AAVr-8-U7-E6/E8 1 ^E 13vg/kg	10	STR18
	D4	EBROSSE	40**		7	STR18
	D5*	GOUDA	40		12	A.10001
Groupe 3	D6	EIFFEL	40**	AAVr-8-U7-E6/E8 5 ^E 13vg/kg	20	STR16
	D7	EMOI	40**		20	A.10001.DEV
	D8	ETOC	40**		13	STR17
Contrôle	C2	FELIX	20	Tampon	10	N/A
	C3	FIASKO	20		10	N/A
Groupe 4	D9	FLUOR	20	AAVr-8-U7-E6/E8 1 ^E 13vg/kg	10	STR18
	D10	FREEDENT	20		10	STR18
	D11	FIXODAN	20		10	A.10001.DEV
	D12*	GUIMOV	20		10	A.10001
	D13	FAX	20		10	A.10001.DEV
Groupe 5	D14	FLIPPER	20	AAVr-8-U7-E6/E8 5 ^E 13vg/kg	10	A.10002.STD
	D15	FILOU	20		10	A.10001
	D16	GANDALF	20		35	STR18
Groupe 6	D17*	GOLLUM	20	AAVr-8-U7-E6/E8 1 ^E 13vg/kg	35	A.10002.DEV
	D18	GOSPEL	20		35	A.10002.DEV
	D19*	GRIZZLY	20		10	A.11009.DEV
Groupe 7	D20	GOOGLE	20	AAVr-8-U7-E6/E8 5 ^E 13vg/kg par membre Total: 1 ^E 14vg/kg	10	A.11009.DEV
	D21	HARIBO	20		10	A.12008.PSR
	D22	HALI	20		10	A.12008.PSR
	D23	HAÏKO	20		10	A.12008.PSR
Groupe 8	D24	HILLS	20	AAVr-8-U7-E6/E8 5 ^E 13vg/kg par membre Total: 1 ^E 14vg/kg	10	A.12008.PSR
	D25	HUTCH	20		10	A.12008.PSR

* Sacrifice anticipé ; ** % du volume du membre estimé (extrapolation à partir du volume injecté)

Les groupes surlignés en bleu ne font pas partie de la publication de Le Guiner et al. 2014.

Une grande partie des résultats de cette étude préclinique réalisée chez le chien *GRMD* a été publiée en 2014 dans « Molecular therapy » : Le Guiner et al. 2014 (annexe). L'ensemble de ces résultats a démontré l'efficacité et la sécurité de l'approche de thérapie de la DMD avec un AAVr-8-U7-E6/E8.

Le traitement a bien été toléré chez tous les chiens et aucun effet secondaire n'a été détecté. Une corrélation dose dépendante a été retrouvée entre les niveaux de saut d'exon et les pourcentages de fibres exprimant la dystrophine. Chez les chiens injectés à la plus forte dose, il a pu être montré que jusqu'à 80% de fibres musculaires expriment la dystrophine. Ces observations moléculaires étaient en corrélation avec les améliorations de la force et les améliorations du contexte pathologique en histologie et en RMN. La dose thérapeutique efficace a été définie comme étant la dose forte de 5×10^{13} vg/kg, et le mode d'injection retenu est celui consistant en une administration du vecteur dilué dans un volume correspondant à 20% du volume du membre. Les résultats sur les chiens *GRMD* injectés avec une pression supérieure de 35 mL/min n'ayant pas montré d'effets thérapeutiques significativement plus élevés, le débit d'injection à utiliser lors de la translation clinique de ce projet a été fixé à 10 mL/min.

Une partie de ces résultats ayant fait l'objet de mon travail de thèse sera davantage détaillée dans ce manuscrit (*résultats partie 1*), et complétée avec des résultats à ce jour non publiés.

C- Le projet pré-clinique DMD/U7 : études de toxicologie

Suite à la détermination de la dose thérapeutique (définie ci-dessous comme la dose 1X) et du protocole d'injection chez le chien, une première étude de toxicologie a été réalisée sur des rats mâles sains injectés par voie intraveineuse. Comme pour toute étude de toxicologie, c'est le produit clinique (AAVr-8-U7-Dtex53, optimisé pour le saut de l'exon 53 du transcrit dystrophine humain (figure 36, voir partie D-)) qui a été injecté à ces animaux. L'AAVr-U7 injecté aux rats a été produit selon exactement le même procédé et avec la même formulation finale que le produit clinique. Un total de 140 rats a été injecté à des doses de 5×10^{13} (1X), 2.5×10^{14} (5X) et 5×10^{14} (10X) vg/kg et euthanasié à 7, 45 ou 90 jours après l'injection (tableau 3).

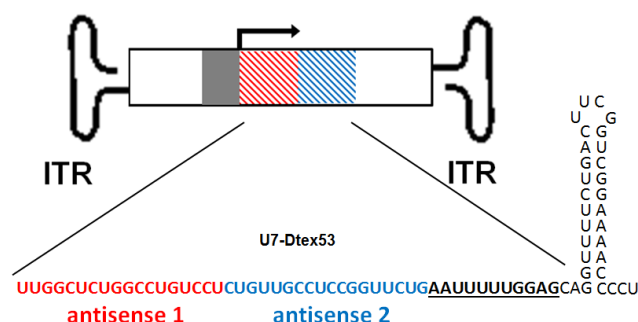


Figure 36 : Représentation schématique du génome du vecteur AAVr-8-U7-Dtex53 et de l'ARN U7snRNA-Dtex53 correspondant, constitué d'une séquence antisens double cible (Dt, double target) spécifique de deux régions de l'exon 53 du transcrit *DMD* humain (séquence « Dtex53 »). L'expression du U7snRNA-Dtex53 est sous le contrôle du promoteur et des séquences régulatrices du U7snRNA murin naturel (rectangle gris). Le U7snRNA-Dtex53 généré après transcription est composé de la séquence antisens Dtex53 double cible (rouge et bleu), d'un site de fixation aux protéines Sm (en gras) et d'une structure 3' en tige-boucle.

Tableau 3: Récapitulatif des rats inclus dans l'étude de toxicologie

Dose	Tampon	1X (5E13 vg/kg)	5X (2,5E14 vg/kg)	10X (5E14 vg/kg)
Animaux sacrifiés à 7 jours post injection	n=10	n=10	n=10	n=10
Animaux sacrifiés à 45 jours post injection	n=10	n=10	n=10	n=10
Animaux sacrifiés à 90 jours post injection	n=15	n=15	n=15	n=15

L'objectif principal de cette étude était d'évaluer la potentielle toxicité du vecteur, à différentes doses et avec différents temps de suivis post-injection : une éventuelle toxicité aigüe, à 7 jours post-injection et une éventuelle toxicité à plus long-terme, à 90 jours post-injection. L'injection locorégionale d'un membre supérieur n'étant pas adaptable chez le rongeur, le choix a été fait d'utiliser une injection intraveineuse simple. De multiples analyses ont été réalisées telle que la mesure du taux de mortalité, des observations cliniques, fonctionnelles et neurocomportementales, des mesures de température corporelle, de poids et de prise de nourriture, des examens ophtalmologiques, ainsi que des analyses hématologiques et sanguines, notamment. Au sacrifice, une analyse macroscopique des organes a été faite, de même qu'une analyse histopathologique et de biodistribution (sang, organes et sperme).

En parallèle, une seconde étude de toxicologie, a été réalisée chez des primates non-humains (*Macaca fascicularis*) sains, séronégatifs pour l'AAV8, injectés avec le même produit AAVr-8-U7-Dtex53, par voie intraveineuse locorégionale selon le même protocole

d'injection que celui prévu chez les patients. Dix-huit macaques ont été injectés à une dose de 2.5×10^{14} vg/kg (5X) dans un ou deux membres antérieurs et ont été euthanasiés 7 ou 90 jours après l'injection (tableau 4). L'objectif principal de cette étude chez le primate était d'évaluer la tolérance de l'administration par voie locorégionale chez un modèle animal pertinent et de réaliser des études de biodistribution et de dissémination du vecteur *in situ*.

Une étude de biodistribution a été réalisée chez les primates non-humains en complément de l'étude bien moins exhaustive chez les rats. Des examens pour évaluer la toxicité du vecteur ont aussi été effectués chez les primates.

Tableau 4 : Récapitulatif des primates inclus dans l'étude de toxicologie

	Injection de tampon (2 membres)	Injection AAVr-U7 (1 membre)	Injection AAVr-U7 (2 membres)
Dose	N/A	2.5×10^{14} vg/kg (5X)	2 x 2.5×10^{14} vg/kg (2 x 5X)
Animaux sacrifiés à 7 jours post-injection	n=3	n=3	n=3
Animaux sacrifiés à 90 jours post-injection	n=3	n=3	n=3

Pour l'ensemble de ces animaux, des prélèvements sanguins et des fluides corporels ont été effectués tout au long du protocole pour évaluer les réactions immunitaires et la dissémination du vecteur. Au sacrifice, une évaluation histologique permettant de mettre en évidence les lésions éventuelles du tissu et des analyses moléculaires ont été réalisées. Ces analyses moléculaires n'ont concerné que les neuf primates euthanasiés à 90 jours et ont consisté en *i)* une analyse complète de la biodistribution du vecteur dans les tissus et le sang, *ii)* une analyse de l'expression du transgène U7-Dtex53 dans certains tissus et *iii)* une analyse du saut de l'exon 53 dans les mêmes tissus.

Alors qu'elle avait été planifiée, une analyse de biodistribution du vecteur n'a pas pu être réalisée dans le sperme car les primates inclus dans l'étude n'avaient malheureusement pas atteint leur maturité sexuelle. Ces études auraient pourtant permis d'estimer les risques de transmission verticale du transgène.

Chez les rats et chez les primates, aucune mortalité ni aucun signe de toxicité clinique ou histologique n'a été observé. Chez les primates, le mode d'injection par voie locorégionale

a été très bien toléré. Une partie des analyses réalisées chez le primate a fait l'objet de mon travail de thèse et sera présentée dans ce manuscrit (*résultats, partie 1*).

D- L'essai clinique DMD/U7 de phase I/II prévu en 2016

Comme nous venons de l'évoquer, pour les essais chez l'Homme, il a été décidé de cibler l'exon 53 pour restaurer le cadre de lecture du transcrit dystrophine humain (U7-Dtex53 pour les études de toxicologie). Cette correction s'appliquerait à environ 8% des patients DMD (revoir tableau 1, *Chapitre 3*). L'exon 51, dont le saut bénéficierait à au moins 13% des patients DMD, aurait également pu être un choix de cible. Mais, dans la mesure où plusieurs essais cliniques sont déjà en cours pour tester la correction de dystrophine après saut de l'exon 51 chez les patients (essais avec les 2'OMe et PMO dont les phases I/II ont débuté en 2007 et 2009 respectivement), notre choix s'est plutôt porté sur l'exon 53.

L'essai de phase I/II sera une étude avec escalade de doses chez 9 patients DMD non ambulants (3 cohortes de 3 patients, injectés à des doses de 2^e12, 1^e13 et 5^e13 vg/kg). Les patients, séronégatifs pour l'AAV8, ont été recrutés dans divers pays d'Europe et ont déjà tous été préalablement inclus dans un essai, nommé pré-U7, qui vise à caractériser l'évolution naturelle de la maladie chez chaque patient, avant une éventuelle inclusion dans l'essai DMD/U7 thérapeutique.

L'objectif principal de cet essai de phase I/II sera d'évaluer l'innocuité, la tolérance et la pharmacodynamie du vecteur AAVr-8-U7 après injection locorégionale dans un membre supérieur. En parallèle, l'efficacité du produit sera évaluée (expression de la protéine dystrophine, tests de force, correction de paramètres histologiques et RMN), de même que les éventuelles réponses immunitaires contre le vecteur AAVr ou la protéine dystrophine néo-synthétisée. Il est également envisagé d'injecter les patients dans les deux membres supérieurs si les résultats obtenus chez les patients de la 1^{ère} ou de la 2^{ème} cohorte démontraient une innocuité et une efficacité suffisantes.

E- Objectifs de mon travail de thèse

Dans le cadre de ce large projet, mon implication personnelle, s'est portée sur l'étude de biodistribution des chiens *GRMD* injectés par voie locorégionale et sur l'évaluation du profil d'expression de la dystrophine, par la mise en évidence du saut d'exon dans les différents

tissus des chiens traités. Ces travaux ont été effectués sur l'ensemble des cohortes de chiens décrites dans la publication de Le Guiner et al. 2014, ainsi que sur les cohortes de chiens rajoutées par la suite (tableau 2).

En parallèle, la première phase de mes travaux de thèse a été consacrée à la caractérisation de l'activité moléculaire des transgènes U7snRNA optimisés pour le saut d'exon, à la fois *i)* dans le cadre de l'étude pré-clinique chez les chiens, *ii)* dans le cadre de l'étude de toxicologie chez les primates et *iii)* dans le contexte humain (*in vitro*), en prévision de l'essai clinique.

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'expression des transgènes U7snRNA-E6/8, injectés chez les chiens *GRMD* et U7snRNA-Dtex53, injecté chez les primates non-humains, puisqu'un des objectifs des étapes pré-cliniques était d'évaluer le profil d'expression du transgène dans l'ensemble de l'organisme, après injection du vecteur thérapeutique. Cette analyse est clé, notamment dans les tissus dans lesquels un grand nombre de copies du transgène est retrouvé, ceci afin de rechercher une éventuelle expression ectopique de notre produit. Les profils d'expression différentiels des transgènes U7snRNA entre le muscle et un tissu non ciblé par la thérapie, le foie, ont particulièrement attirés notre attention.

Avec la perspective de l'essai clinique chez les patients DMD et afin d'anticiper l'impact de l'expression ectopique du produit U7snRNA chez l'Homme, nous nous sommes également intéressés à la caractérisation de l'activité moléculaire du produit clinique U7 dans un contexte humain. Le premier objectif a été de développer des modèles cellulaires humains, pertinents pour mimer les contextes musculaires et hépatiques. Puis, nous avons évalué l'expression du produit clinique U7snRNA dans ces modèles cellulaires, en tenant compte des limites apportées par une telle approche *in vitro*.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, l'objectif a été d'envisager et de documenter, le plus exhaustivement possible, les potentiels effets off-targets de notre produit thérapeutique, dans le contexte humain. En effet, comme nous l'avons évoqué dans le *Chapitre 4*, une hybridation non-spécifique de la séquence antisens du U7snRNA optimisé pourrait modifier l'expression de messagers non ciblés, et avoir des conséquences importantes sur la toxicité du traitement après administration chez l'Homme.

Nous avons tout d'abord recherché les potentielles cibles off-targets du U7snRNA clinique par une simple approche *in silico*. Puis, dans un second temps, nous avons *i)* précisément défini les critères qui, selon nous, permettraient de caractériser les cibles off-targets de notre

U7snRNA thérapeutique et *ii*) entrepris une analyse transcriptomique complète, par RNA sequencing, pour mettre en évidence ces potentielles cibles dans les modèles cellulaires humains que nous avons établis.

En parallèle de ces travaux, j'ai également réalisé les analyses moléculaires et participé à une étude pilote d'injection d'AAV8-U7snRNA-E6/E8 par voie intraveineuse systémique chez un chien *GRMD*. Ces travaux (non publiés) ont mis en évidence la faisabilité d'une telle approche. Ces résultats, encore très préliminaires, et n'étant pas directement reliés au développement de l'essai clinique prévu en 2016, ne seront pas présentés dans ce manuscrit.

RESULTATS

PARTIE 1 :

Etude des profils d'expression de U7snRNA optimisés pour le saut d'exon du messenger DMD

A- Profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 chez le chien GRMD

1) Profil de transduction et efficacité thérapeutique de l'injection locorégionale d'un vecteur AAVr-8-U7-E6/E8 chez le chien GRMD

a- Biodistribution du vecteur AAVr-8-U7-E6/E8

Afin d'évaluer la transduction globale du vecteur AAVr-8-U7-E6/E8 dans l'organisme des chiens injectés par voie locorégionale, une étude complète de sa biodistribution a été réalisée. Après le sacrifice des animaux (à ≈ 3 mois post-injection), l'ADN des 13 muscles des membres antérieurs injectés et controlatéraux, ainsi que de plusieurs muscles à distance (45 muscles au total) a été analysé par une PCR quantitative (QPCR) spécifique du génome du vecteur AAVr-8-U7. Le nombre de génomes viraux par génomes diploïdes (vg/dg pour vector genome per diploid genome), est ainsi déterminé dans chaque muscle et augmente proportionnellement à la dose injectée. Des échantillons de sang total ont été analysés en parallèle et aucune particule virale n'est détectée (vg/dg < 0.004) ce qui signifie que la positivité des tissus à l'euthanasie n'est pas due à une contamination par le sang (Le Guiner 2014 en annexe).

Dans les muscles des membres injectés, on retrouve en moyenne moins de 1 vg/dg chez les chiens injectés à la dose faible ($5^{\circ}12\text{vg/kg}$) ; 1 à 3 vg/dg pour les chiens à la dose intermédiaire ($1^{\circ}13\text{vg/kg}$) et de 3 à 15 vg/dg dans les muscles des chiens injectés avec la plus forte dose de vecteur ($5^{\circ}13\text{vg/kg}$) (figure 37). Puisque le garrot n'empêche pas totalement la fuite du vecteur à travers le corps, des copies de vecteurs sont également retrouvées dans les muscles juste au-dessus du garrot et ceux plus à distance, notamment dans le cœur et le diaphragme, mais toujours avec une transduction au moins 10 fois inférieure à celle observée sous le garrot.

Les mêmes analyses ont également été réalisées dans certains organes majeurs, tels que la rate, les testicules, les reins, le foie et les ganglions lymphatiques drainants et non-drainants. Le foie, et dans une moindre mesure la rate et les ganglions lymphatiques, montrent des vg/dg quasiment aussi élevés que dans les muscles injectés (figure 37).

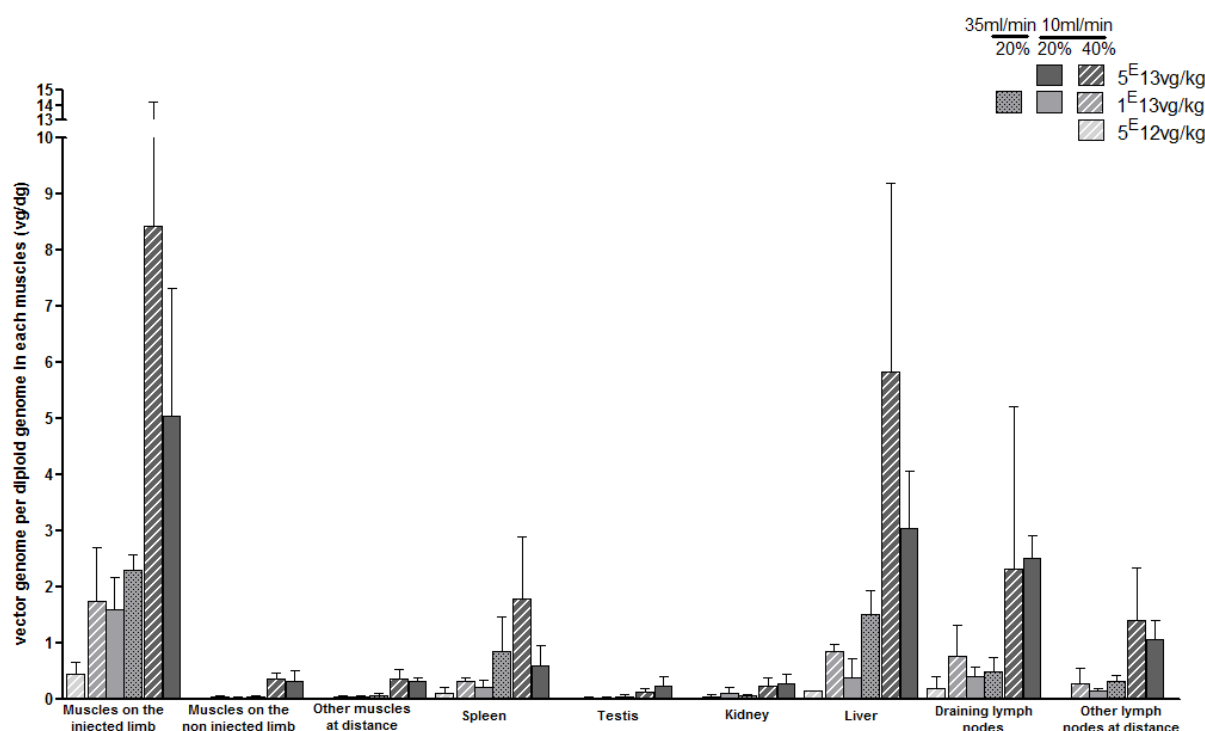


Figure 37 : Profil de biodistribution du vecteur AAVr-8-U7-E6/8 dans les muscles injectés et à distance. Les données représentent le nombre de copies de vecteur en génomes viraux par génomes diploïdes (vg/dg) dans différents tissus obtenus à l'euthanasie des chiens injectés. Pour chaque chien, l'analyse a été faite sur 13 muscles du membre injecté, 13 muscles du membre controlatéral, 20 muscles à distance (donc le cœur (n=2) et le diaphragme), la rate, les testicules (n=2), le rein, le foie (n=3) et les ganglions lymphatiques drainants (n=2) et à distance (n=5). Sont représentés la moyenne et la déviation standard des résultats obtenus pour les chiens d'une même cohorte.

b- Restauration de l'expression de dystrophine dans les muscles des chiens injectés

Un des objectifs primaires du projet pré-clinique DMD/U7 chez les chiens *GRMD* injectés a consisté en l'évaluation de la restauration de l'expression de dystrophine dans les muscles du membre injecté par voie locorégionale. Nous avons dans un premier temps évalué l'efficacité du saut d'exon au niveau du messager *DMD*.

Pour chaque chien, les ARN issus de 2 muscles du membre injecté, ainsi que les ARN des deux mêmes muscles du membre controlatéral, du diaphragme et du cœur, ont été rétro-transcrits et amplifiés par RT-PCR nichée avec des amorces situées dans les exons 3 et 10 du messager *DMD* canin (figure 38 issue de Le Guiner et al. 2014). Pour les chiens injectés avec les doses intermédiaires et fortes (figure 38 B,C), deux bandes correspondant aux messagers *DMD* sans les exons 6, 7, 8 ou 6, 7, 8 et 9 (l'exon 9 subissant naturellement un épissage alternatif) sont observées dans les muscles injectés aux tailles attendues de 436 et 304 pb respectivement. Le saut des exons 6 à 8 (± 9) est également observé dans les muscles du membre controlatéral ainsi que dans le cœur et le diaphragme, uniquement chez les chiens

injectés avec la dose la plus forte (figure 38 C). Chez ces chiens, le messager *DMD* sans saut d'exon (bandes à 791 et 659 pb, avec ou sans exon 9) n'est d'ailleurs quasiment plus détectable dans les muscles injectés, suggérant une efficacité de saut d'exon de près de 100%. Par contre, le saut d'exon n'est pas détectable chez les chiens injectés avec la dose faible (figure 38 A). Le niveau de saut d'exon détectable par la technique (non quantitative) de RT-PCR nichée corrèle avec le nombre de vg/dg retrouvé dans le muscle correspondant (sous chaque panel).

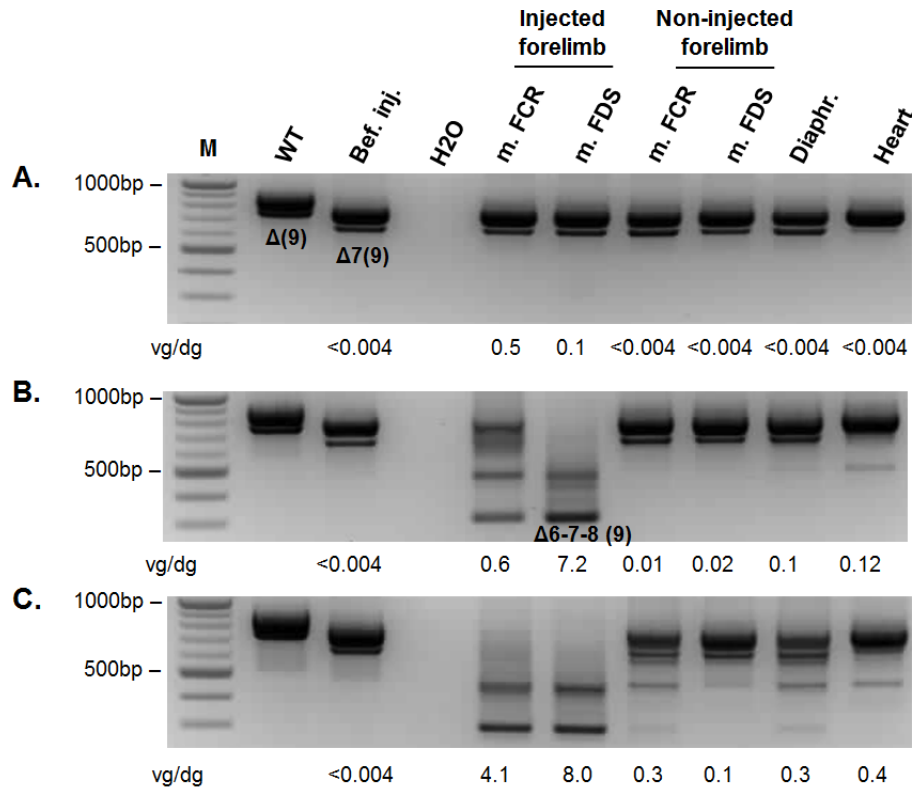


Figure 38 : Analyse du saut d'exon au niveau du messager *DMD* dans les muscles des chiens injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-E6/E8. Le messager *DMD* est détecté par RT-PCR nichée amplifiant de l'exon 3 à l'exon 10, après extraction de l'ARN des muscles squelettiques prélevés à l'euthanasie (m. FCR = muscle flexor carpi radialis et m. FDS = muscle flexor digitorum superficialis), dans le diaphragme et le cœur. Les résultats présentés pour 1 chien de chaque dose sont représentatifs de ceux obtenus chez tous les chiens injectés aux mêmes doses : la dose faible, 5^e12 vg/kg (A), la dose intermédiaire, 1^e13 vg/kg (B) ou la dose forte, 5^e13 vg/kg (C). Des produits PCR de 910 et 778 pb (avec ou sans l'exon 9) sont détectés chez le chien WT. Les produits PCR (791 et 659 pb) détectés chez le chien *GRMD* avant injection correspondent aux ARNm sans l'exon 7 ou sans les exons 7 et 9, respectivement. Après injection, deux nouveaux produits PCR apparaissent (436 et 304 pb) dans certains muscles. Ils correspondent aux ARNm en phase dans lesquels il manque les exons 6 à 8 ou 6 à 9, respectivement. Les nombres de copies en vg/dg obtenus par analyse Q-PCR sur les ADNg des mêmes muscles sont indiqués sous chaque panel.

En parallèle, la restauration de l'expression de dystrophine a été évaluée par des marquages immunohistochimiques (Le Guiner et al. 2014 en annexe). La dystrophine

tronquée au niveau de sa zone N-terminale est retrouvée exprimée et correctement localisée au sarcolemme. Chez les chiens injectés à la plus faible dose, seulement 18% de fibres positives pour la dystrophine sont retrouvées. Pour les chiens injectés avec la dose intermédiaire, on retrouve, selon le protocole d'injection utilisé, 25, 35 et 36% de fibres positives pour les groupes 4, 2 et 6 respectivement. Pour les chiens injectés avec la dose forte de vecteur, le nombre de fibres positives pour la dystrophine est significativement plus élevé (58 et 76% pour les groupes 5 et 3, injectés respectivement avec des volumes d'injection correspondant à 20 et 40% du volume du membre).

Grâce à la corrélation entre le nombre de vg/dg et le pourcentage de fibres positives pour la dystrophine, il est possible d'estimer qu'1 vg/dg permet la restauration de dystrophine dans environ 40% des fibres musculaires.

Enfin, des analyses par western blot ont permis de confirmer la présence de la protéine dystrophine dans les muscles injectés des chiens, à une taille d'environ 405 kDa (Le Guiner et al. 2014 en annexe).

c- Les améliorations histologiques et fonctionnelles chez les chiens injectés

En parallèle des analyses moléculaires, une évaluation de la correction pathologique *in situ* a été menée. Les analyses histologiques et RMN montrent une amélioration du profil pathologique musculaire dans le membre injecté, par rapport au membre controlatéral, avec notamment une diminution de la fibrose, endomysiale et totale, une diminution des marqueurs de régénération musculaire, ainsi qu'une amélioration d'un grand nombre de paramètres RMN (Le Guiner et al. 2014 en annexe).

Une augmentation significative de la force dans le membre injecté a également été mise en évidence pour les muscles ayant au moins 40% de fibres positives pour la dystrophine (Le Guiner et al. 2014 en annexe).

2) *Analyse des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8*

En parallèle de l'analyse du profil de transduction et de l'efficacité thérapeutique de l'injection locorégionale d'un vecteur AAVr-8-U7-E6/E8 chez le chien *GRMD*, une grande partie de ce travail de thèse a consisté en la caractérisation précise des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 dans les tissus des chiens injectés.

Dans plusieurs organes, et en particulier dans le foie, le nombre de vg/dg retrouvé est similaire à celui retrouvé dans les muscles injectés. Notre attention s'est donc portée sur le foie, en plus bien sûr des tissus musculaires, tissus cibles de notre approche thérapeutique.

Les profils d'expression et l'activité moléculaire des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 ont été analysés par 3 techniques différentes : la RT-QPCR et le Northern blot pour évaluer leurs niveaux d'expression, et la RT-PCR nichée pour mettre en évidence leur efficacité moléculaire.

a- Analyse des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 par RT-QPCR

Nous avons déterminé les profils d'expression de chacun des deux transgènes U7-E6 et U7-E8 (revoir figure 34 C), par deux RT-QPCR spécifiques, dans le foie et les muscles (2 muscles du membre injecté et 1 muscle du membre controlatéral) des chiens *GRMD* injectés. La figure 39 A représente les résultats obtenus pour les 8 chiens injectés avec un volume correspondant à 40% du volume du membre (groupes 1, 2 et 3, cf. tableau 2). Ces résultats sont représentatifs de ceux obtenus aux mêmes doses pour l'ensemble des 25 chiens *GRMD* injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-E6/E8 dans ce projet pré-clinique.

Dans les muscles du membre injecté (INJ), nous observons une expression dose-dépendante des deux transgènes U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8. L'expression des U7snRNA dans les muscles non injectés (N INJ) du membre controlatéral n'est visible que chez les chiens injectés à la forte dose de vecteur. Aucune expression n'est détectée pour les chiens injectés avec la dose la plus faible (5^e12 vg/kg) ce qui est cohérent avec le nombre de vg/dg moyen retrouvé dans ces muscles et les résultats de RT-PCR nichée sur le messenger *DMD* obtenus chez ces chiens, pour lesquels aucun saut d'exon n'était observé (revoir figure 38). Ces deux transgènes sont donc exprimés et complètement actifs dans les muscles des chiens injectés, à partir du moment où la dose injectée est au moins de 1^e13 vg/kg. On notera tout de même que

chez tous les chiens, le U7snRNA-E6 semble légèrement plus exprimé que le U7snRNA-E8 (figure 39 A).

Dans le foie des chiens injectés, la quantification relative de l'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 est clairement plus faible que dans les muscles injectés, et ce malgré des nombres de vg/dg relativement similaires : 5,3 pour les muscles injectés et 5,9 pour le foie dans le groupe de chiens injectés à dose forte (5×10^{13} vg/kg). Dans les deux autres groupes, l'expression des U7snRNA dans le foie n'est même pas détectable par RT-QPCR.

Aucune expression de ces U7snRNA n'est détectée dans les muscles squelettiques et les foies des chiens *GRMD* non injectés (non montré).

Afin de pouvoir comparer l'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 dans les muscles injectés et dans le foie des chiens, nous avons calculé le ratio RQ/vg qui permet une normalisation de l'expression des transgènes par le nombre de vg/dg détecté dans chaque tissu. Avec une telle normalisation, les variations de dose ou du protocole d'injection utilisés sont lissées. Cela nous a permis de comparer directement l'expression des U7snRNA entre les muscles et les foies pour tous les chiens injectés avec les doses intermédiaire et forte (n=16 chiens) (figure 39 B). Les chiens de la dose faible n'ont pas été inclus dans cette compilation puisqu'aucune expression n'est détectée dans leurs tissus.

Avec cette représentation, nous confirmons que les deux transgènes U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 sont faiblement exprimés dans le foie des chiens injectés et qu'ils sont significativement ($p < 0.01$) moins exprimés dans le foie que dans les muscles squelettiques. Par contre la légère différence d'expression entre le U7snRNA-E6 et le U7snRNA-E8 n'est pas significative (quel que soit le tissu).

Résultats - Partie 1

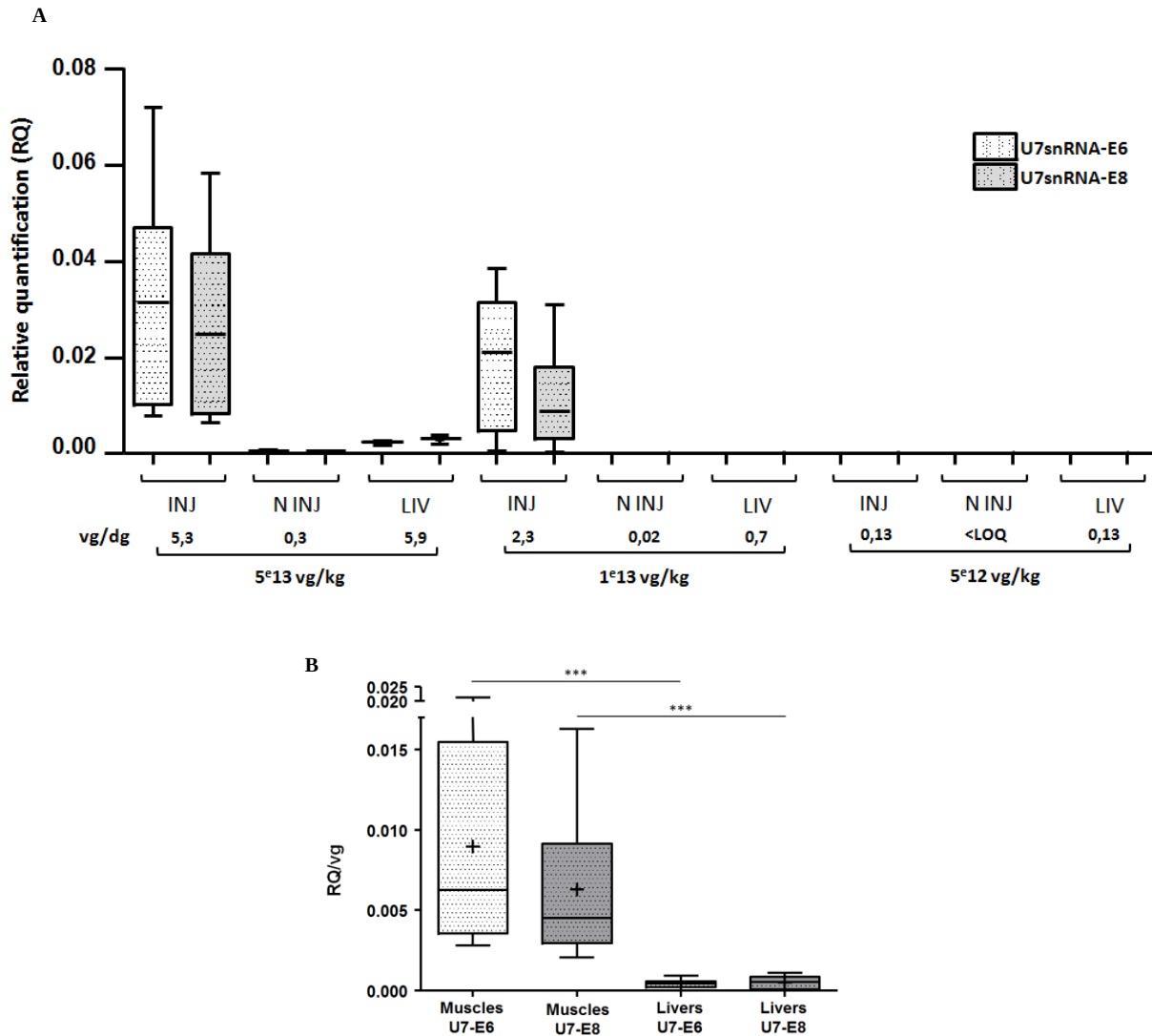


Figure 39 : Quantification par RT-QPCR de l'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 dans les tissus des chiens *GRMD* injectés avec différentes doses du vecteur AAVr-8-U7-E6/E8. A: Quantification relative (RQ) du U7snRNA-E6 (barres blanches) et du U7snRNA-E8 (barres grises) dans les tissus des chiens *GRMD* injectés. Les résultats représentent les RQ (la valeur médiane (barre centrale), les 1^{er} et 3^{ème} quartiles (boîtes) et les 1^{er} et 9^{ème} déciles (moustaches)) obtenues chez les chiens injectés dans un membre antérieur à un volume correspondant à 40% du volume du membre avec la dose de 5^e13 vg/kg (n=3), 1^e13 vg/kg (n=3) ou 5^e12 vg/kg (n=2). Pour chaque chien, l'analyse a été réalisée sur 2 muscles (m.FDS = muscle flexor digitorum superficialis et m.FCR = muscle flexor carpi radialis) du membre injecté (INJ), 1 muscle (m.FDS) du membre non injecté (N INJ) et le foie (lobe droit, LIV). Les chiffres indiqués sous chaque panel correspondent à la moyenne des vg/dg obtenus dans les mêmes tissus des mêmes chiens. LOQ : limit of quantification (<0.004). B: Ratios entre les RQ obtenus pour U7snRNA-E6 (barres blanches) ou U7snRNA-E8 (barres grises) et le nombre de vg/dg pour chaque échantillon analysé. Les données représentent les ratios RQ/vg (la valeur médiane (barre centrale), la valeur moyenne (croix), les 1^{er} et le 3^{ème} quartiles (boîtes) et les 1^{er} et 9^{ème} déciles (moustaches)) pour l'ensemble des 16 chiens injectés à la dose intermédiaire (groupes 2, 4 et 6) et à la dose forte (groupes 3 et 5). Statistiques: Test non paramétrique de Wilcoxon pour les données appariées, *** p< 0.01

b- Analyse des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 par Northern blot

Afin de confirmer ces résultats par une deuxième méthode analytique, nous avons réalisé des Northern blots, spécifiquement développés pour la visualisation, grâce à des sondes radio-marquées au ^{32}P , des petits ARN (les U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 ayant des tailles respectives de 84 et 82 pb). Les analyses ont été réalisées sur des ARN issus des muscles des membres injectés et des foies de 3 chiens injectés à la dose forte (groupe 3) et d'un chien *GRMD* contrôle non injecté (figure 40). Pour chaque chien injecté, ont été analysés un muscle squelettique et un lobe de foie présentant approximativement le même nombre de vg/dg (environ 8.5 vg/dg pour le chien Etoc, environ 10 vg/dg pour le chien Eiffel et environ 4.5 vg/dg pour le chien Emoi). Les mêmes ARN ont à chaque fois été hybridés avec une sonde spécifique des U7snRNA-E6 et -E8 (la même sonde reconnaissant les deux U7snRNA) et une sonde spécifique des ARN ribosomiaux (ARNr) 5S, afin de réaliser une normalisation. Les analyses n'ont pas pu être réalisées sur les chiens injectés aux doses plus faibles car les niveaux d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 étaient trop peu élevés pour être détectés en Northern blot.

Aucun signal correspondant aux U7snRNA n'est détecté dans les tissus du chien *GRMD* non injecté. Par contre, une bande de forte intensité correspondant aux deux U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 est détectée dans les muscles des 3 chiens injectés, avec un léger effet dose observable quand 10 ou 20 μg d'ARN sont chargés. Dans le foie par contre, seul un très léger signal est observé chez les 3 chiens injectés, alors que les ARNr 5S sont présents en quantité normale.

La normalisation par les ARNr 5S a été utilisée pour vérifier la quantité d'ARN chargée dans chaque puits et nous a permis de quantifier l'expression relative des U7snRNA-E6/8 entre les 2 tissus analysés, grâce à l'outil Genetools qui s'appuie sur une quantification de l'intensité des bandes révélées sur le Northern blot. Cette quantification relative nous a permis de montrer que les U7snRNA-E6/8 sont 13 fois plus exprimés dans le muscle squelettique que dans le foie des chiens traités (ratio U7/5S = 1.19 dans le muscle et 0.009 dans le foie) (résultats non montrés). Ces résultats sont en corrélation avec les résultats obtenus en RT-QPCR.

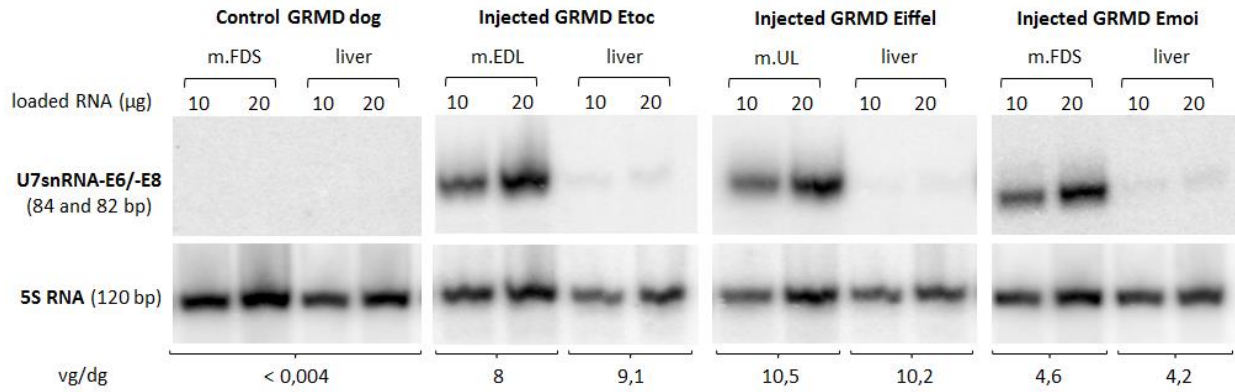


Figure 40: Quantification relative par Northern blot de l'expression des U7snRNA-E6 et -E8 dans les tissus des chien *GRMD* injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-E6/E8. L'expression des deux U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 est analysée dans les muscles (m. FDS = muscle flexor digitorum superficialis, m. UL = muscle ulnaris lateralis et m. EDL = muscle extensor digitorum lateralis) et dans le foie (lobe droit) d'un chien *GRMD* contrôle non injecté et de 3 chiens injectés avec la dose forte (5e13 vg/kg) et présentant approximativement le même nombre de vg/dg dans ces 2 types de tissus. L'hybridation a été réalisée avec des sondes radio-marquées au ³²P et spécifiques des transgènes U7snRNA-E6 et -E8 d'une part (panels du haut) et de l'ARNr 5S d'autre part (panels du bas). Pour chaque ARN, 10 et 20µg d'ARN ont été chargés.

c- Analyse de l'activité moléculaire des U7snRNA-E6-E8 par RT-PCR nichée

Pour compléter l'analyse des profils d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 obtenus par RT-QPCR et Northern blot, nous avons voulu connaître leur activité moléculaire en analysant le saut d'exon engendré sur le messenger *DMD* canin, par des RT-PCR nichées réalisées sur les mêmes tissus des 4 chiens analysés dans l'approche Northern blot (figure 41).

On notera tout d'abord que nous avons été surpris de détecter la présence du messenger *DMD* dans les échantillons de foie chez tous nos chiens *GRMD* contrôle ou *GRMD* traités (résultats validés par séquençage du produit PCR), dans la mesure où le messenger amplifié grâce à cette RT-PCR est le messenger *DMD* complet correspondant à la protéine Dp427. En effet, cette isoforme n'est pas connue pour être exprimée dans le foie (contrairement à l'isoforme Dp71). De plus, dans le foie, la forme majoritaire du messenger *DMD* semble être celle sans l'exon 9 (659 pb), alors que dans le muscle, c'est l'inverse : la forme avec l'exon 9 (791 pb) est plus présente (figure 41).

Quoiqu'il en soit, comme déjà évoqué précédemment, un saut des exons 6 à 8 très efficace est détecté dans les muscles injectés de ces 3 chiens injectés avec la forte dose de vecteur, comme en témoigne la présence des deux bandes de 436 et 304 pb (avec ou sans exon 9). Chez le

chien Eiffel, le saut d'exon est tellement important dans les muscles que le transcrit avec exon 9 (436 pb) n'est même quasiment plus visible (figure 41).

Malgré un niveau de vg/dg très élevé (9.1, 10.2 et 4.2 vg/dg pour les chiens Etoc, Eiffel et Emoi, respectivement), aucun saut d'exon n'est visible dans les échantillons de foie. Seules les 2 bandes correspondant aux messagers *DMD* sans saut d'exon (791 et 659 pb) sont détectables. Ces résultats sont cohérents avec les précédentes analyses qui montraient un défaut d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 dans le foie de ces animaux par rapport à leur muscle squelettique. Même une petite expression résiduelle dans le foie de certains animaux (cf figure 39) n'est pas suffisante pour induire un saut d'exon détectable en RT-PCR nichée.

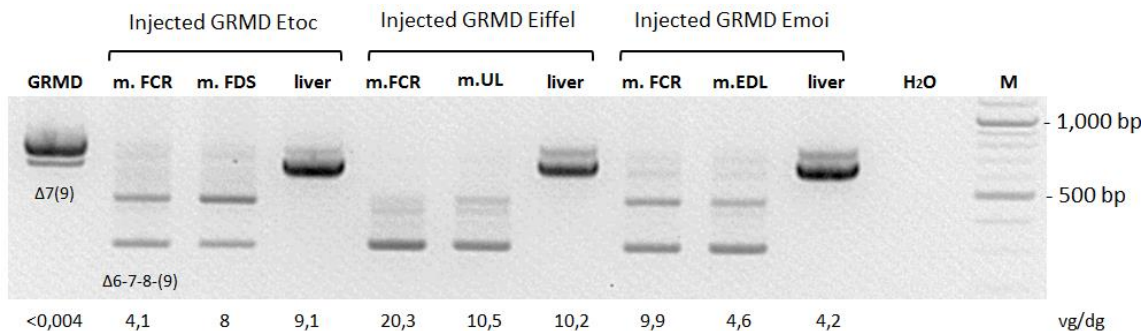


Figure 41 : Analyse du saut d'exon du messager *DMD* dans les muscles et le foie de chiens injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-E6/E8. Le messager *DMD* est détecté par RT-PCR nichée amplifiant de l'exon 3 à l'exon 10 après extraction de l'ARN des muscles squelettiques prélevés à l'euthanasie (m. FCR = muscle flexor carpi radialis, m. FDS = muscle flexor digitorum superficialis, m. UL = muscle ulnaris lateralis et m. EDL = muscle extensor digitorum lateralis), et dans le foie (lobe droit) de 3 chiens injectés avec la dose forte de vecteur (5e13 vg/kg, groupe 3). Les produits PCR (791 et 659 pb) détectés chez le chien *GRMD* (contrôle non injecté) correspondent aux ARNm sans l'exon 7 ou sans les exons 7 et 9, respectivement. Après injection, 2 nouveaux produits PCR apparaissent (436 et 304 pb) dans certains échantillons. Ils correspondent aux ARNm en phase dans lesquels il manque les exons 6 à 8 ou 6 à 9, respectivement. Les nombres de copies en vg/dg obtenus par analyse QPCR sur les ADNg des mêmes échantillons sont indiqués sous chaque panel. H₂O = témoin PCR H₂O

Puisque les constructions U7snRNA sont sous le contrôle de leur promoteur naturel, théoriquement ubiquitaire, cette différence de profil d'expression du U7snRNA optimisé entre le foie et le muscle n'était pas attendue. Outre le fait de trouver une explication à cette expression différentielle (nous y reviendrons en partie E-), ces résultats, si confirmés dans une autre espèce et notamment chez l'Homme, seraient de très bon augure pour l'innocuité de notre approche. En effet, même si les études de biodistribution ont montré une transduction importante du foie par l'AAVr-8-U7snRNA, les effets indésirables potentiels de la présence

de copies du transgène dans le foie, organe non ciblé par la thérapie, pourraient être amoindris si les U7snRNA ne s'y expriment pas.

Après cette première analyse chez le chien *GRMD*, nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'évaluation du profil d'expression du U7snRNA optimisé pour le saut de l'exon 53 du messager *DMD*, chez le primate non-humain.

B- Profil d'expression du U7snRNA-Dtex53 chez le primate non-humain

1) Biodistribution du vecteur AAVr-8-U7-Dtex53

Les études de biodistribution réalisées sur les tissus des primates non-humains injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-Dtex53 (à la dose de 2.5×10^{14} vg/kg ou de $2 \times 2.5 \times 10^{14}$ vg/kg) et euthanasiés 90 jours post-injection, ont révélé la présence du vecteur dans tous les échantillons de tissus analysés, de façon comparable aux profils de transduction observés dans les chiens *GRMD* injectés (résultats non montrés). Pour chaque primate non-humain, les valeurs de vg/dg retrouvées dans le foie sont similaires à celles de certains muscles des membres injectés. De plus, le nombre moyen de vg/dg retrouvé dans le foie des animaux injectés dans 1 membre antérieur (dose 2.5×10^{14} vg/kg) et des animaux injectés dans 2 membres (dose $2 \times 2.5 \times 10^{14}$ vg/kg) sont équivalents, et cela malgré la différence de dose totale injectée : en moyenne 45 vg/dg et 32 vg/dg respectivement ; suggérant une éventuelle saturation du niveau de transduction du foie.

2) Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Dtex53

L'analyse du profil d'expression du U7snRNA-Dtex53 a été réalisée sur les tissus des primates euthanasiés 90 jours post-injection, injectés dans 1 membre (dose 2.5×10^{14} vg/kg) ou 2 membres (dose $2 \times 2.5 \times 10^{14}$ vg/kg) (revoir tableau 4).

a- Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Dtex53 par RT-QPCR

De la même manière que chez les chiens *GRMD*, nous avons commencé par déterminer le profil d'expression du transgène U7snRNA-Dtex53 (revoir figure 36) en utilisant une RT-QPCR spécifique de cet ARN, dans le foie et les muscles squelettiques (4 muscles de chaque membre antérieur) des primates inclus dans cette étude. Nous avons ensuite normalisé les résultats de quantification relative (RQ) par les vg/dg obtenus par QPCR

sur l'ADNg dans chaque tissu, en calculant le ratio RQ/vg (figure 42). Aucune expression n'a été détectée dans les tissus des 3 primates injectés avec du tampon (résultats non montrés).

Ces analyses par RT-QPCR nous permettent de montrer que le transgène U7-Dtex53 est exprimé à la fois dans les muscles et le foie de ces animaux. Par contre et contrairement à ce qui a été observé chez les chiens *GRMD*, même si le U7snRNA-Dtex53 semble plus faiblement exprimé dans le foie par rapport aux muscles squelettiques, cette différence n'est pas significative.

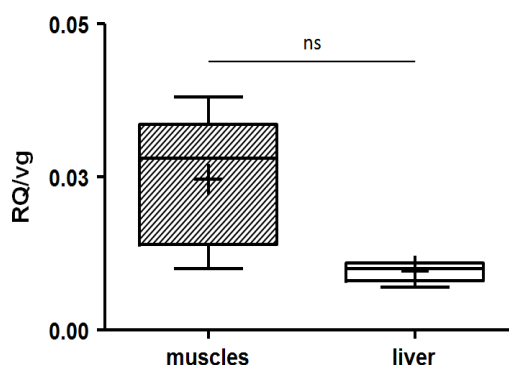


Figure 42 : Quantification par RT-QPCR de l'expression du U7snRNA-Dtex53 chez les primates non humains injectés avec différentes doses du vecteur AAV8r-U7snRNA-Dtex53. Les données représentent les ratios RQ/vg (la valeur médiane (barre centrale), la valeur moyenne (croix), les 1^{er} et le 3^{ème} quartile (boîtes) et les 1^{er} et 9^{ème} déciles (moustaches)) des valeurs obtenues chez les animaux injectés dans 1 membre (n=2) ou dans 2 membres (n=3). Pour chaque primate, l'analyse a été réalisée sur 4 muscles squelettiques (m. TB = muscle triceps brachii, m. BB = muscle biceps brachii, m. S = muscle supinator et m. FCU = muscle flexor carpi ulnaris) des membres injectés (soit 8 muscles pour les animaux injectés dans les 2 membres) et le foie (3 lobes). Statistiques: Test non paramétrique de Wilcoxon pour données appariées. ns = non significatif.

b- Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Dtex53 par Northern blot

Afin de confirmer les résultats de RT-QPCR, nous avons réalisé des Northern blots spécifiques du U7snRNA-Dtex53. Les analyses ont été faites sur des ARN issus des muscles squelettiques ou des foies de 3 primates de l'étude : un primate contrôle non injecté, un primate injecté dans 1 membre et un autre injecté dans 2 membres. Nous avons choisi d'analyser des animaux présentant approximativement le même nombre de vg/dg dans un muscle squelettique et un lobe du foie (environ 22 vg/dg pour le primate Bismuth et environ 30 vg/dg pour le primate Nickel).

Le U7snRNA-Dtex53 n'est pas détecté dans les tissus du primate contrôle. Par contre, une bande correspondant au U7snRNA-Dtex53 (78 pb) est détectée dans les muscles et les foies des 2 primates injectés, à un niveau très proche entre les 2 tissus (figure 43). Grâce à la

Résultats - Partie 1

normalisation par les ARNr 5S et à l'outil Genetools, nous avons pu quantifier l'expression du U7snRNA-Dtex53 entre le muscle et le foie : le U7-Dtex53 est en effet exprimé dans le foie à un niveau similaire à celui observé dans les muscles squelettiques (ratio U7/5S = 0.44 dans le muscle et 0.38 dans le foie) (résultat non montré).

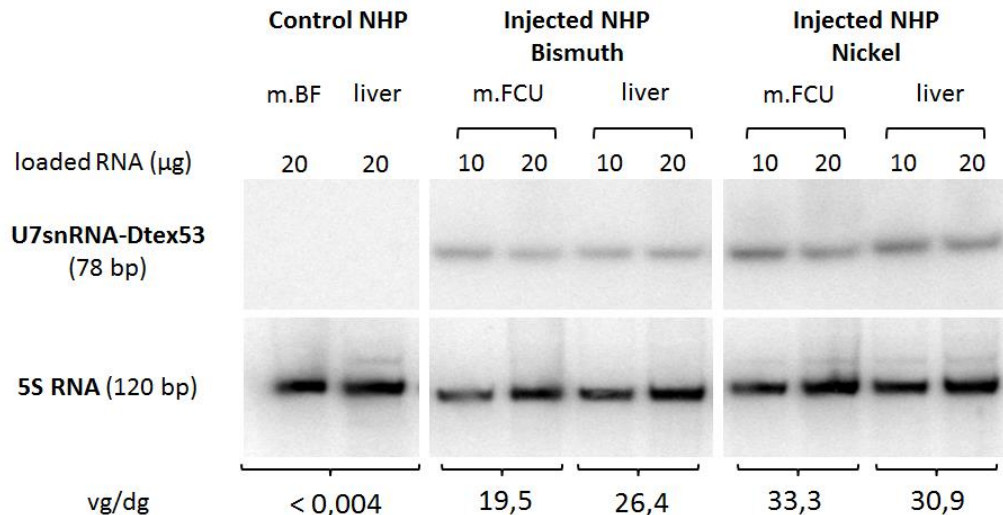


Figure 43 : Quantification relative par Northern blot de l'expression du U7snRNA-Dtex53 dans les tissus des primates injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-Detx53. L'expression du U7-Dtex53 est détectée dans un muscle squelettique (m. FCU = muscle flexor carpi ulnaris) et dans le foie (lobe gauche) de deux primates injectés dans un membre (Nickel - 2.5×10^{14} vg/kg) ou deux membres (Bismuth - $2 \times 2.5 \times 10^{14}$ vg/kg) et présentant approximativement le même nombre de vg/dg dans ces 2 types de tissus. Les tissus d'un primate contrôle non injecté sont aussi présentés (m. BF = muscle biceps femorais). L'hybridation a été réalisée avec des sondes radio-marquées au ^{32}P et spécifiques du transgène U7-Dtex53 d'une part (panels du haut) et de l'ARNr 5S d'autre part (panels du bas). Pour chaque ARN, 10 et 20 μg d'ARN ont été chargés. NHP : non human primate.

c- Analyse de l'activité moléculaire du U7-Dtex53 par RT-PCR nichée

Nous avons finalement vérifié la fonctionnalité du U7-Dtex53 dans le foie et les muscles squelettiques des ces primates non-humains, en utilisant une RT-PCR nichée spécifique du messager *DMD* simien. Puisque la séquence antisens du U7-Dtex53 (conçue pour le saut d'exon du messager *DMD* humain) présente 100% d'homologie avec la cible au niveau de l'exon 53 du messager *DMD* simien, un saut d'exon est possible chez les primates non humains. Cette RT-PCR nichée permet une amplification du messager *DMD* des exons 51 à 54 et donc la mise en évidence du saut de l'exon 53, le cas échéant (figure 44). Les analyses ont été réalisées sur les tissus des mêmes primates analysés dans l'approche Northern blot.

Dans le muscle contrôle non injecté, nous détectons une bande correspondant aux exons 51 à 54 du gène *DMD* simien sans saut de l'exon (556 pb). Dans les muscles injectés, en plus des

transcrits à 556 pb, nous observons un degré variable de saut de l'exon 53 (bande à 344 pb) en corrélation avec le nombre de vg/dg détectés dans ces échantillons. De plus, dans les foies des deux primates injectés, une bande à 344 pb correspondant au transcrit sans l'exon 53 est très nettement visible. Ceci confirme que le U7-Dtex53 est exprimé dans le foie des primates et qu'il y est actif pour induire un saut d'exon substantiel sur l'ARNm cible *DMD*.

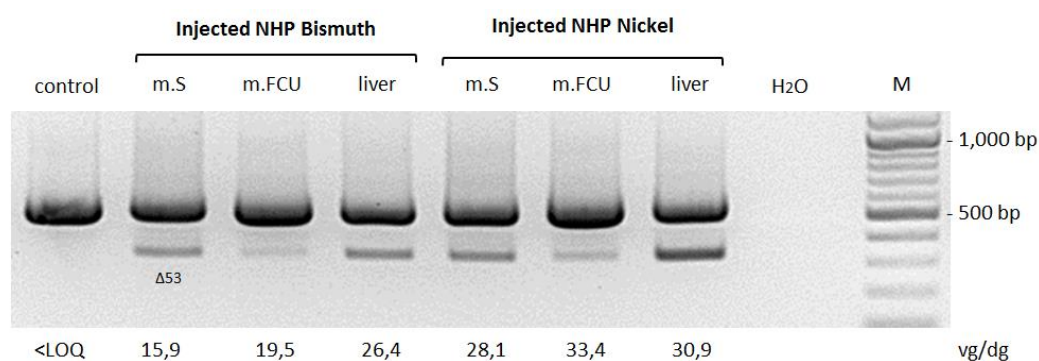


Figure 44 : Analyse du saut d'exon du messager *DMD* dans les muscles et les foies de primates non humains injectés avec le vecteur AAVr-8-U7-Dtex53. Le messager *DMD* est détecté par RT-PCR nichée amplifiant de l'exon 51 à l'exon 54 dans les muscles (m.S = muscle supinator, m. FCU = muscle flexor carpi ulnaris), et dans le foie (lobe gauche) de primates injectés dans 1 membre (Nickel - 2.5^e13 vg/kg) ou dans 2 membres (Bismuth - 2x 2.5^e13 vg/kg). Le produit PCR (556 pb) détecté chez le primate contrôle correspond à l'ARNm *DMD* avec tous les exons 51 à 54. Après injection, un nouveau produit PCR apparaît (344 pb) dans les échantillons des primates injectés et correspond à l'ARNm en phase dans lequel il manque l'exon 53. Les nombres de copies en vg/dg obtenus par analyse Q-PCR sur les ADNg des mêmes échantillons sont indiqués sous chaque panel. H₂O = témoin PCR H₂O . LOQ : limit of quantification. NHP : non human primate

C- Optimisation de la séquence du produit clinique AAVr-8-U7snRNA

Alors que les études de toxicologies de l'étude DMD/U7 étaient en cours, diverses expériences *in vitro* et *in vivo* réalisées au sein de l'équipe projet ont suggéré que le transgène U7snRNA-Dtex53 n'entraînait qu'un niveau assez faible de saut d'exon 53 du messager *DMD* (non montré) ; et paraissait donc ne pas être le produit optimal, surtout lorsque comparé aux transgènes U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8, très efficaces chez le chien *GRMD*. Il a donc été décidé de modifier la séquence antisens du U7snRNA clinique pour augmenter de façon significative l'efficacité du saut de l'exon 53 du messager *DMD* humain.

Le produit clinique initial, U7-Dtex53, code deux séquences antisens ciblant deux régions différentes de l'exon 53 (bases +45/+62 et +128/+145 de l'exon). Afin de trouver la séquence antisens optimale qui permettrait une exclusion totale de l'exon 53 du messager *DMD* mature, 5 autres séquences ont été testées le long de l'exon 53, en se basant sur la littérature (Poplewell 2009) (figure 45 A). Une séquence aléatoire (« scramble ») qui ne cible aucune

région du gène *DMD*, a été utilisée comme contrôle négatif. A l'inverse du U7-Dtex53, aucune des nouvelles séquences antisens n'a de double cible. Par contre elles se situent toutes dans la zone +30/+69 de l'exon 53 et varient en taille (de 24 à 40 nt de long).

Pour tester la fonctionnalité de ces séquences, 7 vecteurs AAVr-8-U7 ont été générés, contenant la séquence U7-Dtex53, la séquence U7-scramble ou une des 5 nouvelles séquences antisens à tester. Les 7 vecteurs ont été testés en parallèle *in vitro* sur des myoblastes immortalisés de patients DMD portant des délétions des exons 45 à 52 ($\Delta 45-52$) ou de l'exon 52 ($\Delta 52$) dans le gène *DMD*. Les cellules ont été transduites à différentes MOI (multiplicity of infection) avec les sept vecteurs. Le lot de vecteur AAVr-8-U7-Dtex53, utilisé lors des études de toxicologie, a été utilisé en contrôle positif.

L'efficacité des différentes séquences a ensuite été mesurée par RT-PCR nichée pour évaluer le saut de l'exon 53 sur le messenger *DMD* et par Western blot pour évaluer la restauration de la protéine dystrophine. Une normalisation a pu être faite en déterminant le nombre de vg/dg pour chaque échantillon via une QPCR sur ADNg extrait à partir des mêmes échantillons (non montré). Toutes ces analyses ont été réalisées en aveugle et en parallèle par notre équipe (Virginie François et Marine Allais) et une équipe de l'Institut de Myologie (équipe de France Pietri-Rouxel).

Les résultats d'efficacité de saut d'exon sur le messenger *DMD* analysée par RT-PCR nichée et obtenus dans les deux laboratoires (résultats représentatifs en figure 45 B) montrent que plusieurs constructions sont plus efficaces que la séquence U7-Dtex53 (que ce soit le lot de vecteur utilisé lors des études de toxicologie (TOX batch) ou celui produit spécifiquement pour ce test de comparaison (Dtex53)). Les constructions appelées N3, Di et surtout Jr53 semblent en effet provoquer un niveau plus important de saut de l'exon 53. Ces résultats, combinés avec ceux de Western blot (non montrés) ont mis en évidence la supériorité de la construction U7-Jr53 pour le saut de l'exon 53 du messenger *DMD* humain, qui permet également la restauration de l'expression d'une protéine dystrophine.

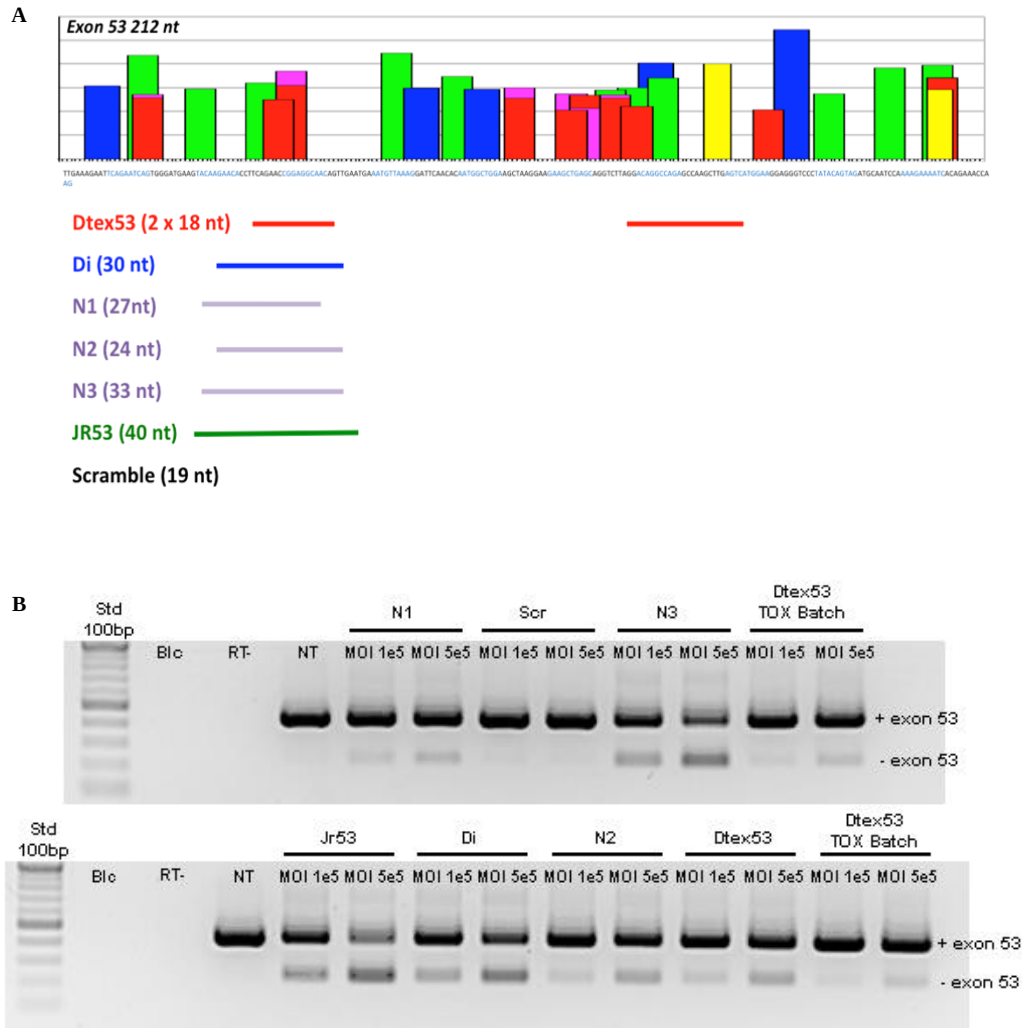


Figure 45 : Etude comparative de plusieurs constructions U7snRNA-antisens pour le saut de l'exon 53 du messenger *DMD* humain. A: Position et longueur des séquences antisens testées « Dtex53 », « Di », « N1 », « N2 », « N3 » et « Jr53 » ciblant différentes régions de l'exon 53 du gène *DMD* humain ; sur une représentation de l'exon d'après ESE finder (chaque bloc de couleur représente un site potentiel de fixation d'un facteur activateur de l'épissage et donc la présence potentielle d'une séquence ESE). B: Analyse comparative du saut de l'exon 53 du messenger *DMD* humain dans des myoblastes humains $\Delta 45-52$ transduits avec les AAVr-8 portant les différentes construction U7snRNA-antisens. Le messenger *DMD* est détecté par une RT-PCR nichée amplifiant des exons 44 à 56. Les contrôles négatifs « Blc » et « RT -> » correspondent à un témoin PCR H₂O et à un témoin PCR avec de l'ARN non retro-transcrit, respectivement.

La construction U7-Jr53 (figure 46) a finalement été définie comme le nouveau produit clinique, qui sera injecté aux patients DMD lors du futur essai clinique. Le U7snRNA-Jr53 n'est composée que d'une unique séquence antisens, plus longue que celle du U7-Dtex53 (40nt contre 2x 18nt, respectivement), et spécifique d'une seule région de l'exon 53 du gène *DMD* humain (bases +30/+69).



Figure 46 : Représentation schématique du génome du vecteur AAVr-8-U7-Jr53 et du U7snRNA-Jr53 correspondant, constitué d'une séquence antisens spécifique de l'exon 53 du gène *DMD* humain. L'expression du U7snRNA-Jr53 est sous le contrôle du promoteur et des séquences régulatrices du U7snRNA murin naturel (rectangle gris). Le U7snRNA-Jr53 généré après transcription est composé de la séquence antisens Jr53 (en vert), d'un site de fixation aux protéines Sm (souligné) et d'une structure 3' en tige-boucle.

D- Profil d'expression du U7snRNA-Jr53 chez l'Homme

Comme évoqué en partie C-, contrairement à ce qui était observé chez les chiens *GRMD* avec les U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8, le U7snRNA-Dtex53 s'exprime, chez le primate non-humain, à un niveau similaire dans le foie et les muscles squelettiques. Ces résultats contradictoires nous ont poussé à analyser de la même manière l'expression du produit clinique U7snRNA-Jr53 dans un contexte humain afin de définir son activité moléculaire, et cela dans les 2 tissus qui seraient potentiellement les plus transduits chez l'Homme après une injection locorégionale d'un AAVr-8-U7-Jr53 : le muscles squelettique et le foie. L'étude de l'impact d'une éventuelle expression ectopique du U7-Jr53 dans un contexte humain se révélait être d'autant plus importante du fait que les études de toxicologie aient été réalisées avec un produit contenant une séquence antisens différente de la séquence antisens U7-Jr53.

1) Développement de modèles cellulaires humains pertinents

Afin d'étudier les profils d'expression du U7snRNA-Jr53 dans le muscle et le foie en contexte humain, nous avons développé et caractérisé des modèles cellulaires *in vitro* transduits avec un AAV-U7-Jr53 permettant de mimer un contexte musculaire ou hépatique. L'objectif étant de comparer des profils d'expression de gènes *in vitro*, il nous a paru important de choisir des modèles de cellules primaires plutôt que des lignées cellulaires qui sont toutes issues d'un même clone cellulaire et dont le transcriptome peut être modifié au cours du processus d'immortalisation.

a- Modèles cellulaires musculaires

Afin de caractériser l'expression du U7snRNA-Jr53 dans un contexte musculaire, nous avons choisi de travailler en parallèle avec des myoblastes primaires humaines et des myotubes primaires humains ; c'est-à-dire les mêmes cellules au stade non-différencié ou au stade différencié. Afin de prendre en compte les éventuelles variations inter-individuelles, nous avons travaillé avec 3 souches de myoblastes différentes, issues de 3 individus sains différents: les souches « M1 » et « M3 » issues d'un muscle quadriceps d'individus adultes et la souche « M2 » issue du muscle des grands fessiers d'un individu adulte.

Les myotubes, stade de différenciation terminal des cellules musculaires *in vitro*, correspondent à des cellules multinucléées formées par la fusion de deux ou plusieurs myoblastes. Cette différenciation est facilitée à confluence des myoblastes et par l'ajout d'un milieu spécifique sans sérum. Après avoir identifié le milieu et les temps de culture optimaux pour une bonne différenciation des cellules, nous avons caractérisé les myotubes pour s'assurer de leur stade de différenciation. Pour cela, nous avons réalisé des marquages de la chaîne lourde de la myosine (spécifiquement exprimée dans les myotubes) par une technique d'immunofluorescence (figure 47).

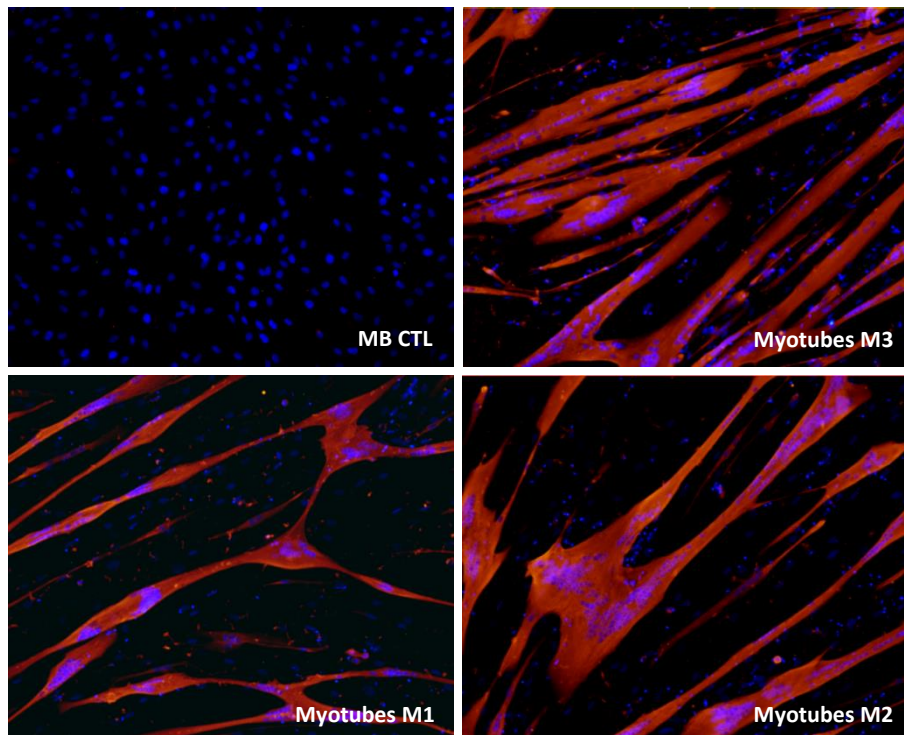


Figure 47 : Marquage par immunofluorescence de la chaîne lourde de la myosine dans les myotubes primaires humains utilisés dans notre étude. On visualise sur ces images le marquage de la myosine dans le cytoplasme des myotubes (rouge) et le marquage des noyaux au Dapi (bleu). Grossissement x100. MB CTL : myoblastes contrôles.

Pour compléter la caractérisation de ces modèles cellulaires musculaires, nous avons validé, en utilisant des analyses RT-PCR, l'expression de certains gènes spécifiques du muscle, tels que la myosine et la myogénine dans les myotubes, ou myoD spécifiquement exprimé dans les cellules indifférenciées (cellules satellites et myoblastes) (Zammit 2006) (figure 48).

La myosine (MYHC3) et la myogénine, spécifiques des muscles différenciés, sont bien exprimées dans le muscle humain et dans les myotubes. MyoD, exprimé uniquement dans les cellules musculaires indifférenciées, n'est effectivement détecté que dans les myoblastes. Nous avons validé en RT-QPCR l'expression d'un gène endogène humain (POLR-2L) pour tous ces échantillons (non montré).

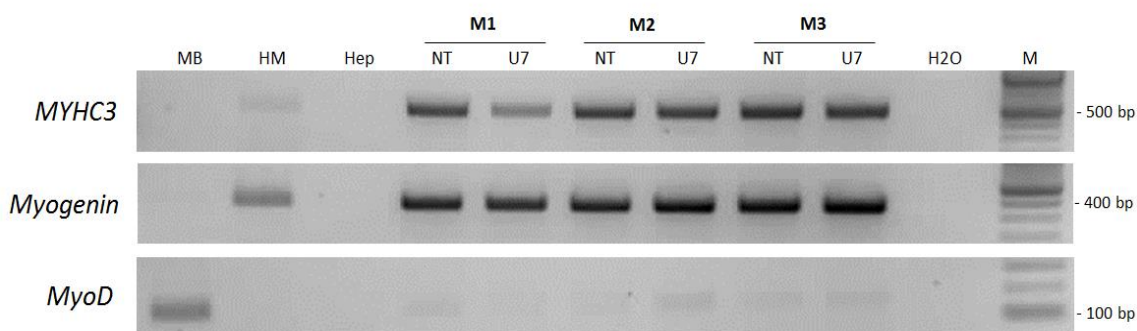


Figure 48 : Caractérisation des modèles cellulaires musculaires par analyse de l'expression de gènes spécifiquement musculaires. Les analyses RT-PCR ont été réalisées sur des myoblastes primaires humains (MB) et sur des échantillons des 3 souches de myotubes primaires humains non transduits (NT) ou transduits avec un AAVr-U7-Jr53 (U7). Un échantillon de muscle humain (HM) a été utilisé comme contrôle positif de différenciation et des hépatocytes primaires humains (Hep) ont été utilisés comme contrôle négatif. H₂O = témoin PCR H₂O ; M : marqueur de taille 100 pb.

Cette caractérisation par RT-PCR a systématiquement été réalisée lors des différentes expériences indépendantes basées sur l'utilisation de ces modèles cellulaires musculaires, afin de s'assurer notamment de la reproductibilité des différenciations en myotubes.

b- Modèles cellulaires hépatiques

Pour le contexte hépatique, nous avons choisi de travailler avec différents modèles d'hépatocytes humains, cellules majoritaires du foie. Bien que l'utilisation de cellules primaires paraisse plus pertinente, nous n'y avons pas eu accès facilement et nous avons donc commencé par caractériser un modèle de lignée cellulaire hépatique, les HepaRG.

Les HepaRG sont une lignée cellulaire dérivée d'un hépatome humain, identifiée en 2002 (Gripon 2002). Au stade indifférencié, les HepaRG apparaissent comme une population de cellules homogènes au phénotype épithélial. Lorsqu'elles atteignent la confluence, les cellules subissent des changements morphologiques et acquièrent progressivement un phénotype d'hépatocytes granuleux. L'ajout de DMSO au milieu de culture permet de différencier parfaitement les cellules qui s'organisent en travées, exactement comme les hépatocytes primaires. Quelques cellules se différencient en cellules épithéliales-like et comblent les espaces vides (figure 49 A). Les cellules hépatocytes-like des HepaRG différenciées possèdent des caractéristiques très proches de celles des hépatocytes primaires, telles qu'une susceptibilité à l'infection par l'HBV (virus de l'hépatite B) et l'expression d'un panel de gènes spécifiques du foie et notamment les enzymes hépatiques du cytochrome P450 (Gripon 2002, Aninat 2006, Guillouzo 2007, Kanebratt et Andersson 2008). L'ensemble de ces

caractéristiques en font un modèle de choix pour l'étude du métabolisme hépatique, en absence d'hépatocytes primaires.

Malgré les difficultés pour y accéder, leur coût et leur sensibilité en culture, nous avons également pu avoir accès à des hépatocytes primaires humains, isolés à partir du foie d'individus « sains vis-à-vis de la DMD » (figure 49 B). Bien que « sains vis-à-vis de la DMD », les individus sont potentiellement atteints d'une pathologie hépatique (cancers, cirrhose). Chaque lot d'hépatocytes est par contre issu d'un patient différent (contrairement aux cellules HepaRG), ce qui permet de prendre en compte les variations inter-individuelles dans nos expériences.

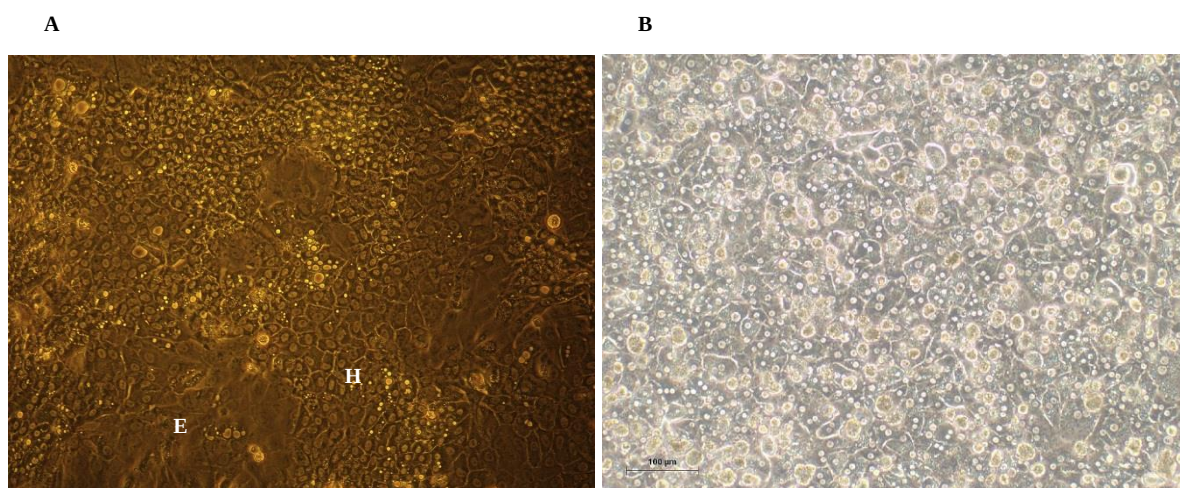


Figure 49 : Observations microscopiques des différents modèles d'hépatocytes humains utilisés dans notre étude. A: Cellules HepaRG au stade différencié, après 20 jours de culture et ajout de DMSO. H : hépatocytes-like, E : épithéliales-like. Grossissement x200. B: Hépatocytes primaires humains (photo de Biopredic, Rennes) après 1 jour de culture.

Pour la caractérisation de ces deux modèles hépatiques, nous avons développé des RT-PCR afin de valider l'expression de gènes spécifiques du foie : 2 gènes pour des enzymes du cytochrome P450 (CYP2C9 et CYP3A4) et les gènes codant l'albumine et l'aldolase B (figure 50).

L'expression des gènes CYP2C9, albumine et aldolase B dans tous les échantillons d'hépatocytes primaires et d'HepaRG testés confirme leur profil hépatocytaire. Le gène CYP3A4 est plus faiblement détecté mais exprimé dans tous les échantillons, excepté chez le patient H3 testé ici. Il est effectivement décrit que ce gène est faiblement représenté *in vitro* et variable entre les individus (Guillouzo 2007). Enfin, l'albumine n'est pas forcément un bon

marqueur pour la caractérisation des cellules HepaRG, puisque ces cellules l'expriment déjà avant leur différenciation en cellules hépatocytes-like. L'expression d'un gène endogène humain (POLR-2L) a été validée en RT-QPCR pour tous ces échantillons (non montré).

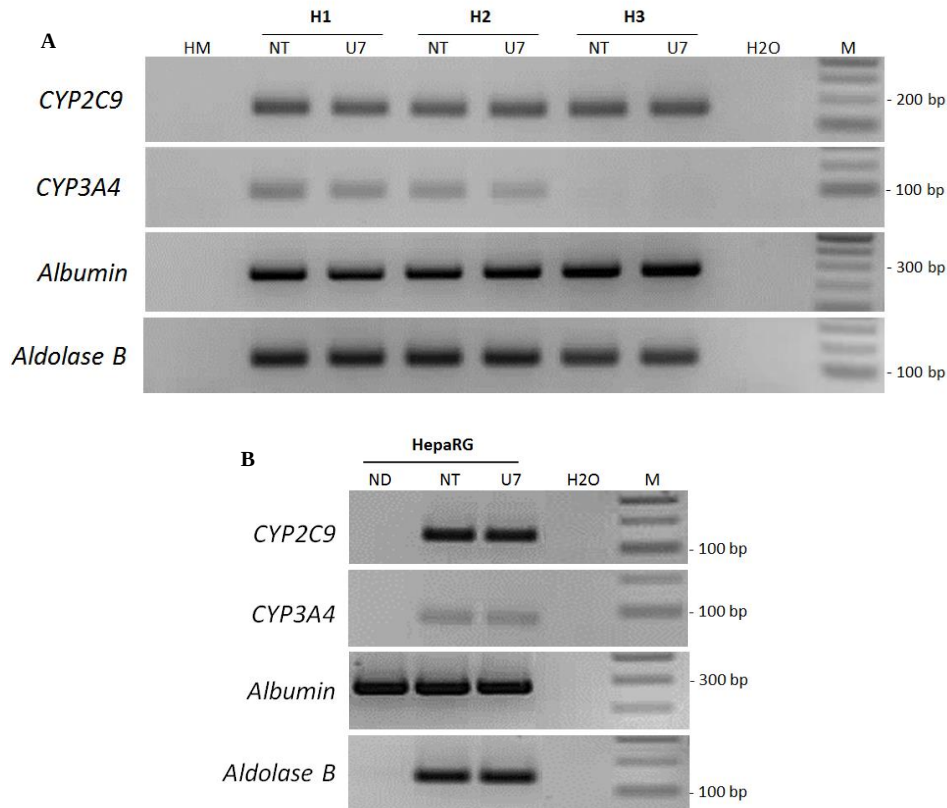


Figure 50: Caractérisation des modèles cellulaires hépatiques par analyse de l'expression de gènes spécifiquement hépatiques. Les analyses RT-PCR ont été réalisées sur des hépatocytes primaires (A) et sur des cellules HepaRG (B), non transduites (NT) ou transduites avec un AAVr-U7-Jr53 (U7). Un échantillon de muscle humain (HM) a été utilisé comme contrôle négatif. ND : HepaRG non différenciés ; H₂O = témoin PCR H₂O ; M : marqueur de taille 100 pb.

Cette caractérisation par RT-PCR a systématiquement été réalisée lors des différentes expériences indépendantes basées sur l'utilisation de ces modèles cellulaires hépatiques, afin de s'assurer notamment que les hépatocytes primaires n'aient pas dérivé après quelques jours de culture, ou que les HepaRG soient au bon stade de différenciation.

c- Transduction des modèles cellulaires humains à l'aide d'un vecteur AAVr

Après avoir identifié et caractérisé ces différents modèles cellulaires humains, nous avons déterminé les conditions optimales de transduction par un AAVr pour chacun de ces types cellulaires. Plusieurs tests de transduction ont été réalisés avec des AAVr-GFP (green fluorescent protein), portant une cassette d'expression de la protéine GFP, utilisée ici comme

gène rapporteur. La fluorescence de la GFP étant directement observable au microscope à fluorescence, l'efficacité de transduction a été aisément évaluée.

Afin de pouvoir comparer l'expression du U7snRNA-Jr53 entre les hépatocytes et les myoblastes/tubes, nous souhaitions pouvoir utiliser un même sérotype pour la transduction des deux types cellulaires. Nos tests de transduction ont révélé que l'AAVr-8 transduit très efficacement les myoblastes humains *in vitro* (à la MOI 10^5). Par contre à cette même MOI, la transduction des hépatocytes humains est très faible. Nous avons observé les mêmes faibles niveaux de transduction sur les myoblastes et les hépatocytes humains avec un AAVr-2 (figure 51 A). Des vecteurs scAAVr-8 et scAAVr-2 ont également été testés, mais sans montrer une meilleure efficacité dans les hépatocytes humains (non montré).

Finalement, les tests réalisés avec un AAVr-3-GFP ont été beaucoup plus concluants puisque ce sérotype se montre capable de transduire à un bon niveau aussi bien les hépatocytes que les myoblastes primaires humains (à partir de la MOI 2.5×10^4) (figure 51 B). Les HepaRG sont également très bien transduits par l'AAVr-3 (non montré).

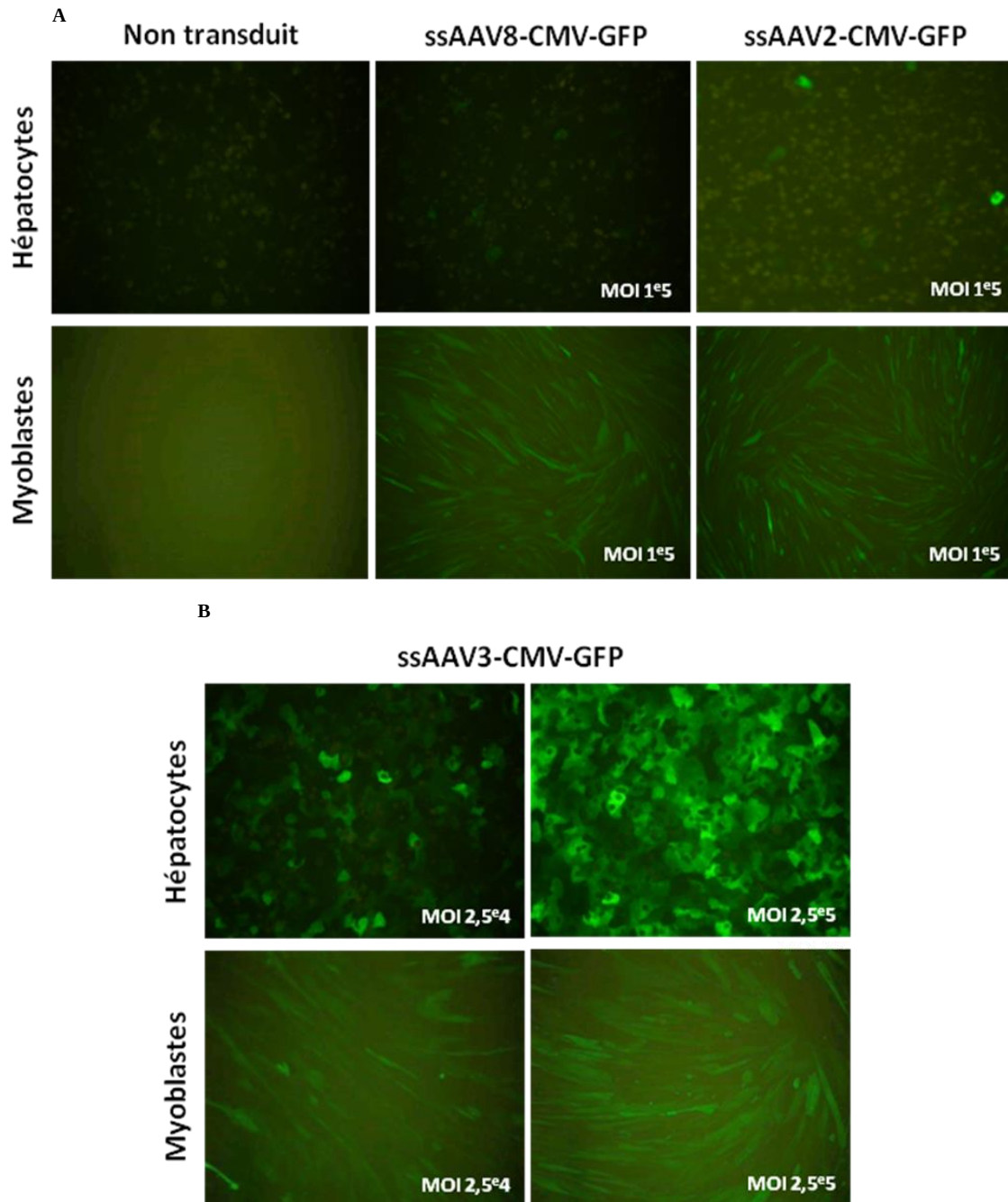


Figure 51 : Exemples représentatifs des résultats d'expression de GFP obtenus après transduction d'hépatocytes et de myoblastes primaires humains transduits avec différents sérotypes d'AAVr-GFP. Les images ont été obtenues au microscope à fluorescence (grossissement x100) à partir d'hépatocytes (panel du haut) ou de myoblastes (panel du bas) primaires humains transduits avec des vecteurs ssAAV8, ssAAV2 (A) ou ssAAV3 (B) à différentes MOI et observés 3 jours post-transduction. Tous les vecteurs AAVr, contenant la même cassette d'expression de la protéine GFP sous contrôle du promoteur ubiquitaire CMV, ont été produits par la plateforme de production de vecteurs de notre laboratoire, par la méthode de transfection de cellules 293, puis titrés et caractérisés par les mêmes méthodes analytiques.

Après avoir identifié un sérotype d'AAVr qui permet une transduction des hépatocytes et myoblastes primaires humains, nous avons mis au point, pour chaque type cellulaire, le protocole idéal de transduction. La transduction des myotubes est notamment plus efficace et nécessite moins de vecteur lorsqu'elle est effectuée sur des myoblastes qui sont mis en différenciation quelques jours après la transduction (non montré, voir *matériel et méthodes*).

2) Profil d'expression du U7snRNA-Jr53 chez l'Homme

A partir des modèles cellulaires humains mis en place et transduits à l'aide d'un vecteur AAVr-3-U7-Jr53, nous avons étudié l'expression du U7-Jr53 par RT-QPCR, comme cela avait été fait précédemment pour les U7-E6 et -E8 chez le chien et le U7-Dtex53 chez le primate non-humain. Pour les précédentes analyses de profils d'expression, nous normalisons systématiquement la quantification relative (RQ) des U7snRNA par le nombre de copies de vecteur (vg/dg) retrouvé dans le même tissu (figures 39 B et 42). Pour les analyses chez l'Homme, dans un contexte *in vitro*, nous avons également entrepris de normaliser les résultats par les vg/dg.

a- Détermination du nombre de copies de vecteur *in vitro* par fractionnement cellulaire

Pour déterminer le nombre de copies de vecteurs en vg/dg sur des cellules humaines cultivées *in vitro*, il est possible de réaliser une QPCR spécifique du vecteur AAVr (amorces localisées dans l'ITR) sur les ADNg extraits des cellules transduites. Par contre, en procédant ainsi, toutes les copies du vecteur sont « récoltées » et quantifiées, y compris celles qui ne sont pas infectieuses, notamment les copies qui ne sont pas encore entrées dans le noyau ou celles qui sont accrochées à la surface des cellules. Si l'on peut penser qu'au sein d'un même type cellulaire le nombre de copies de vecteur réellement infectieuses est comparable d'une expérimentation à l'autre, il est probable que le nombre de particules AAVr infectieuses entrées dans le noyau varie selon le type cellulaire transduit et notamment entre les myotubes/blastes et les hépatocytes/HepaRG (figure 52).

Le test idéal (permettant une quantification réelle des copies de génome AAVr entrées dans le noyau des cellules transduites, et donc potentiellement transcriptionnellement actifs), consisterait à isoler les fractions cytoplasmiques et nucléaires des cellules avant l'extraction d'ADN afin de ne quantifier les vg/dg que dans la fraction nucléaire (figure 52). Ainsi, nous

envisagions de transduire nos cellules avec l'AAVr-3-U7-Jr53, de fractionner les cellules pour récolter uniquement la fraction nucléaire et d'en extraire l'ADN d'une part, pour déterminer le nombre de vg/dg par QPCR et l'ARN d'autre part, pour analyser l'expression de du U7snRNA-Jr53 par RT-QPCR.

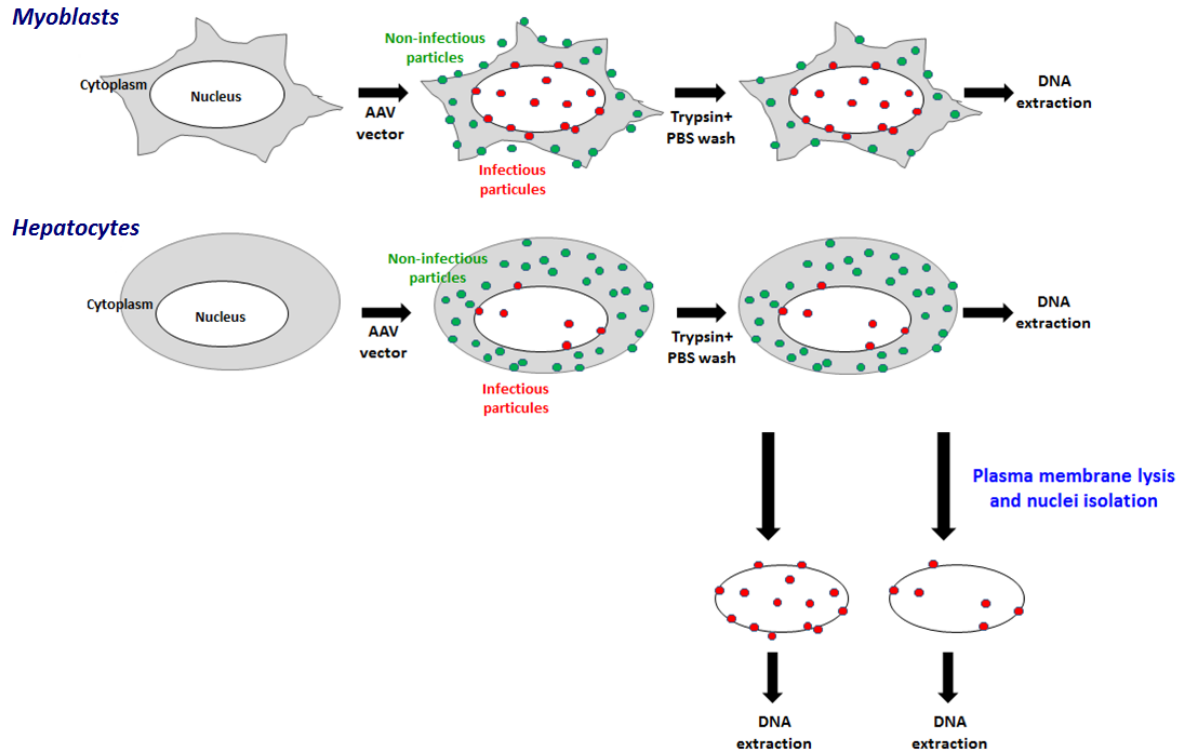


Figure 52 : Représentation schématique de la distribution théorique des particules d'AAVr au sein des myoblastes et hépatocytes humains transduits par un AAVr. Une extraction d'ADN à partir du noyau isolé permettrait de quantifier uniquement les génomes viraux potentiellement transcriptionnellement actifs.

Une autre équipe du laboratoire travaillant sur le fractionnement nucléaire des cellules afin de mettre au point une technique de titration des particules infectieuses des vecteurs AAVr (François et al ; en préparation), nous nous sommes appuyés sur leurs précédentes mises au point (effectuées sur cellules Hela) en les adaptant à nos types cellulaires d'intérêt. Le principe du fractionnement nucléaire consiste en une lyse de la partie cytoplasmique, suivie d'une centrifugation douce pour ne culotter que les noyaux, sans les débris cellulaires et membranaires. La qualité de la lyse cellulaire est ensuite validée grâce à *i)* une QPCR spécifique du cytochrome B humain (CytB, un gène de l'ADN mitochondrial) qui permet d'estimer le pourcentage de mitochondries restantes, c'est-à-dire la contamination cytoplasmique de l'échantillon, et *ii)* une QPCR spécifique de l'albumine humaine, un gène

endogène qui représente la fraction nucléaire et permet notamment d'estimer s'il y a eu une perte du matériel ADN (= perte des noyaux) au cours du protocole.

Sur les cellules Hela (non transduites), le fractionnement cellulaire est très efficace puisque nous limitons la perte des noyaux à moins de 50% et nous sommes capables d'éliminer plus de 90% des débris cytoplasmiques (mitochondries restantes entre 5 et 9%) (figure 53). Les expériences que nous avons réalisées (n=3) ou celles réalisées par l'équipe d'Achille François (non montré) démontrent que le fractionnement cellulaire est efficace (malgré 5 à 9 % de contaminations cytoplasmiques) et reproductible sur les cellules Hela.

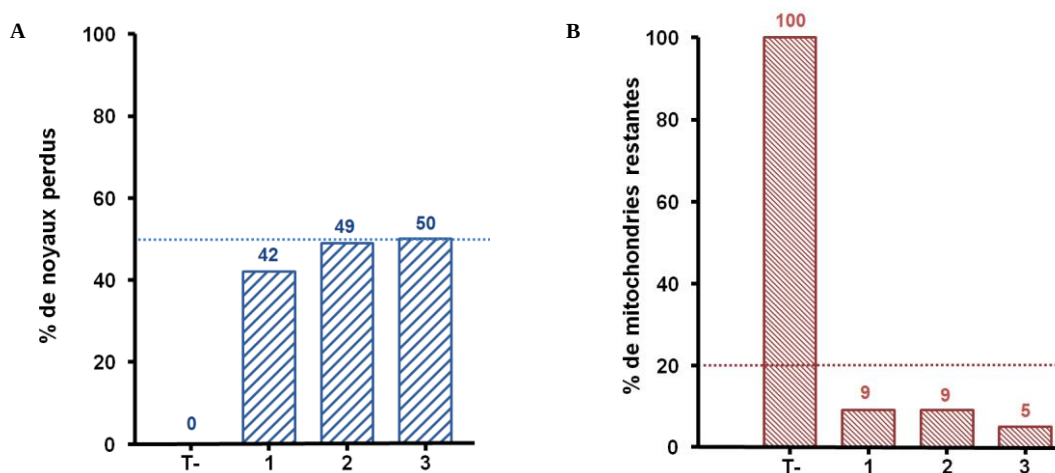


Figure 53 : Quantification des fractions cytoplasmiques et nucléaires après fractionnement de cellules Hela. Les données représentent les pourcentages de noyaux perdus estimés à partir des résultats obtenus par QPCR albumine (A), et les pourcentages de mitochondries restantes estimés par QPCR CytB (B), sur un témoin négatif (sans fractionnement) et 3 échantillons distincts. Les seuils « acceptables » de % de noyaux perdus et de mitochondries restantes sont fixés à 50% et 20% respectivement.

Après avoir validé le fractionnement sur les cellules Hela, nous avons appliqué le même protocole (*protocole 1 du Matériel et méthodes*) sur des myotubes primaires humains non transduits (non montré). Une première limite est alors apparue puisque nous n'avons pas récupéré assez d'ADN permettant la validation du fractionnement par QPCR albumine et CytB. Le fait d'augmenter le nombre de cellules subissant le fractionnement cellulaire (> 1 million) n'a pas permis d'améliorer les résultats puisqu'une grosse perte de matériel a été systématiquement observée (n=4, perte des noyaux $\geq 80\%$).

Nous avons par la suite tenté le fractionnement cellulaire sur des myoblastes primaires non transduits. Malheureusement, les tests de reproductibilité effectués sur plusieurs souches de myoblastes (M1, M2 et M3), dont les résultats sont résumés dans le tableau 5, ont mis en

Résultats - Partie 1

évidence la grosse perte des noyaux (en moyenne > 50% de perte) et surtout la très grande variabilité de la technique. Alors que nous espérions un coefficient de variation (CV) avoisinant les 5 ou 10% maximum, les CV obtenus sont tous très élevés. Cette variabilité inter-expérimentations était trop grande pour que nous puissions appliquer ce protocole de fractionnement cellulaire à nos analyses.

Tableau 5 : Résultats des tests de reproductibilité du fractionnement cellulaire réalisés sur myoblastes primaires humains.

Myoblastes	Tests	% noyaux perdus	Coefficients de variation	% mitochondries restantes	Coefficients de variation
M1	Témoin	0	/	100	/
	n=1	53	53,7	5	27,0
	n=2	10		10	
	n=3	45		11	
	n=4	64		9	
M2	Témoin	0	/	100	/
	n=1	36	28,4	7	31,0
	n=2	68		6	
	n=3	55		7	
	n=4	42		11	
M3	Témoin	0	/	100	/
	n=1	65	15,0	9	104,5
	n=2	50		15	
	n=3	73		4	
	n=4	76		6	
	n=5	68		43	

En parallèle, nous avons tenté d'isoler la fraction nucléaire des hépatocytes primaires humains. Les premiers tests avec le protocole 1, utilisé sur les myoblastes et les cellules Hela, ont montré plus de 95% de perte des noyaux (non montré). Nous avons alors testé d'autres protocoles de fractionnement cellulaire, utilisant des tampons de lyse différents (tableau 6). Parmi 4 nouveaux protocoles testés, c'est celui déjà utilisé (protocole 1) qui a finalement montré les meilleurs résultats (52% de perte de noyaux et 15% de mitochondries restantes). Pourtant les premiers tests avec ce protocole étaient très mauvais (non montré), ce qui laisse présager une grande variabilité inter-manipulation. Etant donné le coût des hépatocytes primaires humains et les mauvais résultats obtenus sur les myoblastes, nous avons choisi de ne pas réaliser de test de reproductibilité sur les hépatocytes.

Résultats - Partie 1

Tableau 6 : Résultats des tests de fractionnement cellulaire réalisés sur les hépatocytes primaires humains.

	Protocoles	% noyaux perdus	% mitochondries restantes
Hépatocytes 825 000 cellules	Témoin	0	100
	Prot.1	52	15
	Prot.2	76	7
	Prot.3	23	29
	Prot.4	44	34

Finalement, nous avons testé un dernier protocole de fractionnement cellulaire, en utilisant cette fois un kit commercial vendu pour le fractionnement nucléaire (NE-PER® Nuclear and cytoplasmic extraction reagents de chez Thermo scientific) (*protocole 5*). Même si l'utilisation d'un kit aurait potentiellement permis une meilleure reproductibilité, les quantités d'ADN récupérées après fractionnement pour 1^e6 cellules (myoblastes) étaient extrêmement faibles et le fractionnement n'était pas non plus efficace (non montré).

Entre nos mains, aucun des protocoles de fractionnement n'a donc été suffisamment efficace et/ou reproductible sur les myotubes, myoblastes et hépatocytes primaires humains. De plus, le fractionnement cellulaire engendre une telle perte du matériel ADN qu'il nous serait impossible de réaliser l'ensemble des analyses souhaitées sur chaque échantillon (extraction d'ADN et d'ARN). En parallèle, l'équipe d'Achille François a démontré que, malgré un fractionnement cellulaire correct des cellules Hela (moins de 20% de contamination cytoplasmique), des particules AAVr non infectieuses pouvaient toujours être détectées par QPCR dans la fraction nucléaire (François et al. en préparation). L'ensemble de ces résultats démontre donc qu'à ce jour nous n'avons malheureusement pas de moyen technique permettant de déterminer le nombre de génomes viraux transcriptionnellement actifs dans des cellules transduites *in vitro* à l'aide d'un AAVr.

b- Analyse du profil d'expression du U7snRNA-Jr53 par RTqPCR, en l'absence de normalisation

L'échec du fractionnement cellulaire décrit ci-dessus ne nous a pas permis de quantifier les génomes viraux réellement transcrits dans les myotubes et les hépatocytes humains transduits avec notre vecteur AAVr-3-U7-Jr53. Sans normalisation par le nombre de vg/dg, il nous a donc été impossible de quantifier l'éventuelle différence d'expression du U7snRNA-Jr53 entre les différents types cellulaires.

Nous avons tout de même déterminé le profil d'expression du U7snRNA-Jr53 via une quantification absolue par une RT-QPCR spécifique, dans nos différents modèles cellulaires de muscle et de foie humain. L'expression du U7-Jr53 est détectée dans les myotubes, les myoblastes, les hépatocytes et les HepaRG transduits à des niveaux variables (figure 54).

Même si nous ne pouvons donc pas comparer entre eux les niveaux d'expression obtenus dans les différents types cellulaires, ces résultats démontrent la capacité du U7snRNA-Jr53 à s'exprimer dans les 2 types cellulaires humains testés (modèles musculaires et hépatiques humains) et suggèrent donc une possible expression ectopique du U7snRNA optimisé clinique dans d'autres tissus que le muscle.

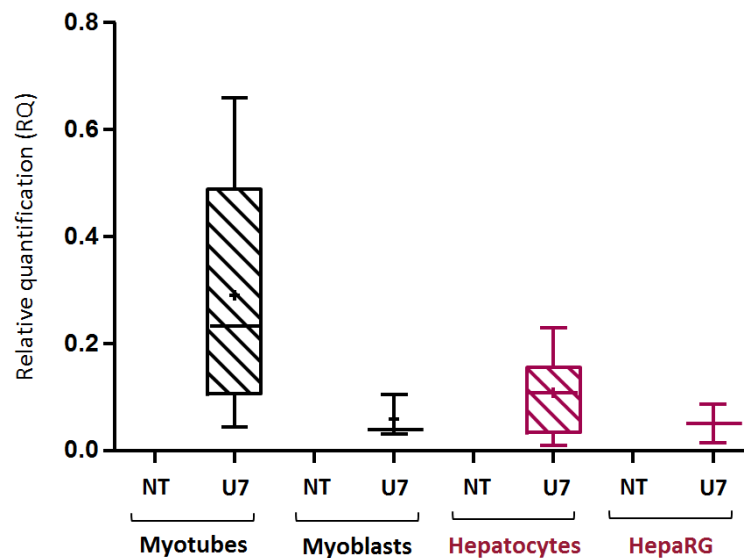


Figure 54: Quantification par RT-QPCR de l'expression du U7snRNA-Jr53 dans les modèles cellulaires humains. Les résultats représentent la valeur médiane (barre centrale), la valeur moyenne (croix), les 1^{er} et le 3^{ème} quartile (boîtes) et les 1^{er} et 9^{ème} déciles (moustaches) de la quantification relative (RQ) du U7snRNA-Jr53 dans des myotubes primaires humains (n=8), des myoblastes primaires humains (n=3), des hépatocytes primaires humains (n=8) et des cellules HepaRG (n=2) non transduits (NT) ou transduits avec un vecteur AAVr-3-U7-Jr53 (U7).

c- Analyse de l'activité moléculaire du U7-Jr53 par RT-PCR nichée

Nous avons finalement caractérisé la fonctionnalité du U7snRNA-Jr53 dans ces cellules par une RT-PCR nichée spécifique du messenger *DMD* humain. Cette RT-PCR nichée permet une amplification du messenger *DMD* des exons 51 à 54.

Alors qu'aucun saut d'exon de l'exon n'est détecté dans les échantillons non transduits (NT), une seconde bande à 344 pb représentant le messenger *DMD* sans l'exon 53 est visible dans tous les échantillons transduits, y compris dans les hépatocytes et les cellules HepaRG. Ces

résultats révèlent donc la pleine activité du U7-Jr53 chez l'Homme, à la fois dans un contexte musculaire et un contexte hépatique (figure 55).

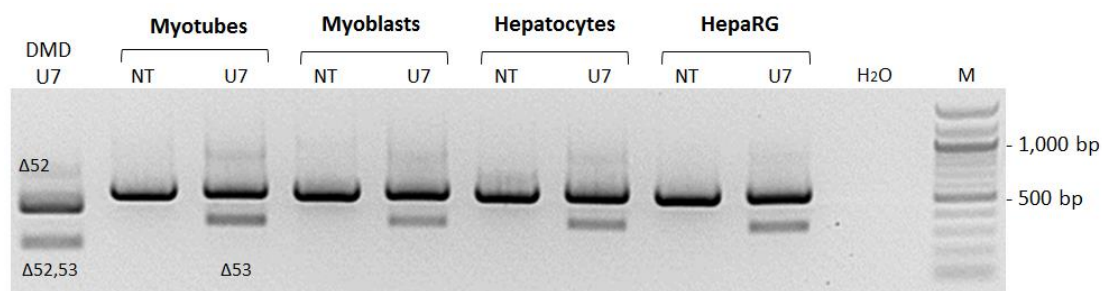


Figure 55 : Analyse du saut d'exon du messager *DMD* dans des cellules humaines non transduites ou transduites avec le vecteur AAVr-3-U7-Jr53. Le messager *DMD* est détecté par RT-PCR nichée amplifiant de l'exon 51 à l'exon 54 dans les myotubes, les myoblastes, les hépatocytes primaires humains et les HepaRG. Le produit PCR (556 pb) détecté dans les échantillons non transduits (NT) correspond à l'ARNm *DMD* avec tous les exons 51 à 54. Après transduction (U7), un nouveau produit PCR apparaît (344 pb) et correspond à l'ARNm en phase dans lequel il manque l'exon 53. Ces résultats sont représentatifs de tous ceux obtenus dans les différentes expériences répétées avec ces mêmes types cellulaires. Le contrôle positif « DMD U7 » correspond à des myotubes de patients DMD ($\Delta 52$) transduits avec un vecteur AAVr-U7-Jr53. H₂O = témoin PCR H₂O.

E- Pourquoi les ARN U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 sont-ils si peu exprimés dans le foie de chien ?

Les potentielles conséquences négatives de l'expression ectopique du U7snRNA-Jr53 dans le foie seront étudiées dans la *PARTIE 2* des résultats, mais nous avons, en parallèle, cherché à expliquer le différentiel d'expression des U7snRNA entre le muscle et le foie, uniquement observé chez les chiens *GRMD* avec les U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8.

Lorsque l'absence d'expression du U7snRNA optimisé dans le foie a été mise en évidence chez le chien, nous avons tout d'abord pensé à un effet « promoteur muscle spécifique ». Or, les constructions U7snRNA sont sous le contrôle du promoteur naturel du U7snRNA WT (wild type), qui est théoriquement ubiquitaire. Nous avons donc cherché à étudier l'expression des U7snRNA WT chez les différentes espèces d'intérêt de notre étude pré-clinique (le chien, le primate non humain et l'Homme). Les séquences des U7snRNA WT canin et simien ne sont pas référencées dans les bases de données, mais nous avons pu les identifier par alignement avec les séquences des U7snRNA WT murin et humain, qui sont eux bien connus. Dans le U7snRNA WT, la région antisens spécifique des ARN pré-messagers des histones et la séquence de fixation aux protéines Sm sont en effet très conservées entre les espèces. Pour

l'analyse de l'expression des U7snRNA WT canin et simien, nous avons développé une analyse par Northern blot (figure 56 A et B) alors que pour le U7 WT humain, les quantités d'ARN récupérées à partir des cellules étant trop restreintes, nous avons mis au point une RT-QPCR spécifique (figure 56 C).

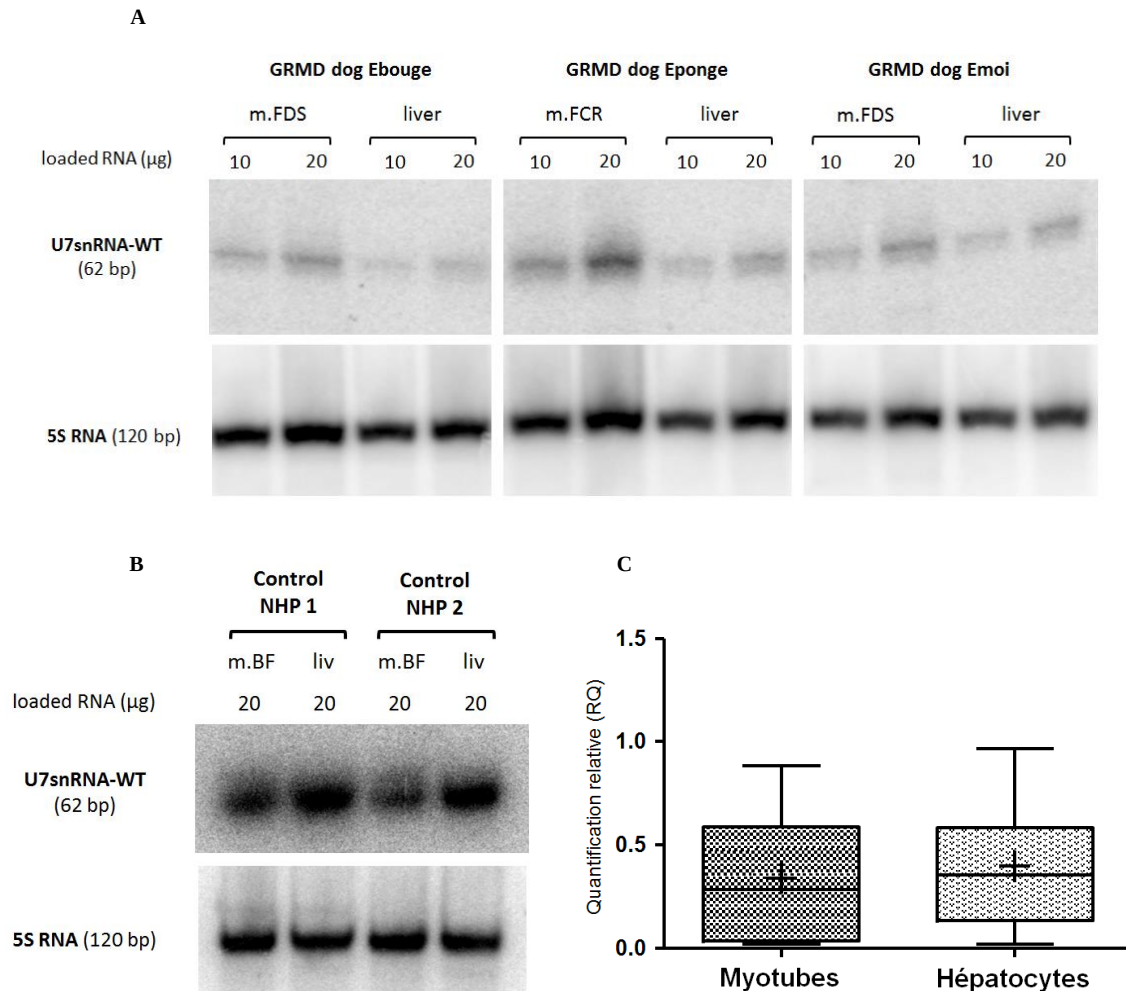


Figure 56 : Analyse de l'expression relative du U7snRNA WT dans le muscle squelettique et le foie, chez le chien, le primate et l'Homme. A: Analyse par Northern blot de l'expression relative du U7snRNA WT canin dans les muscles squelettiques (m. FDS = muscle flexor digitorum superficialis, m. FCR = muscle flexor carpi radialis) et dans le foie (lobe droit) de 3 chiens *GRMD*. L'hybridation a été réalisée avec des sondes radio-marquées au ^{32}P spécifiques du U7 WT canin (panel du haut) et de l'ARNr 5S (panel du bas). Pour chaque ARN, 10 et 20 μg d'ARN ont été chargés. B: Analyse par Northern blot de l'expression relative du U7snRNA WT simien dans un muscle squelettique (m. BF = muscle biceps femoris) et dans le foie (lobe droit) de 2 primates non humains. L'hybridation a été réalisée avec des sondes radio-marquées au ^{32}P spécifiques du U7 WT simien (panel du haut) et de l'ARNr 5S (panel du bas). Pour chaque ARN, 20 μg d'ARN ont été chargés. C: Quantification relative par RT-QPCR de l'expression du U7snRNA WT humain. Les résultats représentent les RQ (la valeur médiane (barre centrale), la valeur moyenne (croix), les 1^{er} et le 3^{ème} quartiles (boîtes) et les 1^{er} et 9^{ème} déciles (moustaches)) obtenus dans des myotubes (n=8) et des hépatocytes (n=8) primaires humains.

Grâce à des sondes radio-marquées au ^{32}P spécifiques de chacun des U7snRNA WT, nous avons été capables de détecter le U7snRNA WT canin (62 pb) dans les ARN extraits à partir des muscles squelettiques et des foies de 3 chiens *GRMD* (figure 56 A) mais aussi le U7snRNA WT simien (62 pb) dans les ARN extraits à partir des muscles et des foies de 2 primates non-humains (figure 56 B). Pour chaque U7-WT, un signal donné par la sonde radioactive est obtenu à la taille attendue, ce qui a permis de valider les séquences identifiées *in silico* par alignement. La détection des ARN 5S a permis de normaliser l'intensité des bandes sur les gels (Genetools) entre le muscle et le foie. Que ce soit pour le U7snRNA WT canin (ratio U7/5S = 1.12 dans le muscle et 0.75 dans le foie) ou le U7snRNA WT simien (ratio U7/5S = 0.8 dans le muscle et 1.1 dans le foie), aucune différence d'expression n'est observée entre ces 2 types tissulaires. Pour le U7snRNA WT humain, les résultats de RT-QPCR réalisées sur les ARN extraits à partir des myotubes et des hépatocytes primaires montrent également que l'expression du U7snRNA WT est similaire entre le muscle et le foie (figure 56 C). Il semble donc que les différences d'expression des U7snRNA optimisés U7-E6 et U7-E8 entre les deux tissus chez le chien *GRMD* ne sont pas dues au promoteur naturel du U7snRNA.

Par la suite, nous avons vérifié si le différentiel d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 observé dans les tissus des chiens *GRMD*, pourrait être dû à un effet d'espèce ou bien encore à un effet de séquence du transgène. En effet, nous avons étudié 3 constructions U7snRNA optimisées différentes (portant des séquences antisens différentes) chez 3 espèces différentes. Or l'absence d'expression dans le foie par rapport au muscle n'est observée qu'avec les U7-E6 et U7-E8 et uniquement chez les chiens *GRMD*. Pour tester ces hypothèses, nous avons imaginé des « tests croisés », représentés sur la figure 57.

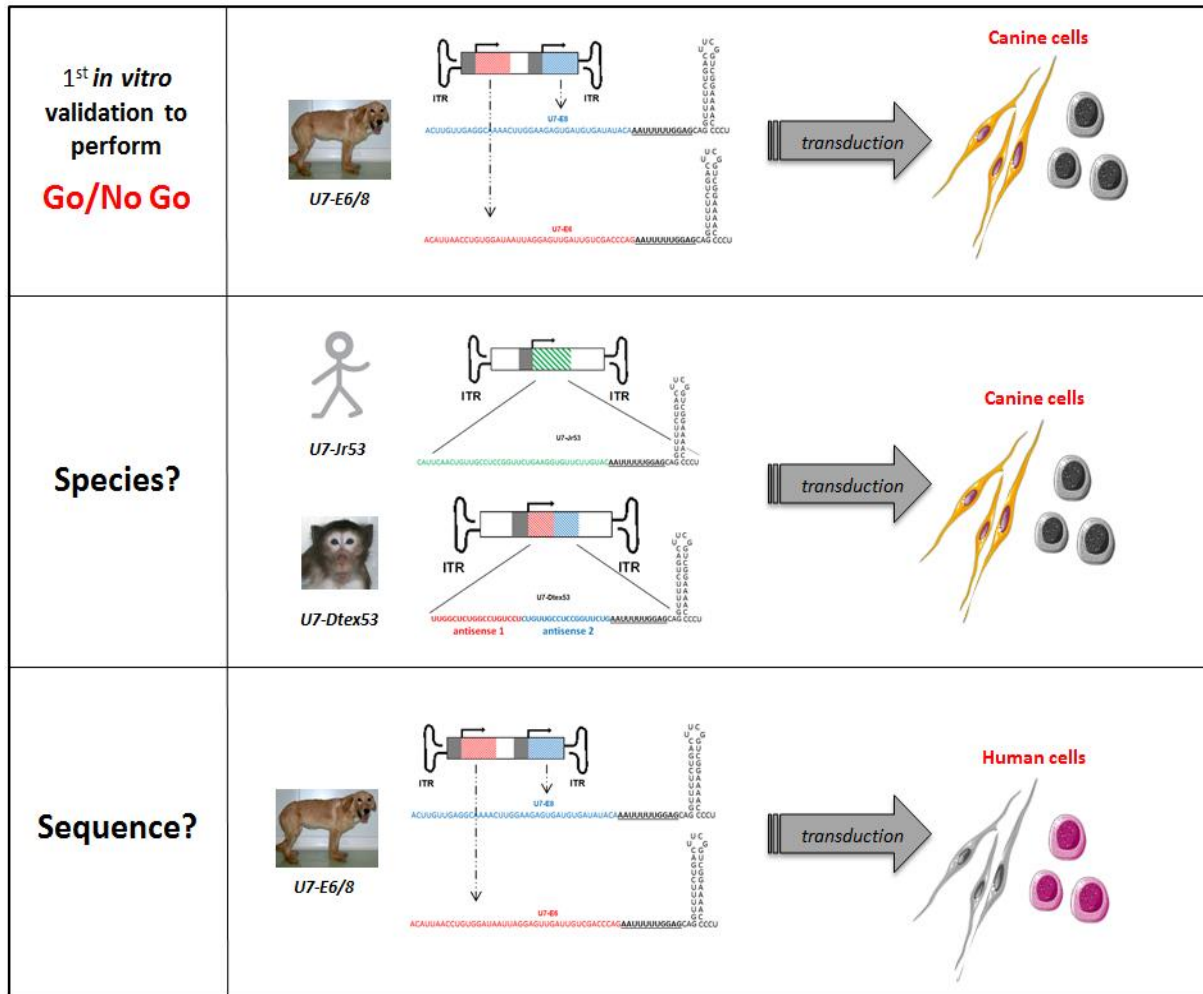


Figure 57 : Représentation schématique des tests croisés imaginés pour comprendre le différentiel d'expression des U7snRNA-E6 et -E8 entre les muscles et le foie chez le chien *GRMD*. Le premier test consiste à valider *in vitro* les résultats obtenus *in vivo* chez les chiens *GRMD*. En cas de non validation des résultats *in vivo*, nous ne continuerons pas les expériences (Go/No Go). Si nous retrouvons une différence d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 entre les cellules hépatiques et musculaires canines, les tests pourront être poursuivis. Pour évaluer si l'espèce a une influence sur l'expression du U7snRNA optimisé dans le foie, nous transduirons des cellules canines avec les AAVr-U7-Jr53 et AAVr-U7-Dtex53. En parallèle, pour évaluer si la c'est la séquence antisens portée par le U7snRNA optimisé qui a elle-même une influence sur son expression dans le foie, nous transduirons des cellules humaines avec un AAVr-U7-E6/E8.

Nous avons débuté avec le premier test décrit dans la figure 57, qui consiste à transduire des cellules canines (myotubes et hépatocytes primaires canins) avec un AAVr-U7-E6/E8, afin de mimer *in vitro* ce qui avait été fait *in vivo* chez les chiens *GRMD*.

Des myotubes et hépatocytes primaires canins ont été transduits avec l'AAVr-8-U7-E6/8 à la MOI 1[°]6 et à respectivement 7 jours et 3 jours post-transduction, l'ARN a été récupéré pour une analyse de l'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 par RT-QPCR (figure 58).

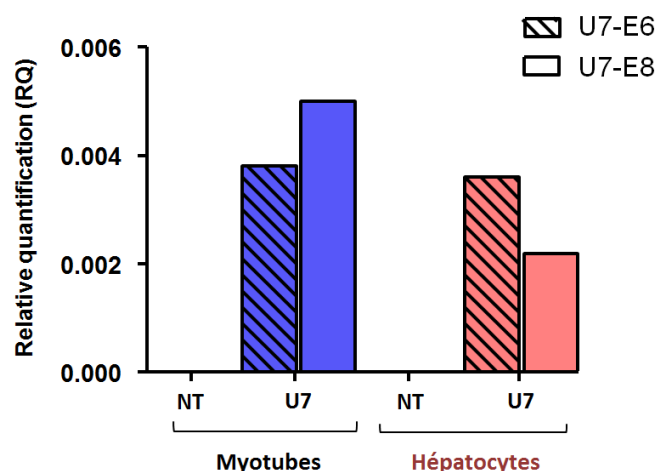


Figure 58 : Quantification par RT-QPCR de l'expression relative des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 *in vitro* dans des cellules canines. Les résultats représentent la quantification relative (RQ) des U7snRNA-E6 (barres hachurées) et U7snRNA-E8 (barres vides) dans des myotubes (n=1) et des hépatocytes (n=1) primaires canins non transduits (NT) ou transduits avec le vecteur AAVr-U7-E6/E8 (U7).

Ces résultats montrent que l'expression des deux U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 est bien détectée dans les myotubes et également dans les hépatocytes canins. Même s'il est impossible de quantifier précisément la différence d'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 entre les deux types cellulaires (problèmes de normalisation par les vg/dg évoqués en D- 2) a-), nous nous attendions à une différence d'expression très marquée entre les deux types cellulaires, comme ce qui était observé *in vivo* chez les chiens *GRMD* (figure 39. Clairement, même si une légère différence d'expression entre les hépatocytes et les myotubes (environ 1.5 fois) est observable, cela ne reproduit pas les résultats obtenus *in vivo* chez les chiens pour lesquels la différence d'expression entre le muscle et le foie observée était de plus grande ampleur (environ 10 fois plus d'expression dans le muscle que dans le foie). Notre test *in vitro* ne permet donc pas de mimer les précédents résultats obtenus *in vivo*. Nous avons décidé de ne pas continuer les analyses présentées sur la figure 57 sur les cellules canines et humaines.

F- Conclusion générale

L'ensemble des résultats présentés dans cette première partie sont en liens étroits avec les résultats de l'essai pré-clinique réalisés chez les chiens *GRMD* injectés avec un AAVr-8-U7snRNA, publiés en 2014 dans *Molecular Therapy* par notre équipe et nos collaborateurs (Le Guiner 2014, en annexe). Si dans cet article, on démontre principalement l'efficacité du produit thérapeutique AAVr-8-U7snRNA pour restaurer l'expression de dystrophine dans les fibres musculaires de chiens *GRMD*, les résultats présentés dans ce manuscrit complètent l'étude pré-clinique en apportant une analyse approfondie de l'expression du transgène thérapeutique et de son activité moléculaire.

Chez les chiens *GRMD*, le niveau d'expression des transgènes U7snRNA optimisés pour le saut des exons 6 et 8 du messager *DMD* canin (U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8) dans les muscles squelettiques corrèle parfaitement avec leur niveau de transduction, représenté par le nombre de copies de vecteur en vg/dg ; mais également par le niveau d'expression de protéine dystrophine dans les mêmes échantillons (Le Guiner 2014, en annexe). Si l'expression des U7snRNA-E6 et -E8 est cohérente dans les muscles squelettiques, les résultats obtenus dans le foie n'étaient pas attendus dans la mesure où le U7snRNA WT est impliqué dans une fonction ubiquitaire de maturation des ARNm des histones. Nous avons en effet détecté une expression très faible, quasi nulle, des U7snRNA-E6 et -E8 dans les foies des chiens *GRMD*, malgré la présence d'un grand nombre de copies de vecteur AAVr. Ces résultats ont été confirmés par 3 techniques différentes (RT-QPCR, northern blot et RT-PCR nichée). Bien que d'un intérêt certain pour la sécurité de notre approche, la faible expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 dans le foie, un tissu non ciblé, semble toutefois être limitée aux chiens *GRMD*.

En effet, dans le cadre de l'étude de toxicologie réglementaire réalisée avant l'essai clinique prévu chez les patients DMD, nous avons réalisé, en suivant la même méthodologie, une analyse approfondie de l'expression d'un autre transgène U7snRNA optimisé pour le saut de l'exon 53 du messager *DMD* humain (U7snRNA-Dtex53) dans les tissus de primates non humains. Contrairement à ce qui était observé chez les chiens, aucune différence d'expression significative du U7snRNA-Dtex53 n'a été détectée entre le foie et le muscle des animaux injectés, ni par RT-QPCR, ni par Northern blot. Nous avons également montré que le U7snRNA-Dtex53 permettait un saut d'exon substantiel de sa cible dans le foie, autant que dans le muscle des primates.

Parce que la question de l'expression ectopique du transgène thérapeutique se doit d'être documentée avant notre essai clinique, et parce que le produit clinique final a été modifié après l'étude de toxicologie (le U7snRNA-Jr53 a remplacé le U7snRNA-Dtex53), nous avons développé des modèles cellulaires pertinents pour une analyse, tout aussi approfondie, de l'expression du transgène U7snRNA optimisé en contexte humain.

L'expression du nouveau transgène clinique U7snRNA-Jr53, optimisé pour le saut de l'exon 53 du messenger *DMD* humain, a été analysé dans des modèles musculaires (myoblastes et myotubes primaires humains) et des modèles hépatiques (hépatocytes primaires humains et cellules HepaRG).

Pour une normalisation de l'expression du U7snRNA-Jr53 *in vitro*, nous souhaitions quantifier uniquement les copies de vecteurs contenues dans le noyau des cellules, et donc transcriptionnellement actives. Mais, dans la mesure où ne nous sommes pas parvenus à fractionner efficacement nos types cellulaires pour isoler la fraction nucléaire, aucune normalisation de l'expression n'a été possible. Pour autant, nous avons montré par RT-QPCR que l'expression du U7snRNA-Jr53 était détectable, et par RT-PCR nichée que l'exon 53 du messenger *DMD* était bien exclu de l'ARNm mature, dans les modèles d'hépatocytes autant que dans les modèles musculaires. Ceci suggère que le produit clinique U7snRNA-Jr53 pourra tout à fait être exprimé dans le foie chez l'Homme.

En parallèle, nous avons montré que les U7snRNA WT canin, simien et humain étaient bien exprimés dans le foie et dans le muscle, de façon ubiquitaire, comme il était attendu. Chez le chien, la faible expression des U7-E6/8 dans le foie, ne peut donc pas être expliquée par une variation d'expression du U7snRNA-WT.

PARTIE 2 :

Recherche des cibles off-targets potentielles du U7snRNA-Jr53 chez l'Homme

Cette partie du projet a été développée afin de compléter les analyses pré-cliniques présentées en partie 1, pour documenter les risques de toxicité potentielle dûs aux off-targets séquence-spécifiques de notre outil U7snRNA-Jr53 optimisé pour le saut de l'exon 53 du messenger *DMD* humain.

Nous considérons en effet que l'expression abondante et continue des U7snRNA-Jr53 dans les cellules pourrait conduire à des effets secondaires non désirés, notamment par une hybridation partielle du U7-Jr53 sur des ARN messagers ou pré-messagers non ciblés. Ces effets sont dénommés « effets off-targets séquence-spécifiques ». Nous avons cherché à évaluer ces effets dans le contexte de cellules musculaires mais aussi dans celui de cellules hépatiques. L'intérêt porté à ces deux types cellulaires est basé sur le fait que lors de nos études pré-cliniques chez l'animal, nous avons pu confirmer *i)* la forte capacité des vecteurs AAVr-8 à transduire les muscles squelettiques mais aussi le foie, et *ii)* l'expression du produit clinique U7snRNA-Jr53 et son activité sur sa cible, l'exon 53 du gène *DMD* humain, dans des myotubes et des hépatocytes primaires humains. Ces résultats nous ont incités à anticiper l'impact de l'expression ectopique du U7snRNA-Jr53 en envisageant ses potentiels effets off-targets aussi bien dans les muscles squelettiques que dans le foie.

La cassette d'expression U7-Jr53 porte une séquence antisens de 40 bases spécifiques de l'exon 53 du gène *DMD* humain (séquence « Jr53 » en vert sur la figure 46). Si la fonction première de cette séquence antisens est de s'hybrider sur l'exon 53 de l'ARN pré-messenger *DMD*, une hybridation même partielle de cette séquence antisens à d'autres ARN pré-messagers pourraient altérer les profils d'épissage des transcrits ciblés. Une telle hybridation sur un ARNm mature pourrait également avoir un impact sur l'expression de celui-ci en provoquant notamment sa dégradation via un effet « siRNA-like ». Dans le cas de transcrits codants, l'expression des protéines codées par ces transcrits cibles off-targets pourraient alors être perturbée.

L'objectif de cette étude a été d'évaluer les potentiels événements off-targets spécifiques du produit thérapeutique U7snRNA-Jr53 au niveau transcriptomique. Pour cela, nous avons utilisé deux approches parallèles : *i)* une analyse simple réalisée *in silico* pour identifier ces potentielles cibles off-targets et *ii)* une analyse transcriptomique exhaustive pour évaluer plus concrètement l'impact du U7snRNA-Jr53 sur l'expression de ces cibles

potentielles, à la fois au niveau de l'épissage alternatif et de l'abondance des ARNm. Cette étude transcriptomique a été réalisée par séquençage massivement parallèle (RNAseq).

Pour être le plus pertinent possible nous avons choisi de réaliser cette étude en contexte humain en utilisant des hépatocytes et des myotubes primaires transduits ou non avec le produit thérapeutique clinique rAAV-U7-Jr53.

A- Stratégie 1 : Analyses in silico des potentielles cibles off-targets spécifiques du produit thérapeutique U7snRNA-Jr53

Dans une première stratégie pour identifier les off-targets spécifiques du produit U7snRNA-Jr53, nous avons recherché, à partir d'une base de données (Refseq, NCBI, release 20140505), tous les ARNm matures possédant un motif de fixation de la séquence antisens du U7snRNA-Jr53.

Pour cela, nous avons utilisé l'algorithme miRanda (Enright 2003, John 2004), créé pour l'identification des cibles des miRNA et donc spécifique des hybridations ARN-ARN. Dans une première phase de sélection, des scores ont été attribués à chaque séquence partiellement complémentaire à la séquence antisens du U7-Jr53. Les paires de bases instables (G:U, « wobble base pair ») ont été autorisées étant donné leur contribution aux duplex ARN:ARN (Ananth 2013). Dans une seconde phase de sélection, les séquences avec les plus haut scores ont été filtrées en fonction de leur valeur d'énergie libre (en kcal/mol), représentant la stabilité thermodynamique du duplex ARN:ARN.

A partir des 98 672 transcrits humains connus de la refseq NCBI, miRanda a identifié 233 537 cibles d'hybridation du U7snRNA-Jr53 sur 69 971 transcrits. Afin de sélectionner des cibles off-targets pertinentes, nous avons fixé des valeurs seuils en nous basant sur les points d'inflexions des courbes de pourcentage d'identité (70%), de similarité (80%), de couverture (80%) et d'énergie (-40kcal/mol) (figure 59).

Résultats - Partie 2

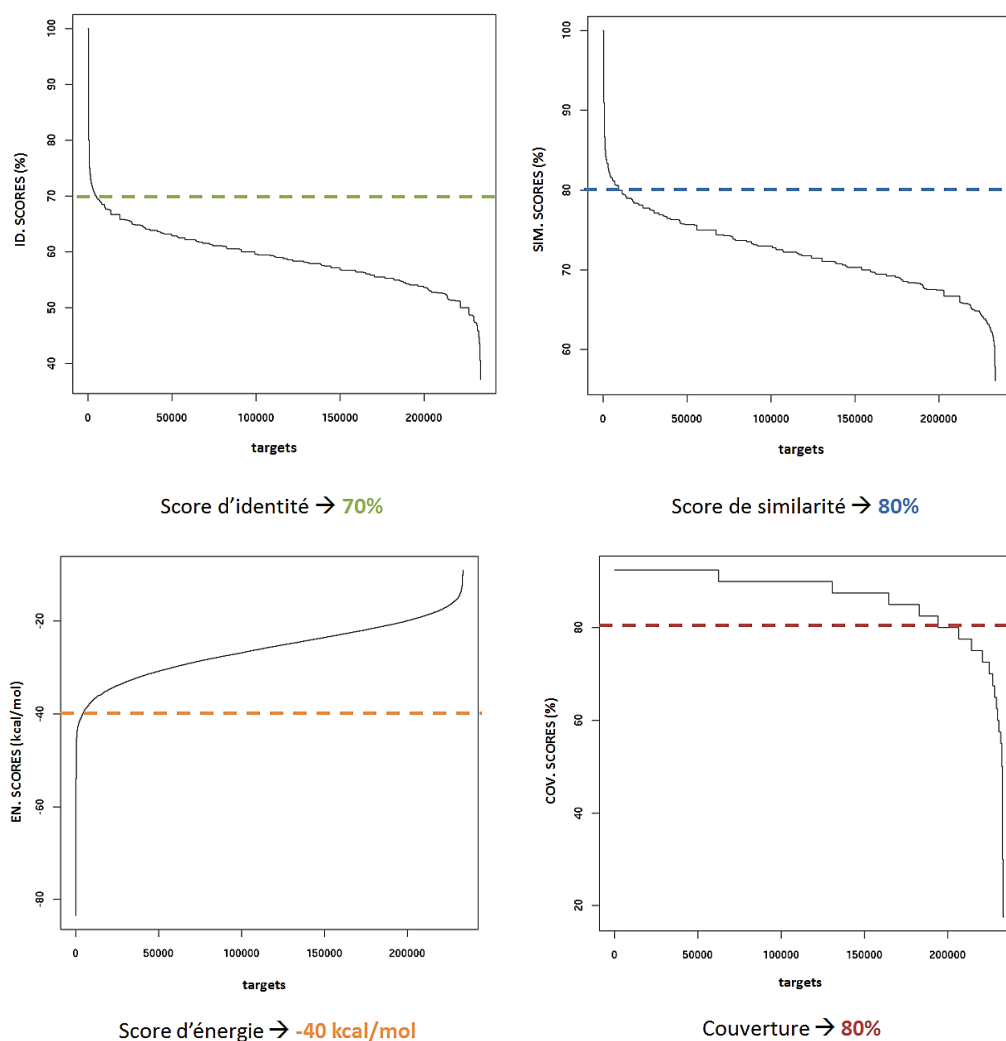


Figure 59 : Distribution des scores miRanda par rapport au nombre de cibles positives pour le U7snRNA-Jr53. Les graphiques représentent les différentes valeurs de scores (ID: identité ; SIM: similarité ; EN: énergie et COV: couverture) en fonction du nombre de cibles potentielles d'hybridation du U7snRNA-Jr53. Pour éviter les faux positifs, nous avons choisi des valeurs seuils qui correspondent aux dernières valeurs avant l'augmentation exponentielle du nombre de cibles pour le U7snRNA-Jr53 : ID : 70%, SIM : 80% et EN : -40 kcal/mol. La couverture n'est pas un élément restrictif puisque la valeur seuil fixée à 80% englobe de très nombreuses cibles (>200 000).

Le score d'identité représente le nombre de bases ayant une complémentarité parfaite avec la cible (séquence antisens du U7snRNA-Jr53) par rapport à la taille de l'alignement, alors que le score de similarité tient aussi compte des paires de bases instables G:U. Le pourcentage de couverture correspond à la taille de la zone de complémentarité par rapport à la taille totale de la séquence antisens portée par le U7snRNA-Jr53 (40 bases). Le tableau 7 représente le nombre de transcrits retenus par miRanda en fonction des critères de sélection appliqués.

Résultats - Partie 2

De façon surprenante, nous obtenons assez peu de transcrits off-target potentiels. Avec une valeur seuil de 80% d'identité, seuls deux gènes sont mis en évidence : le gène *DMD*, bien sûr, avec une identité, une similarité et une couverture avec le U7-Jr53 de 100% et un autre gène, nommé PDE4DIP (phosphodiesterase 4D interacting protein) ou myomegaline, qui code une protéine de liaison aux phosphodiesterases (gene ID sur ncbi : 9659). PDE4DIP est exprimé de façon spécifique dans le cœur et dans le muscle squelettique et possède 80% et 82% d'identité et de similarité, respectivement, avec la séquence antisens du U7snRNA-Jr53. Il présente donc un risque important d'hybridation off-target avec le U7snRNA-Jr53.

Nous avons ensuite diminué la valeur seuil de pourcentage d'identité à 70%, beaucoup moins restrictive, ce qui a permis d'obtenir davantage de candidats off-targets potentiels, tout en restant dans des proportions biologiquement pertinentes (tableau 7). Avec ces critères, 192 transcrits (correspondants à 39 gènes) ont été identifiés avec un motif complémentaire de la séquence antisens du U7snRNA-Jr53 (tableau S1 en annexe).

Tableau 7 : Résultats de prédictions *in silico* des transcrits ayant un motif de fixation du U7snRNA-Jr53 (algorithme miRanda) : nombre de cibles identifiées en fonction des différentes valeurs seuils fixées au moment de l'analyse.

	Identité	Similarité	Couverture	Energie	Intersection
<i>Valeurs seuils</i>	80%	80%	80%	-40kcal/mol	
<i>Prédictions</i>	434	11 059	206 787	4 092	44 transcrits/ 2 gènes
<i>Valeurs seuils</i>	70%	80%	80%	-40kcal/mol	
<i>Prédictions</i>	4 840	11 059	206 787	4 092	192 transcrits/ 39 gènes

Parmi ces 39 gènes, nous avons sélectionné les candidats qui nous paraissaient les plus pertinents afin de vérifier l'impact de ces potentiels effets off-targets par des analyses moléculaires (RT-PCR, RT-QPCR), cela sur des échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains transduits avec un vecteur AAVr-U7-Jr53. Nous avons considéré comme pertinents les candidats *i)* exprimés dans le muscle et/ou dans le foie à un niveau élevé, et *ii)* présentant les pourcentages d'identité et de similarité les plus élevés.

Pour évaluer le niveau d'expression de ces différents gènes candidats dans le muscle et le foie, nous nous sommes aidés d'une base de données d'expression (<http://www.germonline.org>) qui héberge les résultats d'une étude transcriptomique par microarrays réalisée sur de nombreux gènes et dans un large panel de tissus différents (Chalmel 2012).

Résultats - Partie 2

Nous avons finalement porté notre attention sur 6 gènes candidats (sur les 39 de départ), présentés dans le tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques des 6 gènes candidats sélectionnés pour des validations expérimentales, après filtration via le logiciel miRanda. Les niveaux d'expression théoriques dans les tissus muscle et foie (germOnline database), les scores d'identité et de similarité, ainsi que la zone de fixation de la séquence U7snRNA-Jr53 dans chacun de ces gènes, sont indiqués.

Gènes candidats		Expression théorique		Scores miRanda		Zone de fixation du U7snRNA-Jr53
		muscle	foie	identité	similarité	
PDE4DIP	phosphodiesterase 4D interacting protein/myomegalin	+++	+/-	80.00%	82.86%	Exon
DST	dystonin	++	+	71.05%	84.21%	Exon
TOP1	topoisomerase (DNA) I	+	++	78.38%	86.49%	Exon
SNTB2	syntrophin, beta 2	+	+/-	72.22%	80.56%	3'UTR
DMGDH	dimethylglycine dehydrogenase	-	++	71.43%	83.33%	Jonction d'exons
NDUFB10	NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex, 10	++	++	70.59%	85.29%	Jonction d'exons

Selon la localisation du motif de fixation du U7snRNA-Jr53 sur le transcrit candidat, différentes stratégies ont été développées pour la validation moléculaire de ces cibles off-targets.

Lorsque le motif de fixation de la séquence antisens du U7-Jr53 se situe dans un exon (cas des candidats PDE4DIP, DST et TOP1), il y a un risque pour que l'hybridation du U7snRNA-Jr53 masque un élément régulateur d'épissage et provoque un saut ou une inclusion de cet exon. Pour ces candidats, nous avons donc mis au point des RT-PCR nichées spécifiques afin de mettre en évidence un différentiel d'épissage.

Par contre, lorsque le motif de fixation se situe sur une jonction d'exon ou dans le 3'UTR (cas des candidats SNTB2, DMGDH et NDUFB10), il y a plus de risque d'avoir une modification globale du niveau d'expression du transcrit, via une modification de la stabilité de l'ARNm concerné. Nous avons donc mis au point des RT-QPCR spécifiques pour analyser les différentiels d'expression de ces candidats.

Les RT-PCR nichées ont été réalisées avec des amorces externes et internes encadrant l'exon contenant le site putatif de fixation de la séquence antisens du U7s-Jr53 pour les 3 gènes candidats PDE4DIP, DST et TOP1. Les résultats obtenus dans des échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains transduits avec un AAVr-3-U7-Jr53

Résultats - Partie 2

(échantillons présentés en 1^{ère} partie des résultats) sont représentés sur la figure 60. Le saut de l'exon 53 du messenger *DMD*, notre cible, a été analysé sur les mêmes échantillons. Nous détectons très nettement une bande correspondant à l'ARNm *DMD* sans l'exon 53 dans tous les échantillons transduits (U7), que ce soit les myotubes ou les hépatocytes. Par contre, aucune modification d'épissage n'est visible dans les échantillons transduits pour les 3 gènes candidats testés. Aucun effet off-target ne semble se produire pour les gènes *PDE4DIP*, *DST* et *TOP1*, malgré leur hybridation potentielle au U7snRNA-Jr53.

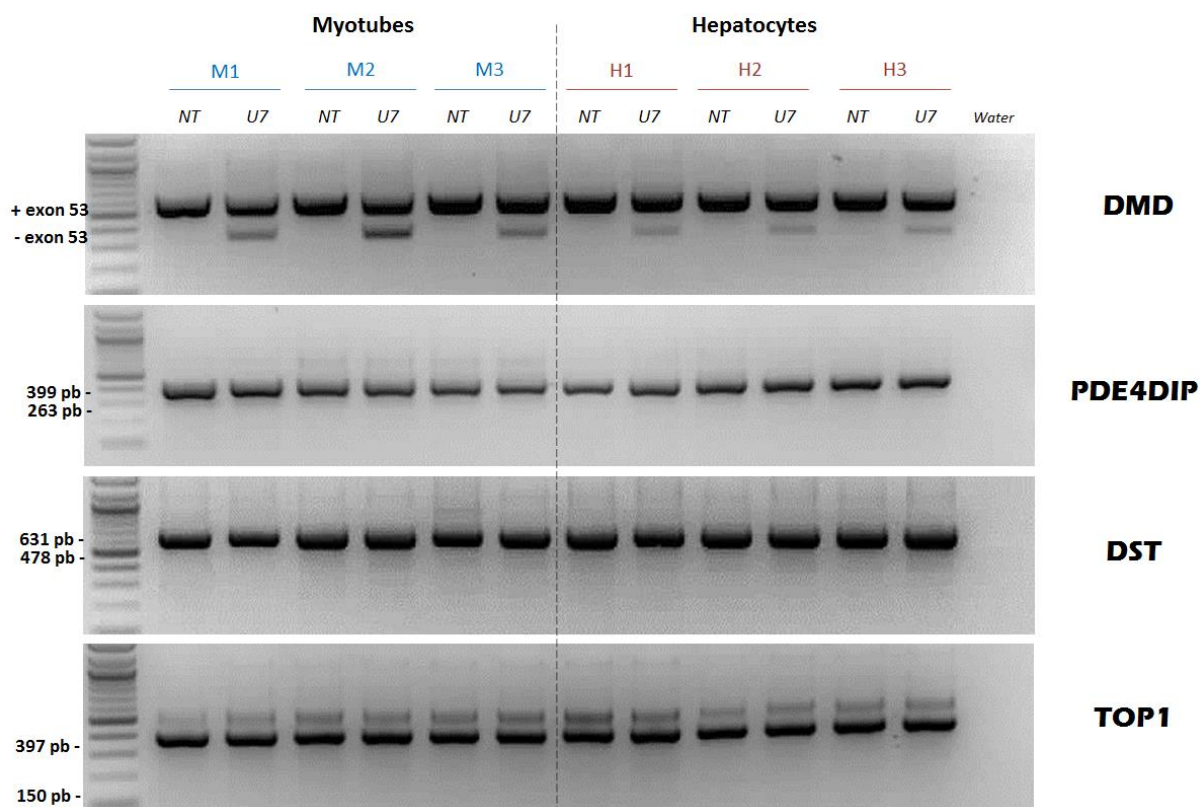


Figure 60 : Analyse par RT-PCR nichée des effets off-targets potentiels sur les messagers des gènes candidats *PDE4DIP*, *DST* et *TOP1*. Les analyses sont réalisées sur des myotubes (n=3) et des hépatocytes (n=3) primaires humains non transduits (NT) ou transduits avec un vecteur AAVr-3-U7-Jr53 (U7). Pour chaque gène, des amorces encadrant l'exon « off-target » (possédant le site de fixation potentiel du U7snRNA-Jr53) permettent l'amplification du messenger et des bandes à la taille attendue sont obtenues (399, 631 et 397 pb respectivement pour *PDE4DIP*, *DST* et *TOP1*). Sont également indiquées les tailles en pb des amplicons attendus en cas du saut de l'exon « off-target ». Pour le contrôle ARNm *DMD*, la RT-PCR permet une amplification du messenger entre les exons 51 et 54. Water = contrôle de PCR réalisée en présence d'H₂O uniquement.

Pour les 3 autres gènes candidats (*SNTB2*, *NDUFB10* et *DMGDH*), nous avons développé des RT-QPCR spécifiques et analysé leur expression dans ces mêmes échantillons de myotubes et d'hépatocytes humains transduits avec l'AAVr-3-U7-Jr53 (figure 61). Nous détectons bien l'expression des 3 gènes candidats dans les différents échantillons. Par contre, aucune différence d'expression n'est observée entre les échantillons transduits (U7) et non

transduits (NT), que ce soit dans les myotubes ou dans les hépatocytes, et cela pour les 3 gènes testés. A noter que l'expression du U7-Jr53 a bien été validée dans ces mêmes échantillons transduits (résultats non présentés). Aucun effet off-target ne semble donc se produire pour les gènes *SNTB2*, *NDUFB10* et *DMGDH*.

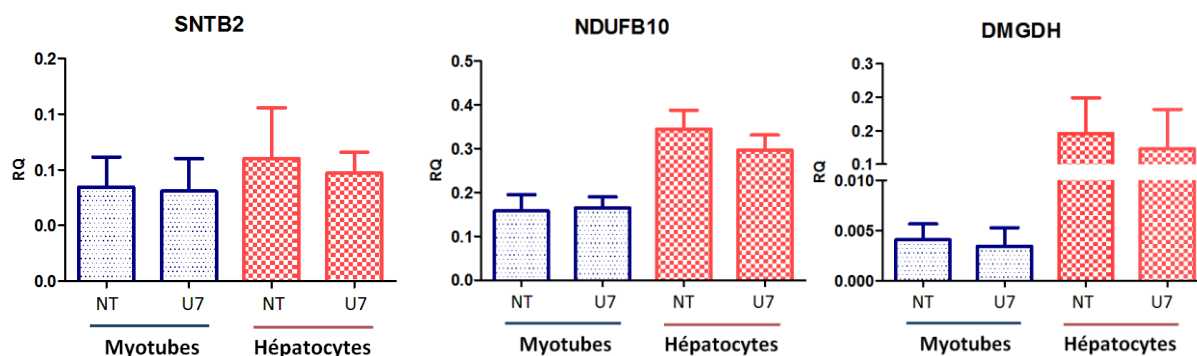


Figure 61 : Analyse par RT-QPCR des effets off-targets sur les messagers des gènes candidats *SNTB2*, *NDUFB10* et *DMGDH*. Pour chaque gène, les résultats représentent les moyennes avec écart-types de la quantification relative (RQ) des transcrits *SNTB2*, *NDUFB10* et *DMGDH* dans des myotubes (n=3) et des hépatocytes (n=3) primaires humains non transduits (NT) ou transduits avec un vecteur AAV-U7-Jr53 (U7).

Cette première approche de recherche *in silico* des cibles off-targets spécifiques de la séquence antisens du U7snRNA-Jr53 nous a donc permis d'identifier un certain nombre de transcrits candidats possédant un motif de fixation de cette séquence. Par contre, parmi les 6 candidats possédant les plus grandes homologues de séquences et choisis pour être validés expérimentalement, aucun n'est affecté, soit en épissage soit en expression par la transduction du vecteur U7-Jr53.

Dans la plupart des études de recherche de cibles off-targets (évoquées en introduction, *Chapitre 4*), les auteurs se contentent de ce type d'approche : une identification des cibles *in silico*, suivie de validations expérimentales au niveau moléculaire. Dans la mesure où nous n'avons observé aucun effet off-target et étant donné le peu de candidats identifiés avec cette 1^{ère} stratégie, il nous a paru compliqué de conclure quant aux réels effets off-targets de notre outil thérapeutique U7snRNA-Jr53 avec cette seule approche. Nous avons donc souhaité développer une approche expérimentale beaucoup plus exhaustive, basée sur une analyse transcriptomique par RNAseq de cellules primaires humaines transduites par le vecteur AAVr-U7-Jr53.

B- Stratégie 2 : Analyse transcriptomique des potentiels effets off-targets du produit thérapeutique U7snRNA-Jr53 par analyses RNAseq

1) Approche méthodologique

L'intérêt d'utiliser pour ce projet une analyse par RNAseq était de pouvoir séquencer et quantifier l'entièreté des ARN exprimés dans nos cellules d'intérêt, y compris les ARN non codants (et notamment les lincRNA) et les isoformes de transcrits encore non référencées. Une telle approche est la seule aujourd'hui permettant d'identifier expérimentalement et de manière exhaustive les événements off-targets spécifiques de la séquence antisens thérapeutique du U7snRNA-Jr53, à l'échelle globale du transcriptome humain.

Nous avons focalisé cette analyse par séquençage sur les modèles cellulaires les plus pertinents que nous ayons développés, c'est-à-dire les modèles d'hépatocytes et de myotubes primaires humains. Nous avons travaillé avec 3 répliquats biologiques pour chaque type cellulaire : 3 souches de myotubes issues de muscles de 3 patients différents (MT_1, MT_2 et MT_3), et 3 lots d'hépatocytes issus de 3 patients différents (HEP_1, HEP_2 et HEP_3). Pour chaque échantillon transduit avec un AAVr-3-U7-Jr53, nous avons séquençé en parallèle le contrôle non transduit, soit 12 échantillons au total.

Au terme de l'analyse des données de RNAseq, nous avons prévu de réaliser des validations expérimentales sur les candidats off-targets ainsi identifiés. Lors de ces validations expérimentales par RT-PCR ou RT-QPCR, nous inclurons un contrôle U7snRNA-Scramble, portant une séquence antisens différente de celle du U7-Jr53, et qui nous permettra de confirmer la spécificité des effets off-targets du U7snRNA-Jr53. Nous reviendrons sur ces validations expérimentales en fin de résultats (en paragraphe 4)).

Les bibliothèques d'ADNc (protocole Ribozero, soit avec une déplétion des ARN ribosomiques) et le séquençage de nos 12 échantillons expérimentaux ont été réalisés par la plateforme de séquençage et microarrays IGBMC (Strasbourg, France). Avant l'envoi des 12 échantillons à cette plateforme, nous avons validé :

- La qualité des ARN :

La qualité des ARN totaux extraits à partir des cellules, leur intégrité et l'absence de contamination en ADNg ont été validés par électrophorèse capillaire sur un bioanalyser 2100 (Agilent). Le RIN (RNA integrity number) et le ratio des ARN ribosomiques 28S/18S ont été

calculés pour chaque échantillon. Pour chacun de nos échantillons, ils répondaient aux critères de la plateforme de séquençage ($RIN \geq 7.5$ et $28S/18S \geq 1.6$).

- L'expression du U7-Jr53 dans les échantillons transduits et l'effet sur la cible *DMD* :

Dans un premier temps, nous avons vérifié, via une RT-QPCR spécifique du transgène U7snRNA-Jr53, que son expression était détectable dans tous nos échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains transduits (figure 62). Ces analyses par RT-QPCR nous ont permis, en parallèle, de vérifier l'absence de contamination des échantillons en ADN viral puisque les échantillons contrôles sans reverse transcriptase (RT-) avaient des valeurs de Ct inférieures à la limite de quantification ($Ct < LOQ$, non montré).

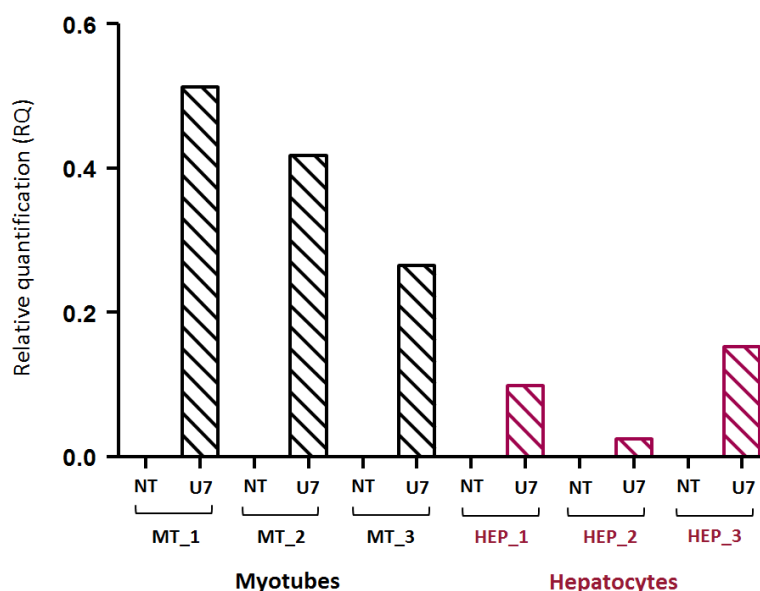


Figure 62 : Quantification par RT-QPCR de l'expression du U7snRNA-Jr53 dans les échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains non transduits (NT) ou transduits avec un vecteur AAVr-3-U7-Jr53 (U7) analysés en RNAseq. Les résultats représentent la quantification relative (RQ) du U7snRNA-Jr53 dans chacun des échantillons. Aucune expression du U7snRNA-Jr53 n'a été détectée dans les échantillons non transduits (NT).

Puis, dans un second temps, nous avons validé l'activité moléculaire du U7snRNA-Jr53 sur sa cible *DMD* en analysant le saut de l'exon 53 dans ce messenger par RT-PCR nichée (revoir figure 60, panel du haut).

Les bibliothèques d'ADNc générées à partir des différents ARN à analyser ont été séquencées sur un Hiseq 2500 (Illumina) avec une lecture de fragments de 100 bases, paillés (paired-end) et brins spécifiques. Ce protocole est particulièrement adapté à l'identification de

variants d'épissage. Après séquençage, nous avons obtenu environ 2 milliards de séquences (ou reads) (soit environ 150 millions de reads par échantillon) qui ont été alignés sur la dernière version du génome humain (GRCh38.p3) en utilisant le logiciel STAR 2.4.2a (Dobin 2013).

L'identification des potentiels effets off-target de la séquence antisens portée par le U7snRNA-Jr53 a été réalisée par une analyse parallèle *i)* de l'épissage différentiel des exons (logiciel DEXSEQ) et *ii)* de l'expression différentielle des gènes (logiciel DESEQ2) (voir figure 72 en *Matériel et méthodes*).

2) Analyse des effets du U7snRNA-Jr53 sur l'épissage d'exons au niveau du transcriptome humain

a- Approche analytique via le logiciel DEXseq

Des fichiers d'alignement .bam ont été obtenus après l'alignement des reads de RNAseq sur le génome humain. Ces fichiers indiquent pour chaque read sa position d'origine par rapport au génome, ainsi que les caractéristiques de l'alignement. Ils précisent notamment si les reads sont alignés totalement sur un exon ou s'ils chevauchent une jonction exon-exon (reads jonctionnels) (figure 63). Ces données d'alignement sont ensuite utilisées pour générer un profil d'expression pour chaque exon/jonction d'exons. Pour analyser les variations d'épissage entre nos échantillons transduits et non transduits, nous avons utilisé le logiciel DEXseq, basé sur une méthode d'analyse statistique qui permet d'estimer directement l'utilisation différentielle des exons, sans étape d'assemblage des transcrits (Anders 2012). Il est possible d'utiliser uniquement les données jonctionnelles d'alignement comme fichiers d'entrée pour DEXseq. Cela permet non pas une quantification de l'utilisation des exons, mais une quantification de l'utilisation des jonctions d'exons (Li Y. 2015b). La taille médiane d'un exon étant de 122 nucléotides, une très large proportion des reads (de 100 nt) correspondent à des reads jonctionnels.

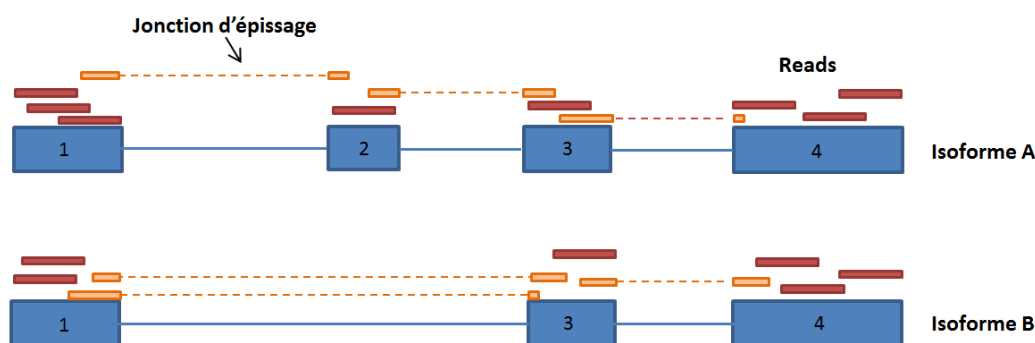


Figure 63: Illustration de l'alignement de reads obtenus après RNAseq sur deux isoformes d'un transcrit. Les reads sont représentés par les fins rectangles : les reads rouges sont alignés sur les parties exoniques et les reads oranges représentent des reads s'alignant au niveau de jonctions d'exons. Si l'on compare les 2 isoformes, on voit qu'une nouvelle jonction entre les exons 1 et 3 apparaît spécifiquement pour l'isoforme B.

Concrètement, l'analyse que nous avons menée à partir des données jonctionnelles permet de mettre en évidence toutes les jonctions différemment utilisées, c'est-à-dire les exons différemment épissés (un saut ou une inclusion d'exon dans l'ARNm mature par exemple) entre les échantillons non transduits et les échantillons transduits par l'AAVr-U7-Jr53.

b- Validation du saut d'exon sur l'ARNm DMD, cible du U7snRNA-Jr53

La recherche de off-targets via cette méthode analytique ne pouvait être justifiée que si nous parvenions à détecter l'effet du U7snRNA-Jr53 sur sa cible, l'exon 53 du messenger *DMD* humain. Nous avons donc commencé par vérifier si une utilisation différentielle de la jonction des exons 52-54 du gène *DMD* était visible dans les données de séquençage issues de nos échantillons expérimentaux.

La figure 64 représente l'alignement des reads (sashimi plot) sur le locus de *DMD* et centré sur l'exon 53 de *DMD* dans les 12 échantillons de myotubes et d'hépatocytes séquencés.

Dans chacun des échantillons de myotubes (figure 64 A), nous distinguons sans ambiguïté l'utilisation de la jonction 52-54 dans les échantillons transduits avec respectivement 16, 32 et 43 reads alignés dans les échantillons MT_1, MT_2 et MT_3. Aucun épissage 52-54 n'est par contre visible dans les échantillons non transduits (MT_NT_1, MT_NT_2, MT_NT_3). Un pourcentage d'utilisation de la jonction 52-54 peut être donc calculé dans les échantillons de myotubes transduits, selon la formule $(J[52-54]/(J[52-54]+J[52-53]))$. Ainsi, dans ces

échantillons, environ 15 % des réactions d'épissage impliquant l'exon 52 correspondent à un saut de l'exon 53.

Dans les hépatocytes (figure 64 B), le niveau d'expression du gène *DMD* est environ 10 fois inférieur au niveau détecté dans les myotubes. L'utilisation de la jonction 52-54 y est donc moins marquée. Dans les échantillons transduits HEP_U7_1 et HEP_U7_2, on distingue tout de même 3 reads alignés sur la nouvelle jonction 52-54, alors qu'aucun read n'y est aligné dans les échantillons non transduits correspondants.

En s'appuyant sur les données jonctionnelles, le RNAseq permet donc d'observer la modification d'épissage du messenger *DMD* au niveau de l'exon 53, suite à la transduction par l'AAVr-U7-Jr53 dans les myotubes. Dans les hépatocytes, le saut de l'exon 53 est également présent mais le faible niveau d'expression du messenger *DMD* rend l'évènement plus difficile à détecter en RNAseq à la profondeur de séquençage utilisée.

Résultats - Partie 2

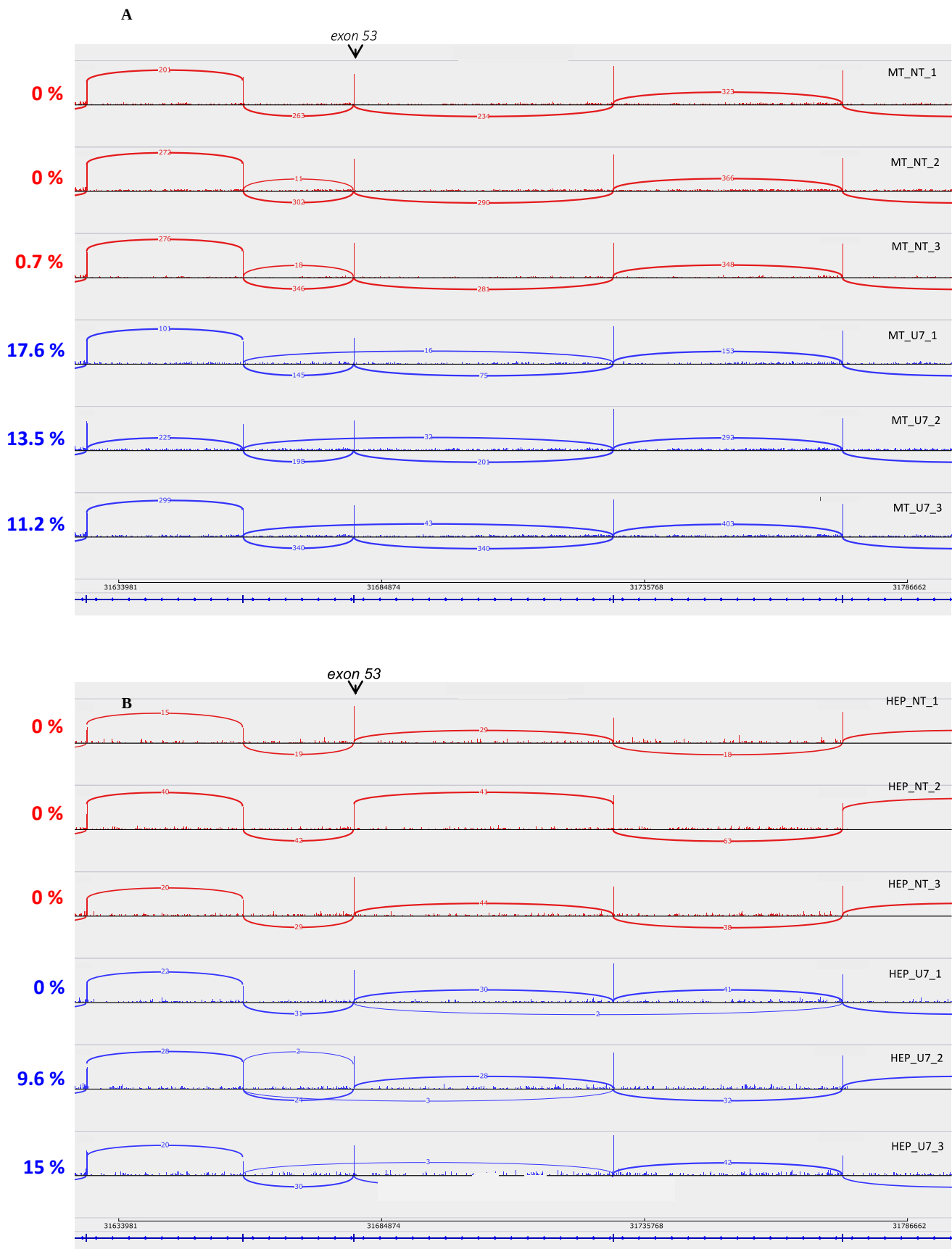


Figure 64 : Sashimi plot (logiciel « Integrative Genomics Viewer ») montrant le nombre de reads obtenus et alignés au niveau du transcrit *DMD*, après RNAseq d'échantillons de myotubes primaires humains (MT) (A) et d'hépatocytes primaires humains (HEP) (B) non transduits (NT) ou transduits avec un AAVr-U7-Jr53 (U7). Les

alignements dans les exons sont représentés comme une densité de reads (pics) et les alignements sur les jonctions d'épissage sont représentés par des arcs entre deux exons. Le nombre de reads alignés sur chaque jonction est indiqué au niveau de chaque arc. Les pourcentages de saut de l'exon 53 au niveau du messenger *DMD*, estimés à partir de ces données, sont indiqués pour chaque échantillon.

c- Analyse des jonctions d'exons différenciellement utilisées dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53

Dans nos échantillons de myotubes primaires humains, à partir des données jonctionnelles d'alignement, DEXseq a mis en évidence un petit nombre seulement de transcrits montrant au moins un exon différenciellement épissé (c'est-à-dire avec une jonction d'exons différenciellement utilisée) entre les échantillons transduits et non transduits.

Pour chaque jonction altérée, une valeur de fold change (FC) a été calculée par DEXseq. Cette valeur représente la différence d'utilisation de la jonction entre les échantillons transduits et non transduits. Une valeur positive de FC représente une augmentation de l'utilisation d'une jonction tandis qu'une valeur négative du FC représente au contraire une diminution de l'utilisation d'une jonction.

Les données de FC obtenues pour chacune des jonctions d'exons analysées dans nos différents échantillons de myotubes par DEXseq sont représentées soit en fonction de la moyenne d'expression de la jonction (MAplot, figure 65 A), soit en fonction de la significativité de l'utilisation de cette jonction (volcano plot, figure 65 B). Les jonctions identifiées comme statistiquement différenciellement utilisées entre les myotubes transduits et non transduits ($\text{padj} \leq 0.05$, probabilité ajustée pour tests multiples), soit 24 jonctions représentant un total de 17 transcrits, sont représentées en rouge sur les graphiques et listées dans le tableau S2 en annexe.

Le MAplot pour les échantillons de myotubes semble indiquer que peu de gènes présentent des variations d'épissage importantes et significatives. En effet, les valeurs de FC les plus importantes (situées autour de ± 5 en $\log_2(\text{FC})$) sont obtenues pour des jonctions dont le niveau d'expression est très faible, les valeurs d'expression moyennes se situant entre 2 et 4 pour les jonctions identifiées sur les transcrits *PALLD*, *KDM5A*, *PDSS2*, *ISPD* et *TRIB1*. Pour comparaison, la jonction des exons 52-54 au niveau du transcrit *DMD* montre une expression moyenne de 13 (figure 65 A). Si ces différentes modifications d'épissage, pourraient être considérées comme des effets off-targets, elles seront difficiles à confirmer par des techniques moléculaires classiques et n'ont pas forcément de signification biologique

pertinente. Les transcrits dont les jonctions sont beaucoup plus utilisées ont au contraire des valeurs de $\log_2(\text{FC})$ proches de 0 et ne semblent donc pas avoir un épissage qui est altéré dans les échantillons transduits par l'AAVr-U7-Jr53.

Le deuxième graphique, volcano plot, nous donne une indication supplémentaire sur les mêmes données, qui est la significativité statistique des valeurs de FC pour chacune des jonctions. Il ressort nettement que l'utilisation d'une des jonctions du gène *DMD* est augmentée de façon importante ($\log_2(\text{FC}) = 2.72$) et significativement modifiée par la transduction avec l'AAVr-U7-Jr53 dans nos échantillons de myotubes (figure 65 B). Cette jonction correspond bien sûr à la jonction 52-54 décrite sur la figure 64, et donc au saut de l'exon 53.

Dans nos échantillons d'hépatocytes primaires humains, le principe de l'analyse a été le même. DEXseq a identifié 36 jonctions statistiquement différenciellement utilisées entre les échantillons transduits et non transduits ($\text{padj} \leq 0.05$), situées sur un total de 31 transcrits. Les données de FC obtenues pour chacune des jonctions analysées dans les hépatocytes ont également été représentées sur un MAplot, figure 66 A et sur un volcano plot figure 66 A. Les 36 jonctions statistiquement différenciellement utilisées sont représentées en rouge sur les graphiques et listées dans le tableau S3 en annexe.

Le MAplot pour ces échantillons montre que les variations d'épissage dans les hépatocytes sont très limitées. On peut en effet observer que la dynamique des variations d'épissage est très faible, s'étalant entre -0.75 et + 0.5 alors qu'elle s'étalait de -8 à + 8 pour les échantillons de myotubes. Même si les variations sont faibles ($\log_2(\text{FC}) < 1$), on constate que les jonctions altérées sont assez fortement exprimées. Malgré tout, seul le transcrit MDM2 semble se détacher des autres puisqu'il est le seul à présenter un niveau d'expression élevé et une jonction différenciellement utilisée avec un $\log_2(\text{FC}) = -0.56$. Sur le volcano plot, une des jonctions altérées de MDM2 ressort également comme très significative.

Comme le suggéraient les sashimis plots, les variations de l'épissage du transcrit *DMD* dans les hépatocytes sont trop faibles et/ou pas suffisamment homogènes entre les 3 échantillons HEP_1, HEP_2 et HEP_3 pour être détectées par cette analyse via DEXseq.

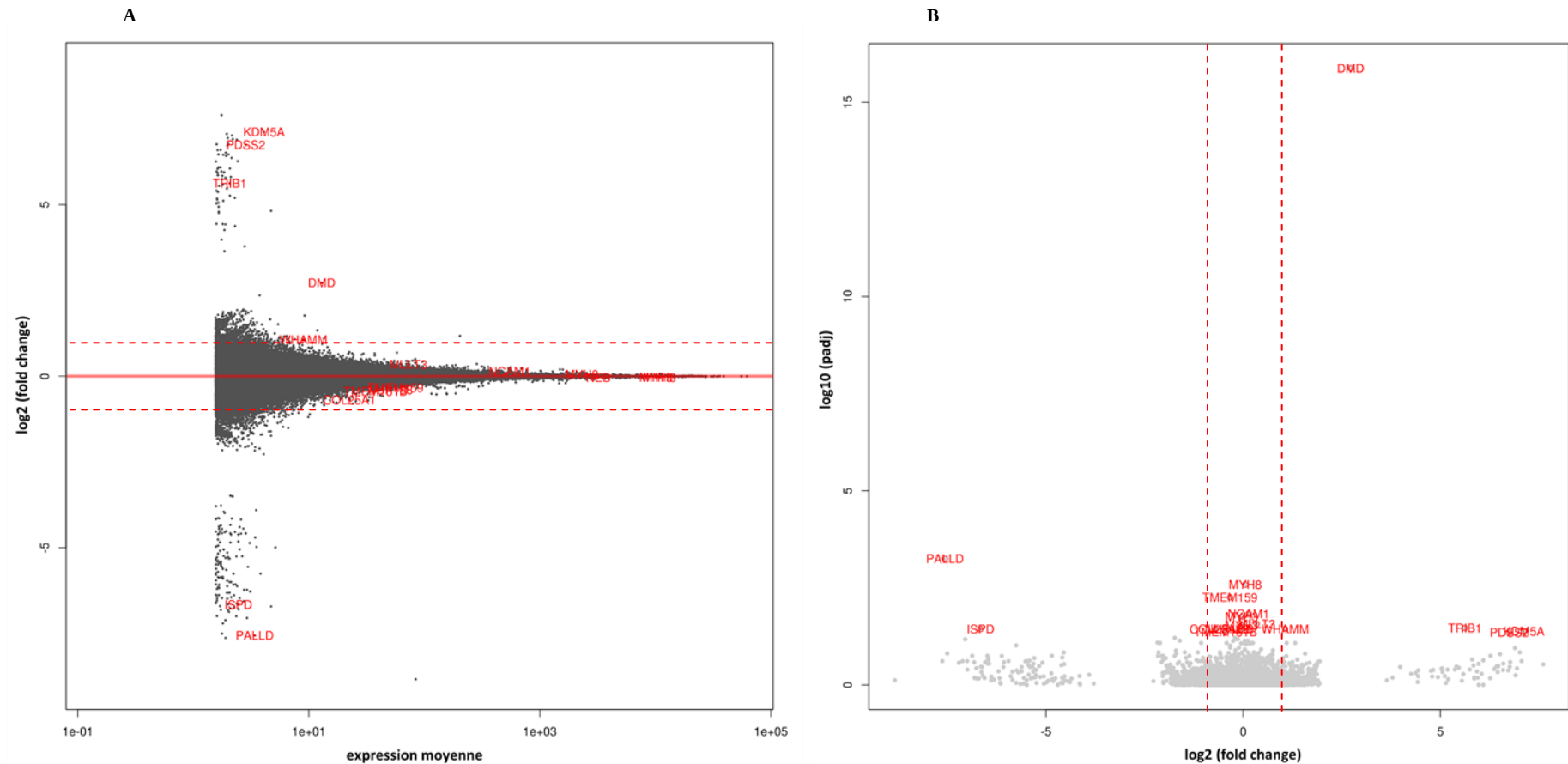


Figure 65 : Représentation des variations d'utilisation de jonctions d'exons analysées par DEXseq entre les myotubes primaires humains non transduits et transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53. A : Le MAplot représente le $\log_2$ du fold change ($\log_2(\text{FC})$) de chaque jonction (entre les échantillons transduits et non transduits) en fonction de l'expression moyenne de la jonction. B : Le volcano plot représente le $\log_{10}$ de la pvalue ajustée (padj) en fonction du $\log_2(\text{FC})$ de chaque jonction (entre les échantillons transduits et non transduits). Sur les deux graphiques, chaque point représente une jonction d'exon et les noms précisés en rouge représentent les jonctions pour lesquelles la padj est ≤ 0.05 . Les lignes pointillées représentent les seuils au-delà desquels le fold change (FC) est supérieur à 2 ou -2 (ce qui correspond à $\log_2(\text{FC}) = 1$ ou -1) entre les échantillons transduits et non transduits.

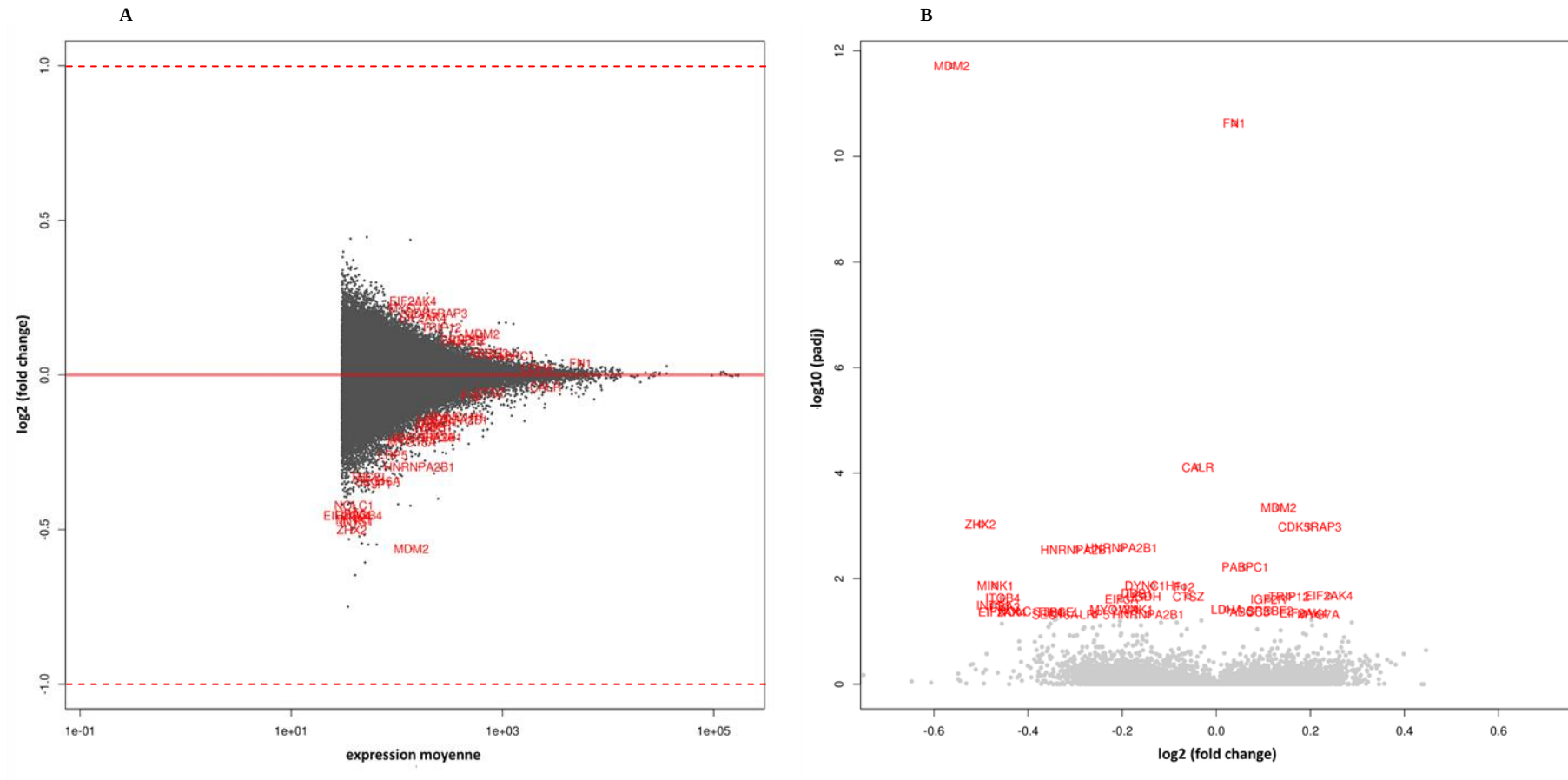


Figure 66 : Représentation des variations d'utilisation de jonctions d'exons analysées par DEXseq entre les hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53. A : Le MAplot représente le log2 du fold change ($\log_2(\text{FC})$) de chaque jonction (entre les échantillons transduits et non transduits) en fonction de l'expression moyenne de la jonction. B : Le volcano plot représente le log10 de la pvalue ajustée (padj) en fonction du $\log_2(\text{FC})$ de chaque jonction (entre les échantillons transduits et non transduits). Sur les deux graphiques, chaque point représente une jonction d'exon et les noms précisés en rouge représentent les jonctions pour lesquelles la padj est ≤ 0.05 . Les lignes pointillées représentent les seuils au-delà desquels le fold change (FC) est supérieur à 2 ou -2 (ce qui correspond à $\log_2(\text{FC}) = 1$ ou -1) entre les échantillons transduits et non transduits.

d- Analyse ciblée des jonctions différentiellement utilisées dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53: identification des candidats off-targets possédant un motif de fixation du U7snRNA-Jr53

Parmi les jonctions d'exons identifiées comme étant différentiellement utilisées entre nos échantillons transduits et non transduits (24 pour les échantillons de myotubes et 36 pour les échantillons d'hépatocytes), nous avons recherché quelles étaient celles qui chevauchaient une région exonique contenant une cible potentielle de fixation de la séquence antisens portée par le U7snRNA-Jr53.

Pour cela, nous avons réalisé une recherche *in silico* de tous les « exons étendus » possédant un motif de fixation de la séquence antisens du U7snRNA-Jr53. Nous avons appelé « exon étendu » chaque région génomique centrée sur un exon et incluant 100 pb des régions introniques adjacentes. Il a en effet été décrit que les éléments régulateurs d'épissage introniques (ISS, ISE) à proximité d'un exon pouvaient avoir un effet sur son épissage (Zhang 2005).

Contrairement à notre première stratégie de recherche *in silico* de cibles off-targets de notre produit U7snRNA-Jr53 (paragraphe A-), les prédictions *in silico* des cibles du U7-Jr53 ont cette fois été réalisées sur l'ensemble du génome humain (Gencode). Dans un premier temps, l'ensemble des « exons étendus » du génome humain a été extrait (comprenant les exons des transcrits codants et non codants) puis analysés avec deux outils d'alignement : miRanda et Blast.

Pour la recherche avec miRanda, aucune valeur seuil d'identité, de similarité, de couverture et d'énergie n'ont été fixées en amont de la recherche de cibles. Il a été montré dans la littérature que des hybridations ARN:ARN pouvaient se produire malgré la présence de mismatches entre les deux séquences (*Introduction, Chapitre 4*), pour autant la position et le nombre de mismatches tolérés pour maintenir la liaison ARN:ARN ne sont pas bien établis. Etant donné le peu de candidats off-targets mis en évidence (peu de jonctions d'exons altérées), il ne nous semblait pas utile de fixer des valeurs seuils arbitraires. Nous souhaitons au contraire poursuivre une analyse la plus exhaustive possible.

L'algorithme utilisé par Blast, différent de celui de miRanda, prend notamment en compte la notion de contiguïté des bases identiques entre les deux séquences ARN. Il a effectivement été montré dans la littérature que des hybridations ARN:ARN pouvaient se produire avec une homologie de séquence sur seulement 8 pb (contiguës) et que cela suffisait à provoquer un effet (off- ou on-target) sur le transcrit en question (Flanagan 1996, Singh 2009, Obad 2011, Keil 2014). Aucune valeur seuil d'identité n'a été fixée en amont de la recherche de cibles par Blast.

A la suite de cette recherche *in silico* de cibles du U7-Jr53, deux listes ont été établies contenant l'ensemble des régions exoniques possédant un motif cible pour la séquence antisens du U7snRNA-Jr53 prédites par miRanda et Blast. Après croisement de ces données *in silico* avec les données de jonctions différentiellement utilisées, un très petit nombre de cibles off-targets potentielles du U7-Jr53 ont été mises en évidence (figure 67).

Pour nos échantillons de myotubes primaires humains, nous avons ainsi pu montrer que 4 jonctions différentiellement utilisées chevauchent un motif U7-Jr53 (6 jonctions identifiées en tout mais 2 sont communes aux prédictions Blast et miRanda). Parmi elles, nous retrouvons évidemment la jonction 52-54 du gène *DMD*, mais également 2 jonctions sur le gène de la titine (*TTN*) et une jonction sur un gène nommé *NUP188*. A priori, seuls ces 2 gènes (*TTN* et *NUP188*) pourraient donc présenter des effets off-target spécifiques du U7snRNA-Jr53. Les précisions concernant ces jonctions d'exons off-target dans les myotubes sont données dans le tableau S2 en annexe.

Pour nos échantillons d'hépatocytes primaires humains, nous avons pu montrer que 4 jonctions différentiellement utilisées chevauchent un motif U7-Jr53 (aucune n'étant commune entre les prédictions Blast et miRanda). Parmi ces jonctions, nous ne retrouvons pas la jonction 52-54 du gène *DMD*, qui n'est pas détectée comme significativement altérée par DEXseq dans les hépatocytes. Les jonctions off-targets sont retrouvées sur 4 autres gènes (*ZHX2*, *LRP5*, *DDB1* et *CTSZ*). Des précisions concernant ces jonctions sont données dans le tableau S3 en annexe.

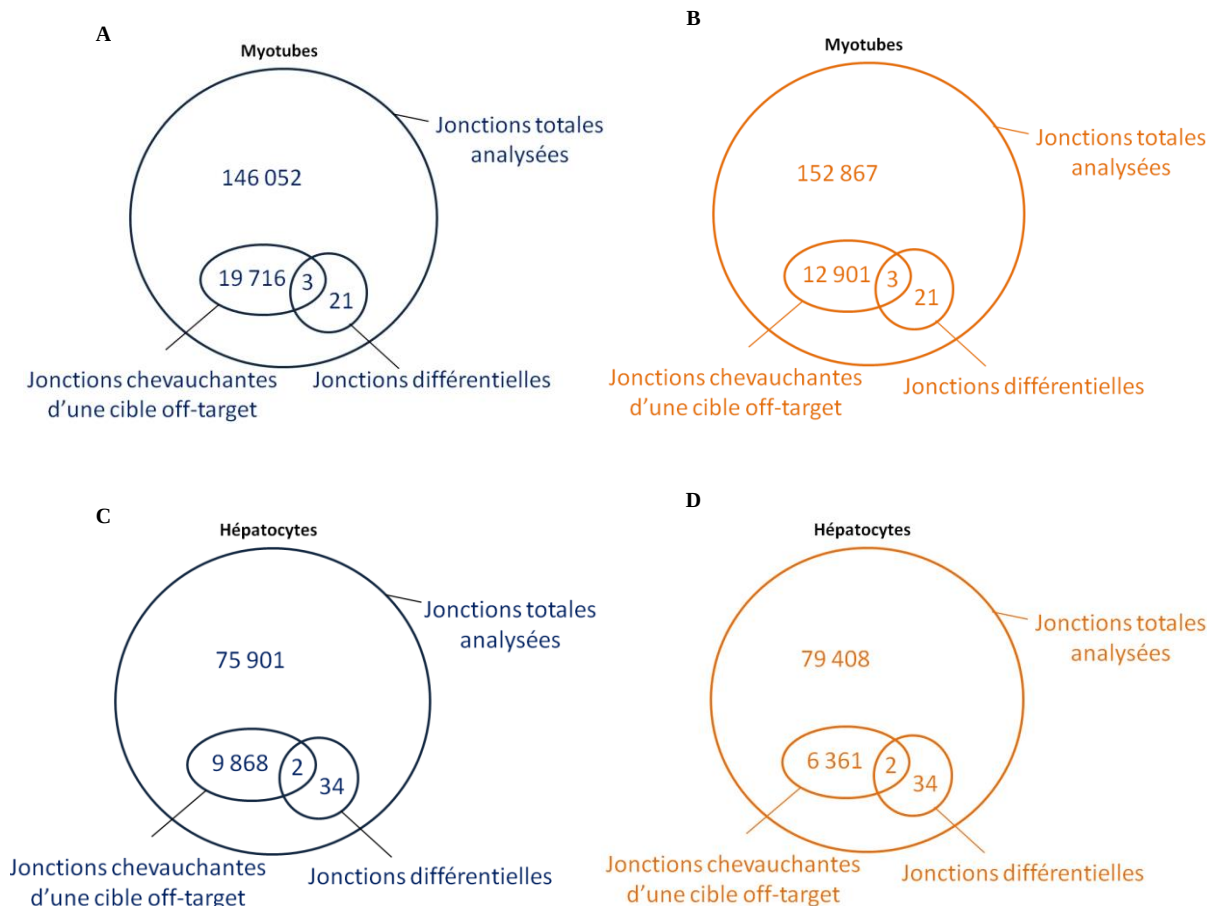


Figure 67 : Diagrammes de Venn représentant le nombre de jonctions différentielles identifiées entre nos échantillons de myotubes ou d'hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec l'AAVr-U7-Jr53, et chevauchant un motif de fixation putatif de la séquence antisens du U7-Jr53. Les résultats de prédictions *in silico* de ces cibles off-target identifiées par miRanda (en bleu) et Blast (en orange) ont été croisés avec les résultats de DEXseq identifiant les jonctions différentiellement utilisées pour les myotubes (A et B) et les hépatocytes (C et D).

Comme évoqué précédemment, l'étape suivante sera de confirmer l'altération d'épissage de ces gènes off-targets possédant une jonction différentiellement utilisée et un motif de fixation du U7-Jr53 par des analyses moléculaires. Le choix des candidats à valider et la méthodologie analytique seront détaillés dans le paragraphe 4).

3) Analyse des effets du U7snRNA-Jr53 sur l'expression des gènes humains

a- Approche analytique via le logiciel DESeq2

Les variations d'expression au niveau des gènes humains, suite à la transduction de nos différents types cellulaires avec le vecteur AAVr-U7-Jr53, a été déterminée en comptant pour chaque gène l'ensemble des reads s'alignant sur les exons ou les jonctions d'exons de ceux-ci.

Cette étape de comptage a été réalisée en s'appuyant sur le fichier d'annotations du génome humain (fichier GFF, General Feature Format) permettant de déterminer le nombre total de reads assignés à chaque gène. Pour chaque échantillon, chaque gène s'est vu attribuer un nombre de reads. Puis, sur la base de ce comptage, le logiciel DESeq2 (Love 2014) a été utilisé pour réaliser une analyse du différentiel d'expression entre les échantillons non transduits et les échantillons transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53.

b- Validation de l'expression du U7snRNA-Jr53 en RNAseq

Dans le cadre de l'analyse de l'épissage différentiel, nous avons mis en évidence l'apparition de la jonction des exons 52-54 du gène *DMD* par RNAseq. L'analyse par DESeq2 n'a pas permis d'identifier de variation du niveau d'expression du gène *DMD* dans les échantillons transduits. En effet, les FC donnés par DESeq2 pour le gène *DMD* sont respectivement de -1,1 et de 1,04 dans les myotubes et les hépatocytes ; la p-value ajustée (padj) étant supérieure à 0,05. Ainsi, si la transduction par l'AAVr-U7-Jr53 entraîne bien un saut de l'exon 53, ce saut d'exon n'entraîne pas de variation notable du niveau d'expression du gène *DMD*. La modification d'expression du gène *DMD* ne peut donc pas être utilisée comme contrôle positif de l'analyse d'expression différentielle.

Nous avons donc voulu nous assurer que notre outil thérapeutique, U7snRNA-Jr53 était bien présent dans les échantillons transduits par le vecteur AAVr-U7-Jr53. Nous avons déjà mis en évidence son expression dans nos échantillons expérimentaux, via une analyse RT-QPCR, mais nous avons voulu vérifier qu'il était aussi détectable par RNAseq.

Nous avons donc recherché parmi l'ensemble des reads non alignés sur le génome humain ceux qui pouvaient s'aligner sur la séquence du U7snRNA-Jr53. Les résultats résumés dans le tableau 9 indiquent que le U7-Jr53 est détecté uniquement dans les échantillons transduits et ce, pour les deux types cellulaires (MT et HEP). Les pourcentages de reads correctement alignés sur l'ensemble du génome humain étant homogènes entre les échantillons, il est possible de comparer le nombre de reads alignés sur U7-Jr53 entre les échantillons (tableau 9).

Résultats - Partie 2

Tableau 9 : Nombre de reads bruts alignés sur la séquence ARN du U7snRNA-Jr53 en fonction du nombre de reads total alignés sur le génome humain de façon unique.

samples	U7-Jr53 mapped reads number	Uniquely mapped reads number	Uniquely mapped reads %
MT_NT_1	3	68279964	88.45%
MT_NT_2	2	70292542	93.81%
MT_NT_3	0	69890600	91.54%
MT_U7_1	192	70904842	91.13%
MT_U7_2	152	70165223	93.54%
MT_U7_3	126	79012958	93.59%
Hep_NT_1	0	53843790	90.46%
Hep_NT_2	0	67687077	91.81%
Hep_NT_3	1	82104643	88.41%
Hep_U7_1	59	67039545	86.82%
Hep_U7_2	14	66281471	87.10%
Hep_U7_3	47	71631495	91.70%

Les reads alignés sur le U7snRNA-Jr53 sont moins nombreux dans les hépatocytes que dans les myotubes transduits ce qui corrèle très bien avec la quantification relative (RQ) de l'expression du U7snRNA-Jr53 détecté en RT-QPCR (revoir la figure 62 et figure 68) et avec les pourcentages de saut de l'exon 53 sur le transcrit *DMD* humain calculés précédemment par RNAseq (revoir la figure 64).

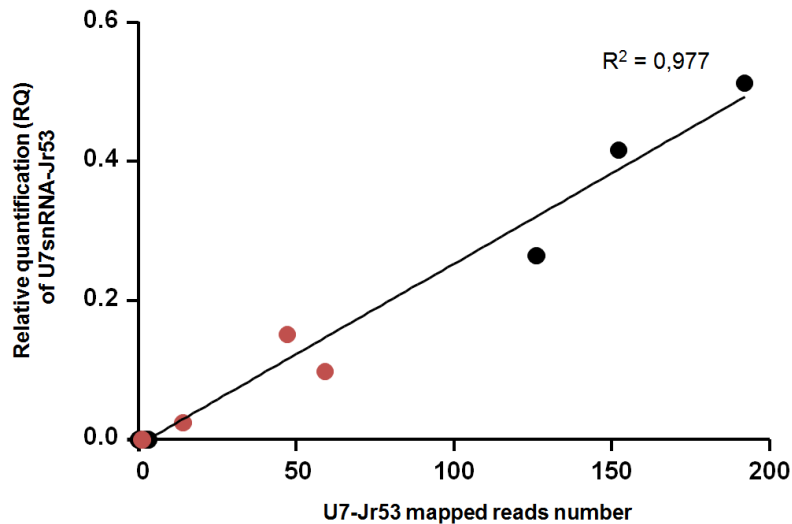


Figure 68 : Corrélation entre l'expression du U7snRNA-Jr53 détectée par RT-QPCR et le nombre de reads alignés sur la séquence du U7snRNA-Jr53. L'axe des ordonnées représente les valeurs de RQ obtenues par RT-QPCR pour les échantillons de myotubes MT_1, MT_2 et MT3 (points noirs) et d'hépatocytes HEP_1, HEP_2 et HEP_3 (points rouges) transduits ou non avec un vecteur AAVr-3-U7-Jr53 (figure 62). L'axe des abscisses représente le nombre de reads bruts obtenus après RNAseq et alignés sur la séquence du U7snRNA-Jr53 pour les mêmes échantillons (tableau 9).

c- Analyse des gènes différentiellement exprimés dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53

Dans nos différents échantillons de myotubes et d'hépatocytes, DESeq2 nous a permis d'identifier un ensemble de gènes différentiellement exprimés suite à la transduction avec le vecteur AAVr-U7-Jr53. Chaque gène a été quantifié et présente une seule valeur de FC par gène (même s'il existe plusieurs isoformes de ce gène) qui représente la différence d'expression entre les échantillons transduits et non transduits. Une valeur positive de FC représente une augmentation de l'expression du gène dans les échantillons transduits alors qu'un FC négatif représente une diminution de l'expression du gène dans les échantillons transduits par rapport aux échantillons non transduits. L'ensemble des gènes statistiquement et différentiellement exprimés entre les 2 conditions expérimentales ($p_{adj} \leq 0,05$) identifiés par DESeq2 dans les myotubes et les hépatocytes sont représentés sur les figures 69 et 70, respectivement.

Que ce soit dans les myotubes ou dans les hépatocytes primaires humains, de nombreux gènes montrent des fluctuations d'expression entre les échantillons transduits et non transduits. Même si la plupart de ces gènes ont un niveau d'expression moyen élevé (entre 1 et 10 000), les variations d'expression entre les 2 conditions expérimentales sont par contre très modérées. Parmi ceux dont l'expression varie de manière significative ($p_{adj} < 0,05$), une vingtaine seulement ont une valeur absolue de $\log_2(FC)$ supérieure à 1, ce qui ne représente qu'une variation d'expression d'un facteur 2 (en plus ou en moins), entre les échantillons transduits et non transduits.

Afin de vérifier si les lincRNA étaient affectés par une transduction par l'AAVr-U7-Jr53, la même analyse DESeq2 a été réalisée en incluant les lincRNA (long intergenic non-coding RNA) dans l'annotation. Ces lincRNA sont généralement très faiblement exprimés dans les cellules (une moyenne de 0,5 reads/gene contre 393 reads/gene pour les gènes codants), toutefois, des variations de leur expression pourraient avoir un impact sur l'expression de nombreux autres ARNm ou protéines. Seulement 3 lincRNA dans les myotubes et 1 lincRNA dans les hépatocytes ont été identifiés comme statistiquement différentiellement exprimés entre les échantillons transduits et non transduits (figures 69 et 70).

Ni la présence du U7snRNA-Jr53, ni celle de l'AAVr ne semble en effet perturber l'expression des gènes de façon massive dans nos échantillons transduits. Lorsque l'on réalise une analyse à composante principale (PCA) des données, nous observons de façon surprenante que les échantillons ne sont pas regroupés en fonction de la condition « transduits », « non transduits », mais plutôt en fonction du patient dont sont issues les cellules (figure 71). Ce résultat confirme le faible impact de la transduction par l'AAVr-U7-Jr53 sur l'expression globale des gènes dans ces cellules.

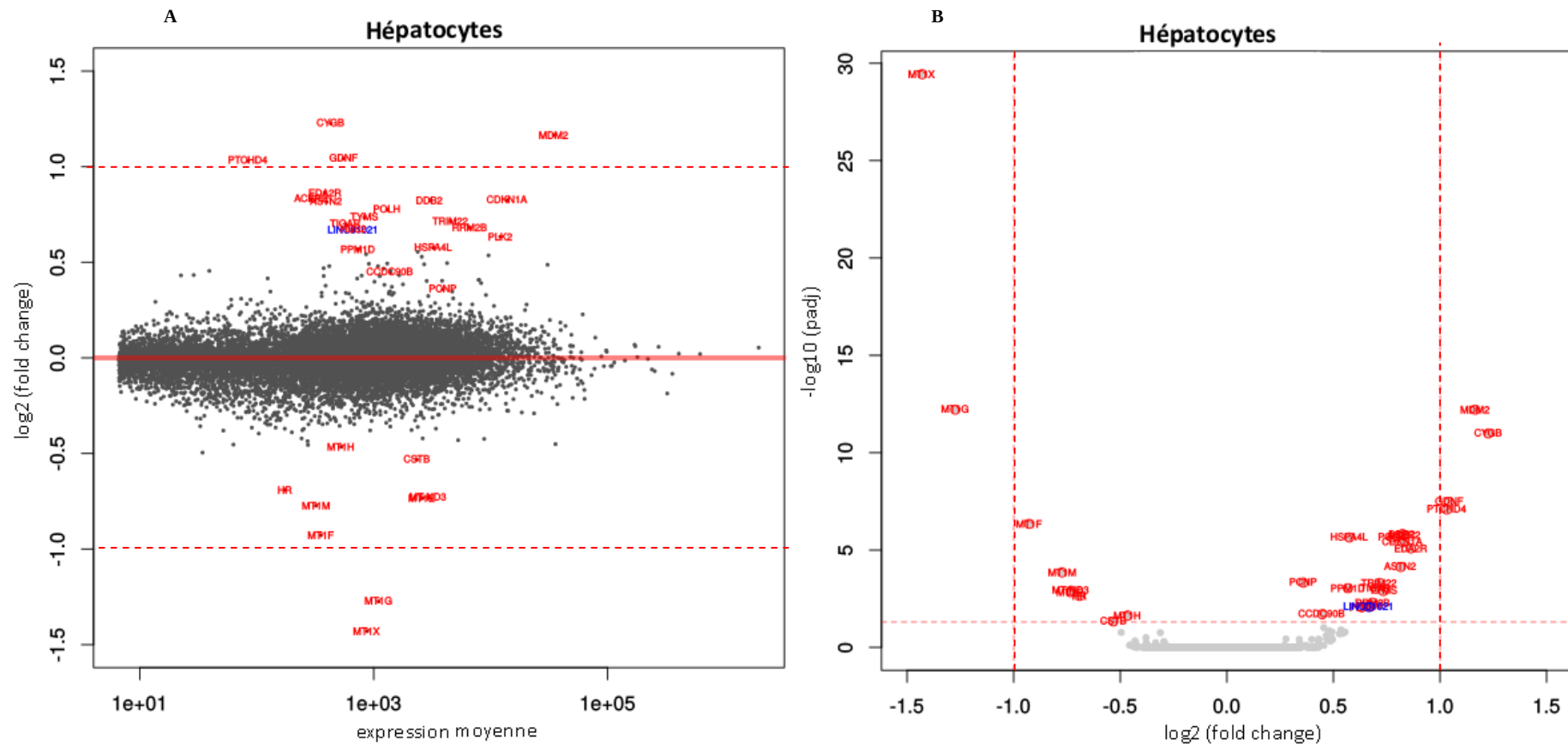


Figure 70 : Représentation des différences d'expression des gènes analysés par DESeq2 entre les hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53. A : Le MAplot représente le $\log_2$ du fold change ($\log_2(\text{FC})$) de chaque gène (entre les échantillons transduits et non transduits) en fonction de l'expression moyenne du gène (tous isoformes confondus). B : Le volcano plot représente le $\log_{10}$ de la pvalue ajustée (padj) en fonction du $\log_2(\text{FC})$ de chaque gène (entre les échantillons transduits et non transduits). Sur les deux graphiques, chaque point correspond à un gène et les noms précisés en rouge représentent les gènes codants et ceux en bleu représentent les lincRNA pour lesquels la padj est $\leq 0,05$. Les lignes pointillées représentent les seuils au-delà desquels le fold change (FC) est supérieur à 2 ou -2 (ce qui correspond à $\log_2(\text{FC}) = 1$ ou -1) entre les échantillons transduits et non transduits.

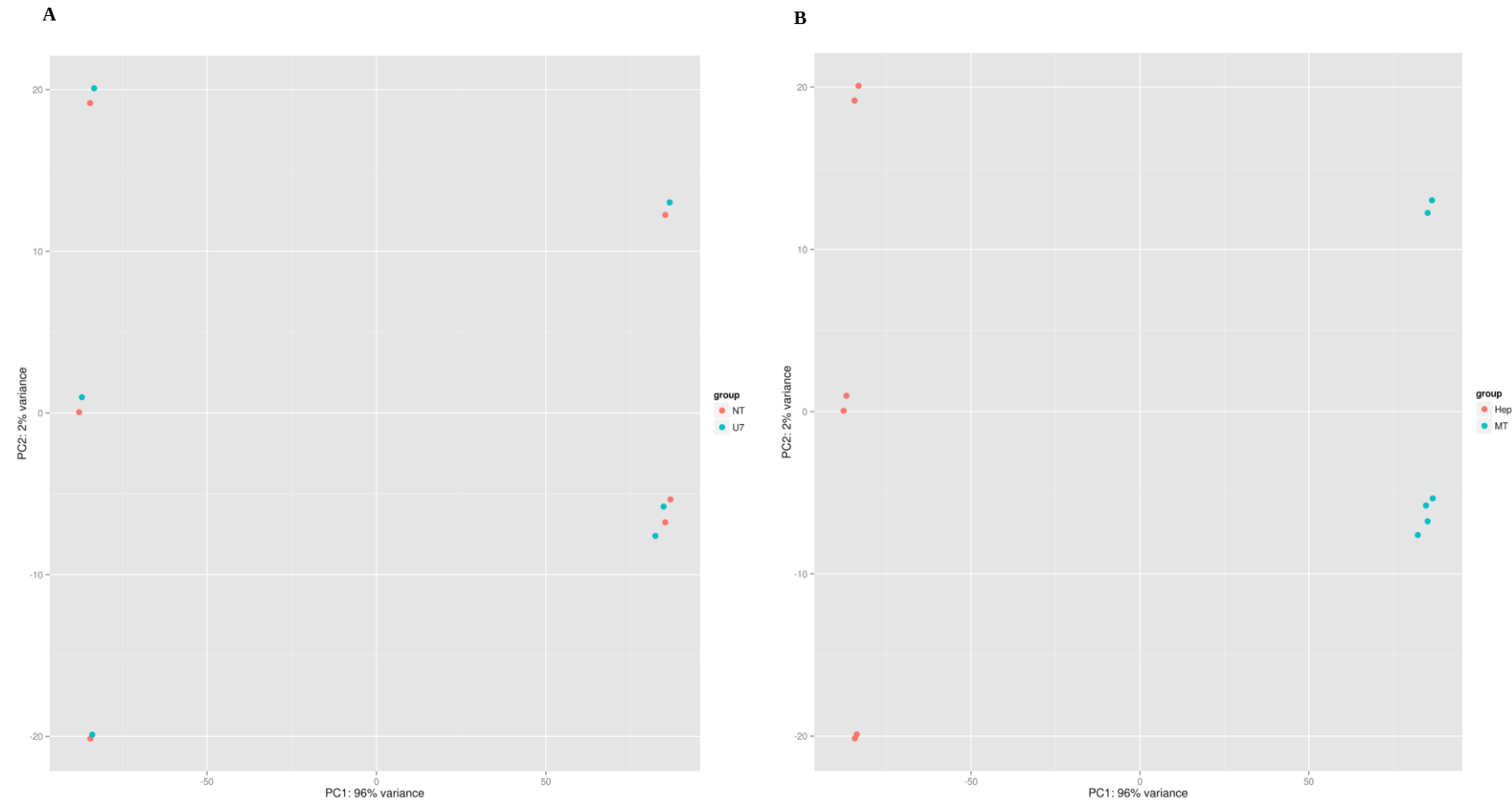


Figure 71: Représentations graphiques obtenues après analyses à composantes principales (PCA) des données d'expression globale obtenues à partir d'échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains non transduits et transduits avec l'AAVr-U7-Jr53. A : PCA permettant de discriminer les échantillons d'hépatocytes et de myotubes non transduits (en rouge) et transduits (en bleu). B : PCA permettant de discriminer les échantillons d'hépatocytes (HEP, en rouge) et de myotubes (MT, en bleu).

Même si globalement les variations d'expression des gènes sont très modérées dans nos deux systèmes cellulaires, certains gènes montrent une expression différentielle entre les échantillons, qui pourrait résulter d'un effet off-target spécifique du U7snRNA-Jr53. L'ensemble de ces gènes (codants et lincRNA) avec une $p_{adj} < 0,05$ sont regroupés dans les tableaux S4 et S5 (en annexe) pour les myotubes et les hépatocytes, respectivement.

d- Analyse ciblée des gènes différentiellement exprimés dans les myotubes et les hépatocytes transduits avec l'AAVr-U7-Jr53 : identification des candidats off-targets possédant un motif de fixation du U7snRNA-Jr53

Comme nous l'avons fait pour les jonctions d'exons différentiellement épissées, nous avons recherché les transcrits qui possèdent un motif de fixation de la séquence antisens du U7snRNA-Jr53. En effet, parmi les gènes différentiellement exprimés entre les échantillons transduits et non transduits (identifiés par DESeq2), certains sont potentiellement des cibles off-targets du U7snRNA-Jr53, alors que d'autres pourraient être uniquement dérégulés par la présence du vecteur AAVr dans les cellules. Les gènes ayant un motif U7snRNA-Jr53 étant probablement des off-targets spécifiques, nous avons voulu concentrer nos analyses sur ces candidats.

Dans le contexte de cette analyse, nous imaginons que le U7snRNA-Jr53 pourrait avoir des effets « siRNA like » sur les transcrits sur lesquels il serait capable de se fixer. Nous avons donc recherché dans l'ensemble des ARNm matures humains la présence de sites potentiels de fixation pour la séquence antisens du U7-Jr53. Cette recherche n'a pas été restreinte aux exons étendus mais a été réalisée sur l'ensemble des transcrits annotés du génome (séquences des ARN épissés) grâce à miRanda. Comme précédemment, nous avons généré une liste de l'ensemble des transcrits codants et non codants possédant un motif cible pour la fixation de la séquence antisens du U7-Jr53.

Après croisement de ces données *in silico* avec les données de DESeq2, plusieurs candidats off-targets potentiels du U7snRNA-Jr53 ont été mis en évidence. Ces gènes possédant un motif de fixation et différentiellement exprimés après transduction avec le vecteur AAVr-U7-Jr53 sont respectivement annotés dans les tableaux S4 et S5 (en annexe) pour les myotubes et les hépatocytes.

Nous souhaitons ensuite confirmer les modifications d'expression observées pour ces gènes off-targets possédant un motif de fixation du U7snRNA-Jr53 par des analyses moléculaires (RT-QPCR). La méthodologie analytique est détaillée dans le paragraphe 4).

4) Approche méthodologique pour les validations expérimentales des candidats off-targets, cibles du U7snRNA-Jr53

Comme déjà évoqué, nous souhaitons approfondir l'interprétation des résultats obtenus en RNAseq en confirmant les potentiels effets off-targets du U7snRNA-Jr53 identifiés, à l'aide d'analyses moléculaires classiques par RT-PCR et/ou RT-QPCR. Nous envisageons deux types de validations :

Tout d'abord, nous souhaitons réaliser une validation globale des niveaux d'expression des gènes détectés en RNAseq par RT-QPCR. Nous utiliserons des plaques « RT-QPCR à façon » (Qiagen) permettant la quantification de l'expression d'un grand nombre de gènes ayant des niveaux d'expression variables. Nous serons alors en mesure d'établir une corrélation entre les niveaux d'expression des gènes quantifiés par la technique RNAseq et la technique RT-QPCR (analyses réalisées sur les mêmes échantillons biologiques).

Ensuite, des validations expérimentales seront réalisées sur quelques gènes candidats spécifiquement choisis, et en particulier ceux qui possèdent un motif de fixation potentiel pour le U7snRNA-Jr53 afin de confirmer les effets off-targets identifiés en RNA-seq (modification d'épissage ou expression différentielle). L'objectif de ces validations est également de pouvoir s'assurer que les modifications d'épissage ou d'expression globale identifiées en RNAseq sont spécifiquement dues à l'action du U7-Jr53.

En effet, dans le cadre de ces validations, nous avons inclus un contrôle correspondant à des cellules (myotubes et hépatocytes primaires humains) transduites avec un vecteur AAVr-U7-Scramble, portant une séquence antisens aléatoire, ce qui nous permettra de discriminer les effets off-targets liés à l'expression du U7-Jr53 et celles liées à la transduction par l'AAVr. Nos validations moléculaires seront donc réalisées en parallèle sur les 12 échantillons expérimentaux préalablement utilisés pour les analyses RNAseq, et sur d'autres échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains récemment générés et transduits soit avec l'AAVr-U7-Jr53 soit avec un AAVr-U7-Scramble, et ce dans les mêmes conditions que pour

nos précédents échantillons (MOI 1^e5, même temps post-transduction, voir *Matériel et méthodes*).

La séquence U7snRNA-Scramble a déjà été utilisée en tant que contrôle négatif lors des tests d'optimisation de la séquence antisens du produit U7snRNA clinique (*Résultats partie 1, C-*), lors desquels le U7snRNA-Jr53 avait montré sa supériorité pour le saut de l'exon 53 du messenger *DMD*. La séquence antisens du U7snRNA-Scramble ne cible aucune région du transcrit *DMD*, elle est par conséquent inefficace pour le saut de l'exon 53 (figure 45).

Même si cette séquence aléatoire n'a pas été conçue pour une cible particulière, il est possible, comme nous l'avons longuement évoqué dans ce manuscrit, qu'elle puisse s'hybrider à d'autres transcrits humains, au moins de façon incomplète. Pour autant sa signature off-target séquence-spécifique devrait être différente de celle de la séquence antisens thérapeutique du U7snRNA-Jr53.

Ainsi, parmi les candidats off-targets identifiés par RNAseq, seuls ceux dont les effets off-targets seront confirmés dans les échantillons transduits avec l'AAVr-U7-Jr53 (et pas dans les échantillons transduits avec l'AAV-U7-Scramble) seront considérés comme spécifiques du U7snRNA-Jr53. Si les effets off-targets sont visibles à la fois avec le U7-Jr53 et le U7-Scramble, il est probable que ces effets soient des modifications transcriptomiques induites par la transduction avec l'AAVr.

Les nouveaux échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains ont été caractérisés comme précédemment décrit (*Résultats partie 1, D- 1) Développement des modèles cellulaires humains*) par des RT-PCR spécifiques de gènes s'exprimant dans le muscle ou le foie, et par des marquages de la myosine au niveau des myotubes différenciés. Nous avons également quantifié l'expression des U7snRNA-Jr53 et U7snRNA-Scramble via des RT-QPCR spécifiques (non montré), puis nous avons vérifié *i)* que le U7snRNA-Jr53 permettait de sauter l'exon 53 de sa cible *DMD* et *ii)* que le U7snRNA-Scramble n'induisait pas de saut de l'exon 53 du messenger *DMD* (non montré).

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, les mises au point des RT-PCR et des RT-QPCR pour les validations expérimentales sont en cours.

C- Conclusion générale

Dans le cadre du développement clinique de notre produit thérapeutique AAVr-U7-J53 pour le traitement de la DMD, nous avons évalué et caractérisé les potentiels effets indésirables de ce produit. Si les effets indésirables de la capside AAV ont été évalués lors des études de toxicologie réalisées chez des rats et des primates non-humains, évoquées en partie 1 des résultats, les effets indésirables spécifiques du transgène et précisément de la séquence antisens véhiculées par le transgène U7snRNA-Jr53 ont été analysés dans cette 2^{nde} partie de notre étude.

Conçue pour être spécifique de l'exon 53 du gène *DMD* humain, la séquence antisens portée par le U7snRNA-Jr53 pourrait tout de même s'hybrider à d'autres transcrits du génome humain par complémentarité imparfaite. Nous avons donc recherché les off-targets séquence-spécifiques dus à des appariements imparfaits entre la séquence antisens du U7snRNA-Jr53 et une cible ARNm. Nos résultats, présentés dans la partie 1, montrant l'expression ectopique du U7snRNA-Jr53 dans des modèles d'hépatocytes, nous ont poussé à réaliser cette analyse à la fois dans le contexte musculaire et le contexte hépatique.

La première stratégie développée pour la recherche de cibles off-targets a été une simple recherche *in silico* des transcrits ayant un motif de fixation pour la séquence antisens du U7snRNA-Jr53, à partir d'une base de données refseq. Pour cette première analyse *in silico*, nous avons utilisé le logiciel miRanda et avons fixé des valeurs seuils de pourcentage d'identité, de similarité, de couverture et d'énergie de liaison entre les cibles potentielles et la séquence U7snRNA-Jr53. Sur les 39 gènes candidats potentiels (192 transcrits), nous en avons sélectionné 6 pour des validations expérimentales.

Malgré les forts pourcentages d'identité de ces candidats off-targets théoriques avec la séquence antisens du U7snRNA-Jr53, aucun n'a montré d'effet off-target dans des échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains transduits avec un AAVr-U7-Jr53, par rapports aux mêmes échantillons non transduits.

La seconde stratégie, beaucoup plus exhaustive, a consisté en une analyse des effets off-targets de notre produit thérapeutique par RNAseq. Nous avons séquencé l'ensemble des transcrits extraits d'échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains transduits avec un AAVr-U7-Jr53 et leurs contrôles non transduits. Puis, nous avons évalué d'une part les variations d'épissage de ces transcrits, et d'autre part leur variation d'expression entre les échantillons transduits et non transduits.

Concernant l'analyse des modifications d'épissage, nous avons utilisé le logiciel DEXseq qui a mis en évidence un très faible nombre de jonctions d'exons différentiellement utilisées que ce soit dans les myotubes ou dans les hépatocytes. Seul l'épissage du gène *DMD* (au niveau de la jonction des exons 52-54) ressort comme très significativement modifié dans les myotubes. Si la séquence antisens du U7snRNA-Jr53 induit spécifiquement des modifications d'épissage de transcrits off-targets, **les effets restent donc à priori très modérés.**

En recoupant ces données de variations d'épissage avec des prédictions *in silico* (miRanda et Blast) de tous les exons étendus du génome possédant un site de fixation pour le U7-Jr53, nous avons montré que seuls 2 gènes (TTN et NUP188) pourraient être des cibles off-target directes du U7snRNA-Jr53 dans les myotubes et 4 gènes (ZHX2, LRP5, DDB1 et CTSZ) dans les hépatocytes. Ces gènes, ainsi que d'autres présentant un différentiel d'épissage significatif entre les échantillons transduits et non transduits sont actuellement en cours de validation expérimentale.

Concernant l'analyse de l'expression globale des gènes, nous avons utilisé le logiciel DESeq2 qui a mis en évidence **des dynamiques de variations d'expression plutôt faibles**, principalement dans les hépatocytes. En effet, les valeurs de FC obtenues pour les gènes (pourtant significativement différentiellement exprimés) sont toutes situées autour d'un facteur 2 entre les échantillons transduits et non transduits.

Parmi la vingtaine de gènes différentiellement exprimés, nous avons identifié ceux étant les plus probablement des cibles spécifiques du U7snRNA-Jr53, c'est-à-dire les gènes ayant un motif de fixation de la séquence antisens du U7snRNA-Jr53. Pour cela, des prédictions *in silico* avec miRanda ont été réalisées sur l'ensemble des transcrits du génome humain. La plupart de ces gènes candidats off-target sont actuellement en cours de validation expérimentale.

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, ces dernières validations restent donc à réaliser. Pourtant, nous avons déjà montré que les effets off-targets du U7snRNA-Jr53 sont très restreints et cela dans nos deux modèles cellulaires humains. Les validations par RT-PCR et RT-QPCR sur des échantillons transduits avec un AAVr-U7-Jr53 et un AAVr-U7-Scramble nous permettront de confirmer, s'il y en a, la nature des cibles off-targets spécifiques du U7snRNA-Jr53. Une analyse de la fonction des candidats off-targets identifiés et également de la signification biologique des effets off-targets sur ces gènes devra être

menée afin d'anticiper l'impact de tels effets off-targets sur la biosécurité du produit thérapeutique, dans le cadre de l'essai clinique planifié en 2016 chez des patients DMD.

DISCUSSION

Le développement d'un nouveau médicament est un processus long et coûteux, pouvant prendre une quinzaine d'années entre la découverte de la molécule ou du produit actif, jusqu'à la mise à disposition auprès des patients. Les différentes étapes d'un tel développement clinique permettent une évaluation de l'efficacité et de la toxicité du produit, dès les phases précliniques du développement, jusqu'aux dernières étapes chez l'Homme dans les phases cliniques. Le développement d'un produit thérapeutique de thérapie génique suit étroitement ce même processus.

Les toutes premières étapes précliniques du développement consistent en l'identification et la sélection d'un produit, d'une molécule active. Généralement les premières marques d'efficacité sont obtenues *in vitro*, puis chez le petit animal avant d'être confirmées à plus grande échelle chez un modèle animal plus gros, lorsque cela est possible.

La deuxième partie des études précliniques consistent en des études de toxicologie, réglementaires et réalisées selon les bonnes pratiques de laboratoire (BPL), sur des modèles animaux (généralement rongeurs ou primates) visant à évaluer l'ensemble des effets secondaires toxiques potentiels après administration de fortes doses du produit thérapeutique.

Après autorisation par les autorités de santé, un essai clinique peut alors être développé avec le but final de l'obtention d'une autorisation de mise sur le marché (AMM). Cette phase consiste à évaluer l'efficacité et la tolérance du produit clinique dans des populations de personnes, volontaires, atteintes ou non de la maladie pour laquelle le produit thérapeutique a été développé. Un essai clinique se divise en plusieurs étapes successives.

La phase I consiste à étudier la tolérance et le devenir du médicament dans l'organisme (biodistribution, pharmacocinétique) chez un petit nombre de patients sains. La phase II permet de déterminer la dose thérapeutique efficace et non toxique du produit clinique, chez un petit nombre de personnes atteintes de la maladie d'intérêt.

Pour les essais cliniques de thérapie génique, la première phase consiste très souvent en une phase I/II visant à évaluer à la fois la toxicité et l'efficacité du produit chez le même petit groupe de patients. Une des raisons à cela est le fait que certains médicaments de thérapie génique pourraient créer des effets secondaires indésirables notables, du fait même de leur activité pharmacologique, s'ils étaient administrés à des patients sains. Une autre raison à ce regroupement des phases I et II est que dans le cas d'une maladie génétique rare (telle que la DMD), le nombre de patients atteints est très restreint.

Durant la phase III, le rapport bénéfice/risque du produit est évalué dans des conditions proches de la pratique courante chez un plus grand nombre de patients, avec notamment une évaluation sur une longue durée, et en comparant le plus souvent l'efficacité thérapeutique du traitement à celle d'un traitement de référence ou à un placebo. Enfin, si toutes les conditions sont réunies, le produit clinique pourra recevoir une AMM et être accessible aux patients concernés. Généralement, une dernière étape de l'essai clinique, la phase IV, est réalisée après l'AMM afin d'évaluer les effets thérapeutiques du nouveau produit sur le très long terme et parfois afin d'optimiser ses conditions d'utilisation.

L'ensemble de ce développement clinique est encadré par les agences réglementaires, dans notre cas, l'agence française ANSM (Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé ; <http://ansm.sante.fr/>) et l'agence européenne EMA (European medicines agency ; <http://www.ema.europa.eu/ema/>) qui garantissent le suivi médical et l'application des bonnes pratiques cliniques (BPC) afin d'assurer la fiabilité des résultats ainsi que la protection des participants aux essais thérapeutiques.

Ces étapes idéales du développement d'un produit clinique thérapeutique ont été suivies pour le produit AAVr-8-U7snRNA. Comme évoqué dans l'introduction (*Chapitre 3, C-, 3*)), les phases précliniques de notre produit thérapeutique se sont succédées depuis les premières preuves de principes *in vitro* sur des myoblastes de patients DMD immortalisés (De Angelis 2002). Les travaux d'Aurélié Goyenvallée ont par la suite démontré la force du U7snRNA vectorisé par un vecteur AAVr à restaurer l'expression de dystrophine dans les muscles de souris *mdx* (Goyenvallée 2004). Puis, nous avons démontré en collaboration avec d'autres laboratoires français, l'efficacité et l'innocuité de cette approche thérapeutique chez le chien *GRMD*, démontrant la possibilité de poursuivre le développement de ce produit thérapeutique AAVr-U7snRNA, jusqu'en phase clinique chez des patients DMD (Le Guiner 2014, en annexe). Des études de toxicologie ont ensuite été menées chez deux espèces, le rat et le primate non-humain, telles que décrites dans l'introduction (*Chapitre 5*). Et nous espérons obtenir très prochainement les autorisations de l'ANSM pour débiter l'essai clinique de phase I/II prévu chez des patients atteints de DMD.

Les résultats présentés dans ce manuscrit décrivent une partie des étapes de développement préclinique du produit AAVr-U7snRNA, depuis la preuve d'efficacité chez le chien *GRMD* jusqu'à la constitution du dossier de demande d'essai clinique. Nous avons particulièrement travaillé sur la mise en place d'analyses permettant d'évaluer les potentiels

effets toxiques spécifiques du transgène U7snRNA, en vue de la caractérisation du produit clinique. Nous avons ainsi détaillé les différentes étapes nécessaires à cette caractérisation ainsi que les différents obstacles et limitations rencontrés, notamment pour la mise en place de méthodologies d'analyses *in vitro* sur des modèles cellulaires humains.

A- Efficacité du produit thérapeutique AAVr-U7snRNA

Dans cette étude, des chiens *GRMD* ont été injectés par voie locorégionale (LR) dans un membre antérieur avec un AAV8-U7-E6-E8. Plusieurs doses ont été testées : 5^e12, 1^e13 et 5^e13 vg/kg, mais les bénéfices moléculaires et cliniques les plus importants n'ont été observés que chez les chiens injectés à la plus forte dose (5^e13 vg/kg). Nous avons en effet observé une restauration de l'expression de dystrophine dans tous les muscles du membre injecté de ces chiens à hauteur de 40 à 80% de fibres positives, en corrélation avec une restauration du cadre de lecture de l'ARNm *DMD* grâce au saut des exons 6 à 8 (Le Guiner 2014, en annexe). Des améliorations histologiques et fonctionnelles ont été corrélées à la restauration de dystrophine dans les muscles squelettiques des chiens, notamment un meilleur profil en RMN, une diminution de la fibrose, ainsi qu'une augmentation significative de la force musculaire dans le membre injecté. L'ensemble de ces résultats a démontré la grande efficacité thérapeutique de l'AAVr-8-U7snRNA chez le chien *GRMD* et a posé les bases pour le développement d'un essai clinique (Le Guiner 2014, en annexe).

Pourtant, même si l'efficacité thérapeutique se confirmait chez les patients DMD, ce que nous espérons, ce type de traitement par injection dans un ou deux membres antérieurs d'un vecteur AAVr-U7snRNA, ne permettrait que d'améliorer la qualité de vie des patients, sans pour autant les guérir définitivement. En effet, d'autres optimisations seraient nécessaires dans le futur pour *i)* augmenter la masse musculaire traitée en traitant le corps entier, y compris le muscle cardiaque, *ii)* s'assurer de l'efficacité à long-terme du produit thérapeutique pour que les améliorations fonctionnelles acquises puissent perdurer dans le temps et ralentir significativement la progression de la maladie, et également *iii)* caractériser et anticiper au mieux les risques d'effets secondaires afin de les réduire, voire de les éviter. Pour cela, il est possible d'agir à plusieurs niveaux.

Le mode d'administration du vecteur thérapeutique :

Lors de l'injection par voie LR, le membre d'intérêt est isolé de la circulation sanguine par un garrot, ce qui permet une transduction très importante des muscles de ce membre, mais limite la transduction des autres tissus de l'organisme et notamment la transduction du diaphragme et du muscle cardiaque. Chez les chiens injectés avec la plus forte dose de vecteur, nous avons détecté un saut d'exon dans le diaphragme et le cœur (figure 38 C), mais à des niveaux qui restent faibles, en corrélation avec le nombre de copie de vecteur (0.6 vg/dg en moyenne dans le diaphragme et 0.45 vg/dg en moyenne dans le cœur) et probablement sub-thérapeutiques.

Par rapport à l'injection IM, l'injection LR permet localement une meilleure transduction des muscles squelettiques, tout en étant moins immunogène (Vandenberghe 2006, Toromanoff 2008, Toromanoff 2010, Gernoux 2015 en préparation). Si l'injection LR de l'AAVr-8-U7snRNA chez les patients DMD est bien tolérée et qu'elle n'entraîne aucun effet secondaire, il est très probable que les agences réglementaires avalisent les injections intraveineuses systémiques (IV) qui permettront de cibler davantage de muscles squelettiques dans l'organisme, y compris le cœur, le diaphragme et les muscles intercostaux, d'un grand intérêt thérapeutique pour les patients DMD.

En parallèle, les vecteurs AAVr peuvent être spécifiquement injectés dans le cœur pour une meilleure transduction par des voies intra-coronarienne, intra-myocardique ou encore trans-endocardique (Bish 2012, Barbash 2013, Pacak 2011).

Le niveau d'expression de dystrophine restauré :

Quel que soit le mode d'injection choisi, le facteur important pour le traitement de la DMD à long terme, est le niveau de restauration de dystrophine. En effet, plusieurs études ont récemment montré la nécessité de corriger le message *DMD* à un niveau suffisant afin de restaurer la dystrophine et son DAPC mais également et surtout, de permettre la protection de la fibre musculaire sur le long terme. Après une administration d'un AAVr-U7snRNA, il a été montré, chez le chien *GRMD* (Vulin 2012) et la souris *mdx* (Le Hir 2013), une diminution de l'expression de dystrophine associée à une perte de l'expression du transgène U7snRNA au cours du temps. Cette perte d'efficacité s'expliquerait par la perte des copies épisomales d'AAVr au cours des cycles de nécrose/régénération des fibres musculaires, un processus typique des muscles dystrophiques.

L'hypothèse est qu'un seuil thérapeutique doit être atteint afin de restaurer suffisamment de protéine dystrophine pour protéger la fibre musculaire, améliorer son

contexte histologique général, et ainsi empêcher les cycles de dégradation/régénération (Le Hir 2013). Cette hypothèse est corroborée par le fait que le niveau d'expression d'un transgène non thérapeutique après une injection IM d'un AAVr chez la souris, est beaucoup plus faible dans un contexte DMD que dans un contexte sain (Bartoli 2006, Dupont 2015). De plus, chez la souris *mdx*, les copies d'AAVr portant un transgène non thérapeutique sont plus rapidement perdues que celles du transgène thérapeutique (Le Hir 2013).

Le même phénomène de perte du transgène non thérapeutique a également été observé chez des souris atteintes de dystrophie musculaire des ceintures de type 2D (Pacak 2008) suggérant, là aussi, la nécessité de corriger les fibres musculaires pour éviter la perte des copies d'AAVr.

Dans notre étude, chez les chiens injectés avec les doses de 1^{e13} et 5^{e13} vg/kg, aucune perte des copies de vecteur n'a été observée entre 1,5 mois (biopsies musculaires intermédiaires) et 3 mois (après sacrifice) post injection. Un autre groupe de chiens injectés à la dose de 5^{e13} vg/kg dans chaque membre antérieur (groupe 8 tableau 2) a été suivi jusqu'à 6 mois post injection. Les analyses au sacrifice de ces chiens ont révélé des niveaux de dystrophine et des vg/dg équivalents à ceux de chiens injectés selon le même protocole expérimental (5^{e13} vg/kg dans chaque membre antérieur) mais sacrifiés 3 mois post injection (non montré). Ainsi nous n'observons pas de perte massive des copies de vecteurs comme cela avait pu être observé entre les points 2 et 6 mois post-injection dans l'étude de Vulin et al. chez un chien injecté avec un AAVr-1-U7-E6/E8 (à la dose de $1,4^{e13}$ vg/kg) (Vulin 2012). Néanmoins, les résultats de cette étude restent à prendre avec précaution puisqu'ils n'ont été obtenus que chez un chien et à partir de biopsies musculaires itératives réalisées entre 2 et 56 mois après l'injection, dans les mêmes muscles. En effet, il est probable que les prélèvements invasifs et réguliers des biopsies musculaires dans les mêmes muscles entraînent par eux-mêmes un processus de régénération musculaire qui pourrait être à l'origine de la perte d'une partie des copies de vecteurs.

Concernant nos chiens injectés à la dose la plus faible (5^{e12} vg/dg), même si nous n'avons inclus que 2 chiens dans ce groupe expérimental, le nombre de copies paraît moins stable dans le temps entre 1,5 et 3 mois post-injection (non montré).

Nos résultats appuient donc l'hypothèse du seuil thérapeutique proposé par Le Hir et al. : un niveau de correction suffisant serait atteint chez nos chiens avec les plus fortes doses d'AAVr-8-U7snRNA, permettant le maintien des copies dans les fibres musculaires alors que la correction thérapeutique ne serait pas suffisante avec la plus faible dose (permettant une

restauration de seulement 15% de fibres positives pour la dystrophine dans le membre injecté), ce qui ne permettrait pas d'arrêter le processus dystrophique et engendrerait finalement la perte des copies d'AAVr.

Le sérotype d'AAVr utilisé :

Afin de franchir certains obstacles au traitement de la DMD et d'améliorer l'efficacité thérapeutique pour atteindre le seuil thérapeutique critique, il pourrait être intéressant d'utiliser un sérotype d'AAVr alternatif. Nous avons utilisé l'AAVr-8 qui permet une très bonne transduction des muscles squelettiques chez nos chiens, comme cela avait été précédemment décrit (Wang Z. 2005, Ohshima 2009). Pourtant la transduction par l'AAVr-8 n'est pas limitée aux muscles comme le montrent les copies de vecteur retrouvées en quantité non négligeable dans d'autres organes (figure 41), et spécialement dans le foie, pour qui l'AAVr-8 a également une bonne affinité (Wang L. 2005, Tenney 2014, figure 11). La séquestration d'une partie du vecteur dans ces tissus non musculaires diminue la dose effective dans les muscles squelettiques. Les doses d'AAVr nécessaires pour atteindre le seuil thérapeutique sont alors augmentées, entraînant davantage de risques de réponses immunitaires et nécessitant aussi une production du vecteur à très grande échelle.

D'autres études précliniques sur le traitement de DMD ont plutôt utilisé l'AAVr-1 (Goyenvalle 2004, Vulin 2012, le Hir 2013). L'AAVr-9 serait également un bon candidat puisqu'il semble capable de transduire les muscles squelettiques et est très efficace dans le cœur, au moins chez les rongeurs (Pacak 2006, Bish 2008). Il n'est pourtant pas exclu que ces autres sérotypes aient également des affinités pour des tissus non musculaires. Et l'efficacité de ces sérotypes alternatifs dans les tissus des autres espèces, y compris l'Homme, restent à démontrer.

Outre les sérotypes naturels, communément utilisés, d'autres nouveaux sérotypes chimères aux capsides modifiées pourraient être utilisés : changer le tropisme cellulaire des AAVr en favorisant leur affinité pour le muscle ou en les empêchant de transduire des tissus non ciblés pourrait permettre d'améliorer l'efficacité des traitements DMD.

Des peptides « tissu spécifique » ont déjà été testés pour favoriser l'entrée de l'AAVr dans des cellules très spécifiques (cellules de carcinome ovarien, cellules épithéliales du poumon, cellules CD34 (Nance 2015)). Pour favoriser l'entrée des AAVr dans la cellule musculaire, des peptides servant de ligands pour des récepteurs muscle-spécifiques peuvent être incorporés à la capside de l'AAVr (*muscle homing peptide*) (Yu 2009, Seow 2010, Nance 2015).

A l'inverse, il est possible de limiter l'affinité d'un sérotype d'AAVr pour les tissus non ciblés en altérant des motifs structuraux de la capside impliqués dans les interactions avec les récepteurs cellulaires. L'AAVr-2i8 a ainsi été créé en remplaçant les résidus responsables de l'interaction de l'AAVr-2 aux protéoglycanes héparane sulfate (responsables de la transduction du foie) par des résidus de l'AAVr-8. Ce nouveau sérotype montre effectivement une diminution nette de la transduction du foie, au profit des muscles squelettiques (Asokan 2010, Rotundo 2013). Comme évoqué en introduction (*Chapitre 2*), de nombreux sérotypes d'AAVr peuvent ainsi être générés afin d'exprimer les protéines de capside les plus adaptées à la transduction du muscle.

Grâce à nos études précliniques chez le chien *GRMD*, nous avons déterminé la dose thérapeutique du vecteur AAVr-8-U7-E6/E8 (5^e13 vg/kg). Pourtant, rien ne garantit que l'efficacité observée chez le chien *GRMD* soit retrouvée chez l'Homme avec le produit clinique humain. En effet, l'inconvénient de l'approche de saut d'exon est que le produit thérapeutique est spécifique de l'espèce dans laquelle il est testé et donc de la séquence antisens responsable du saut d'exon. Pour que cette stratégie soit applicable à l'Homme, il a fallu développer un autre produit U7snRNA, spécifique du messenger *DMD* humain, capable de provoquer le saut de l'exon 53 et dont l'efficacité réelle ne pourra être démontrée qu'après injection chez l'Homme.

Dans le développement de notre produit clinique, nous nous sommes heurtés à cette problématique avec le U7-Dtex53, sélectionné initialement comme produit clinique humain et injecté aux primates non-humains et aux rats de l'étude de toxicologie. Les différents tests *in vitro* réalisés avec le U7-Dtex53 n'ont jamais montré d'efficacité stupéfiante, mais nous pensions, à juste titre, que l'efficacité du U7-Dtex53 *in vitro* (ou dans les tissus sains des animaux de l'étude de toxicologie) ne reflétait pas forcément l'efficacité qu'il aurait *in vivo* chez les patients DMD. Pour autant, même si l'efficacité d'un outil de saut d'exon est difficile à anticiper à partir de tests *in vitro* sur des cellules immortalisées d'un unique patient, un test *in vitro* rigoureux, avec une méthodologie claire et des contrôles pertinents aurait dû être réalisé en amont pour choisir la meilleure séquence antisens pour obtenir un saut de l'exon 53 optimal. Ce test a été réalisé par la suite (figure 45). Les analyses de saut d'exon et de restauration de l'expression de la protéine dystrophine ont été réalisées *i)* en aveugle, *ii)* en parallèle par 2 laboratoires, *iii)* sur 2 souches de myoblastes issus de patients DMD, *iv)* avec des transductions d'AAVr à plusieurs MOI et surtout *v)* en comparant plusieurs constructions U7snRNA portant différentes séquences antisens ciblant l'exon 53 du messenger *DMD*

humain. Au terme de ces analyses rigoureuses, c'est une autre séquence, U7-Jr53, qui a montré la meilleure efficacité et qui a été choisie comme produit clinique final.

B- Evaluation de la potentielle toxicité du produit AAVr-U7snRNA

1) Potentiels effets toxiques dus à la capside du vecteur AAV recombinant

Les potentiels effets indésirables de l'injection LR et du produit thérapeutique AAVr-U7snRNA ont pu être explorés dès les études précliniques chez les chiens *GRMD*. Parmi les chiens injectés dans un ou deux membre(s) antérieur(s), aucun n'a montré de signes cliniques indésirables ni de problème lié au mode d'injection, y compris chez les chiens recevant une dose totale de 1^{e14} vg/kg (dose forte dans les deux membres antérieurs). Les analyses histologiques de leurs muscles n'ont montré aucune anomalie pouvant démontrer un effet toxique du traitement. Au contraire, le profil pathologique musculaire a été amélioré par le traitement. Du point de vue des réponses immunitaires, aucune réponse (humorale ou cellulaire) dirigée contre la dystrophine n'a été détectée chez les chiens injectés. Seule des réponses humorales (anticorps IgG et IgM et facteurs neutralisants) anti-capside de l'AAV8 ont été détectées (Le Guiner 2014, en annexe). Des réponses humorales anti-AAV, non délétères pour l'expression du transgène thérapeutique, sont en effet systématiquement observées après un transfert de gène médié par l'AAVr chez des individus séronégatifs, comme cela déjà a été montré de nombreuses fois chez le chien (Haurigot 2010), le primate non-humain (Nathwani 2007), et également chez l'Homme dans le cadre d'essais cliniques (Flotte 2011, Ferreira 2014).

Si nos études précliniques chez le chien *GRMD* ont permis l'évaluation des effets indésirables liés à la capside de l'AAVr-8 et ceux liés aux transgènes « canins » (U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 permettant le saut d'exon du messager *DMD canin*), les études de toxicologie réalisées chez le rat et le primate non-humain n'ont pu documenter que le profil toxicologique de la capside du vecteur AAVr-8. En effet, le saut d'exon est une réaction séquence spécifique : le transgène du produit humain U7snRNA-Dtex53 permet le saut de l'exon 53 du gène *DMD humain*. La seule espèce pertinente pour évaluer ses effets potentiellement négatifs aurait donc été l'Homme. De plus, le U7snRNA-Dtex53 n'étant finalement pas le transgène clinique final (remplacé par U7snRNA-Jr53), les analyses réalisées lors des études de toxicologie ne reflètent en aucun cas la toxicité du transgène qui sera finalement administré aux patients.

Ces études de toxicologie réglementaires nous ont tout de même apporté de précieux résultats concernant la toxicité du vecteur AAVr8, et, en l'occurrence, nous ont permis de montrer son innocuité malgré les doses très importantes administrées (jusqu'à 5×10^{14} vg/kg chez les primates non-humains injectés dans 2 membres !!). Aucune mortalité ni aucune toxicité sévère n'ont en effet été observées, ni chez les rats, ni chez les primates non-humains.

Seuls des micro-infiltrats de cellules mononuclées (monocytes, lymphocytes) ont été détectés dans les muscles injectés des primates dès 7 jours et jusqu'à 90 jours après l'injection. Ces infiltrats cellulaires n'ont été associés à aucun effet secondaire, confirmant ce qui avait été observé dans d'autres études de transfert de gènes médiés par l'AAVr (Flotte 2011, Mueller 2013, Ferreira 2014). Ces infiltrats sont également sans conséquence pour l'expression à long terme du transgène. Les réactions immunitaires ont aussi été monitorées : une réaction humorale contre la capside AAVr8 (anticorps IgG et IgM et facteurs neutralisants), attendue mais non délétère, a été confirmée chez tous les primates. Les échantillons nécessaires à l'évaluation de la réponse cellulaire anti-AAV8 ont été prélevés, mais l'analyse n'a pas été faite dans la mesure où aucun signe clinique ne suggérait une forte réaction immunitaire contre l'AAVr. De plus, il est communément admis que les réponses cellulaires anti-AAVr sont particulièrement difficiles à anticiper chez les modèles animaux, quels qu'ils soient (Basner-Tschakarjan et Mingozzi 2014, Li 2007, Wang L. 2007a, Niemeyer 2009), comme en témoignent les réactions immunitaires délétères (destruction des hépatocytes transduits) observées chez des patients atteints d'hémophilie B injectés avec un AAVr2-FIX (Manno 2006, Mingozzi 2007, Nathwani 2011, Nathwani 2014) alors que rien n'avait été mis en évidence dans les études précliniques.

2) Potentiels effets toxiques spécifiques du transgène U7snRNA - Expression du transgène

a- Expression du U7snRNA à distance chez les chiens vs les primates non-humains

Les résultats de biodistribution du vecteur AAVr-8 dans l'organisme des chiens *GRMD* ont révélés une transduction homogène des muscles du membre(s) antérieur(s) injecté(s) et une diffusion du vecteur au reste de l'organisme à la levée du garrot. En effet, le génome viral (vg/dg) est retrouvé dans des muscles à distance, y compris le cœur, le diaphragme et même jusque dans les muscles du membre antérieur controlatéral, particulièrement chez les chiens injectés aux doses les plus fortes (figure 37 et Le Guiner 2014 en annexe). Cette fuite du vecteur à distance, et particulièrement dans des organes drainants

tels que le foie, les reins, les ganglions lymphatiques et la rate, est bien connue et documentée à la suite d'injections d'AAVr-8, quel que soit le mode d'injection (Toromanoff 2008, Bish 2008, Chen 2013, Gernoux 2015).

Pour l'analyse de la biodistribution du transgène, autrement dit, l'évaluation de son profil d'expression, nous avons choisi d'analyser le foie, en plus des muscles squelettiques injectés et controlatéraux, car c'est un des tissus les plus fortement transduits. Le nombre de copies de vecteur (vg/dg) détecté dans cet organe chez les chiens *GRMD* était aussi élevé que celui retrouvé dans les muscles injectés (figure 37). L'analyse de l'expression des U7snRNA-E6 et U7snRNA-E8 par RT-QPCR a démontré leur expression dose-dépendante dans les muscles injectés et controlatéraux (figure 39 A), mais également l'absence d'expression des U7snRNA dans le foie des mêmes chiens (figure 39 B). Ces résultats ont par la suite été confirmés par Northern blot et RT-PCR sur le messager *DMD* (figures 40 et 41) montrant l'absence de saut d'exon dans les foies des chiens, mêmes aux plus fortes doses. Puisque les U7snRNA-E6 et -E8 étaient sous le contrôle d'un promoteur naturel U7snRNA, décrit comme ubiquitaire (comme tous les autres snRNA, Zieve Sauterer 1990), ces résultats nous ont beaucoup surpris, mais de façon positive ! En effet, la présence du vecteur et l'expression du transgène en grande quantité dans un organe non ciblé tel que le foie pourrait engendrer des cytotoxicités, des réactions immunitaires, inflammatoires ou pourquoi pas entraîner des dérèglements de voies métaboliques hépatiques en modifiant l'expression d'autres gènes (via des effets off-targets directs ou indirects). Le fait que l'expression ectopique du transgène soit limitée chez les chiens (en tout cas dans le foie), permettrait de réduire au moins une partie de ces effets indésirables.

Dans le cadre du développement clinique du produit AAVr-U7snRNA, les mêmes analyses de biodistribution du vecteur et du transgène ont été réalisées chez les primates non-humains de l'étude de toxicologie. Si les résultats de biodistribution du vecteur sont semblables à ceux obtenus chez les chiens (fuite du vecteur dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques), les résultats concernant l'expression du transgène U7snRNA-Dtex53 n'ont malheureusement pas confirmé ceux obtenus chez les chiens. Le U7snRNA-Dtex53, a été en effet retrouvé exprimé à un niveau non négligeable dans le foie de ces animaux (figure 42 et 43). A noter que le saut d'exon sur le messager *DMD* médié par le U7snRNA-Dtex53 dans le foie des primates non-humains (figure 44) était très bien visible en RT-PCR nichée malgré la très faible efficacité du U7-Dtex53 ! Loin d'être malgré tout la

construction la plus efficace, U7snRNA-Dtex53 a ensuite été remplacé par le U7snRNA-Jr53 (figure 45).

Ces résultats contradictoires entre les chiens et les primates non-humains nous ont poussés à développer une méthode d'analyse de l'expression du transgène U7snRNA chez l'Homme. De plus, comme évoqué précédemment, la spécificité de la réaction de saut d'exon vis-à-vis de la séquence et de l'espèce nécessitait de toute manière une analyse de l'expression du U7snRNA dans un contexte humain. Enfin, le transgène clinique ayant changé (U7-Dtex53 → U7-Jr53), une analyse de son expression avant l'injection aux patients DMD était nécessaire pour répondre sereinement aux potentielles questions de l'ANSM lors de l'évaluation du dossier de demande d'essai clinique. Une analyse de l'expression du U7snRNA-Jr53 dans un contexte humain a donc été réalisée à la fois dans un contexte musculaire, et dans un contexte hépatique.

b- Analyse de l'expression du U7snRNA in vitro, quelle pertinence ?

Choix des modèles cellulaires :

Bien qu'il soit plus pertinent, dans le cadre de l'essai clinique, de réaliser cette analyse sur des modèles humains, le fait de travailler *in vitro* peut entraîner un certain nombre de biais. Pour les minimiser, nous avons choisi de travailler avec des cellules primaires. Les lignées cellulaires, au contraire des cellules primaires, ne représentent pas d'hétérogénéité inter-cellules puisque des clones sont sélectionnés puis amplifiés. De plus, l'immortalisation des cellules peut entraîner des modifications de leur phénotype et de leur transcriptome (Mouly 1996). Par contre, les cellules primaires sont très sensibles aux conditions de culture, elles peuvent progressivement dévier, modifier leur morphologie, leurs caractéristiques, voire leur transcriptome. Les hépatocytes primaires sont particulièrement fragiles et ne doivent/peuvent pas être cultivés plus de quelques jours (Guillouzo 2007). Pour éviter une telle dérive ainsi que pour valider les stades de différenciation, nous avons développé des tests de caractérisation pour chacun des modèles cellulaires que nous avons utilisé (figures 47, 48 et 50)

Une des principales limites au fait de travailler *in vitro* est aussi qu'un seul type cellulaire par tissu est représenté alors que l'ensemble du tissu est potentiellement transduit par l'AAVr *in vivo*. Pour représenter le muscle, nous avons choisi les myotubes qui sont les éléments de base des fibres musculaires matures. Les cellules souches du muscle et notamment les cellules satellites ne sont pas représentées dans notre modèle *in vitro*. Nous

avons tout de même réalisé les analyses dans les myotubes et dans les myoblastes, pour évaluer l'expression du U7snRNA à un stade non différencié de la cellule musculaire.

Pour représenter le foie, nous avons choisi les hépatocytes, cellules majoritaires du foie (80% des cellules du foie), mais un très grand nombre d'autres cellules cohabitent dans le foie (des cellules des canaux biliaires, des cellules endothéliales, des cellules de Küppfer (macrophages), des lymphocytes, des cellules stellaires et des cellules ovales notamment) (Jacobs 2012). L'utilisation des cellules HepaRG palie en partie cette limitation dans la mesure où elles se différencient en plusieurs types cellulaires, principalement en cellules hépatocytes-like et en cellules épithéliales-like (Gripon 2002, Aninat 2005). De plus, les hépatocytes semblent à priori être les cellules majoritairement transduites par l'AAVr *in vivo*. A notre connaissance, aucune étude n'a encore fait mention de la transduction des autres cellules hépatiques (Bell 2011a, Bell 2011b, Wang L. 2015).

Enfin, pour anticiper au mieux les résultats qui seront obtenus chez les patients lors de l'essai clinique, l'idéal aurait été de travailler sur des modèles cellulaires de patients DMD. Ceci n'a pas pu être réalisé car il est extrêmement difficile de *i)* se procurer des myoblastes et des hépatocytes primaires de patients DMD et *ii)* de les cultiver. Les myotubes DMD entrent en effet très rapidement en sénescence (Webster 1990).

Difficultés liées aux analyses *in vitro* :

Au-delà du choix du modèle cellulaire, nous nous sommes heurtés à quelques obstacles liés aux analyses *in vitro* pour le développement du test d'expression du U7snRNA-Jr53.

Malgré le tropisme particulier de l'AAVr-8 et de l'AAVr-2 pour le foie *in vivo*, aucun de ces deux types de vecteurs (ss ou scAAV), n'a montré de niveau suffisant de transduction des hépatocytes humains *in vitro* (figure 51). Seul l'AAV3 (ssAAV3b) a été capable de transduire *in vitro* nos hépatocytes et nos myoblastes à un bon niveau : >70% d'hépatocytes transduits par un AAVr-3-GFP à la MOI 2.5×10^5 et >80% de myoblastes transduits à la MOI 1×10^5 . Parmi les sérotypes d'AAVr les plus utilisés, l'AAVr-3 est celui qui transduit le moins bien la plupart des cellules ou tissus (Zincarelli 2008). Par contre ce sérotype est d'un grand intérêt pour la transduction des cellules hématopoïétiques (Handa 2000), des cellules cancéreuses du foie (Glushakova 2009, Cheng 2012) et des hépatocytes primaires humains (Glushakova 2009). Pour son entrée dans la cellule, l'AAVr-3 utiliserait ses récepteurs aux

protéoglycanes héparane sulfate (Lerch 2012) et au facteur de croissance hépatotrope humain (HHGF, Human hepatocytes growth factor) ce qui explique son tropisme privilégié pour les cellules hépatiques humaines (Ling 2010).

Bien sûr l'idéal pour ces tests d'expression aurait été d'utiliser le sérotype 8 qui sera utilisé en clinique. Néanmoins, après l'étape de trafficking intracellulaire, l'expression du transgène dépend principalement de son promoteur et de la machinerie cellulaire.

Afin de réellement pouvoir comparer l'expression du U7snRNA-Jr53 entre les modèles hépatiques et musculaires, nous voulions la normaliser par le nombre de copies de vecteur (vg/dg). Lors d'une QPCR classique sur l'ADN extrait des cellules, toutes les copies (y compris celles qui ne sont pas entrées dans le noyau) injectées sont retrouvées : à 3 jours post transduction, on quantifie 100 000 vg/dg pour une MOI de 1^e5 dans des myoblastes.

Notre objectif a donc été de séparer les copies de vecteurs transcriptionnellement actives de celles qui ne l'étaient pas. La méthodologie que nous avons choisie a été de fractionner les cellules pour séparer la fraction cytoplasmique de la fraction nucléaire et ainsi ne récupérer que l'ADN contenu dans le noyau. Malheureusement, dans nos mains et sur nos types cellulaires, aucun protocole n'a correctement fonctionné (tableaux 5 et 6).

En parallèle, il a été montré par une autre équipe du laboratoire que même si le fractionnement cellulaire permettait de récupérer une fraction nucléaire quasi pure (sur les cellules Hela), cela ne permet pas d'isoler les copies de vecteurs entrées dans le noyau (François et al. en préparation).

Dans la littérature, plusieurs protocoles de fractionnement ont pourtant été appliqués et validés par les auteurs. Cependant, les validations de pureté des fractions cytoplasmiques et nucléaires ont systématiquement été faites par des techniques peu sensibles telles que le Western blot (Uhrig 2012, Salganik 2013, Gagnon 2014). Nous avons au contraire utilisé la QPCR pour valider la pureté des fractions (QPCR Cytochrome B et Albumine). Dans nos mains, le fractionnement cellulaire ne permet jamais réellement d'obtenir une fraction nucléaire totalement pure : par QPCR, nous détectons encore un peu d'ADN CytB dans la fraction nucléaire (figure 53). Ainsi, même si nous avons fixé le seuil de contamination en fraction cytoplasmique à 20%, les particules non infectieuses contenues dans ces 20% d'impuretés cytoplasmiques suffiraient à fausser les résultats.

Bien que les choix des modèles cellulaires peuvent être discutés et que l'analyse de l'expression du U7snRNA-Jr53, en absence de normalisation par le nombre de vg/dg, ne puisse être que qualitative, nous avons clairement montré que le U7snRNA-Jr53 était exprimé dans les modèles musculaires et hépatiques (figure 54) et capable de sauter l'exon 53 du messenger *DMD* humain (figure 55) dans les deux types cellulaires

c- Pourquoi une absence d'expression du U7snRNA dans le foie des chiens GRMD ?

Le défaut d'expression du U7snRNA dans le foie n'a été observé que chez le chien *GRMD* et nous avons voulu investigué pourquoi. Même si cette question ne fait pas nécessairement partie du développement du produit clinique AAVr-U7-Jr53, comprendre pourquoi le U7snRNA optimisé pour le saut d'exon ne s'exprime pas dans le foie des chiens pourrait tout de même être utile pour optimiser cet outil.

Nous avons envisagé quelques hypothèses et en avons investigué certaines :

- *Le promoteur du U7snRNA n'est en fait pas ubiquitaire ?*

Le U7snRNA WT est un petit ARN nucléaire dont le rôle est de participer à la maturation 3' des ARNm des histones (Mowry et Steitz 1987). Impliqué dans une fonction constitutive de la cellule, il est logique que cet ARN soit considéré comme ubiquitaire ; d'ailleurs aucune étude n'a, à notre connaissance, montré de variations d'expression du U7snRNA (ou d'autres snRNA) en fonction du tissu, du stade de développement ou autre (Zieve Sauterer 1990). Même lorsque les niveaux d'expression des ARNm des histones (cibles naturelles du U7snRNA WT) varient, notamment au cours du cycle cellulaire, le niveau de U7snRNA, reste constant (Harris 1991, Whitfield 2000). En effet, l'hypothèse du U7snRNA non ubiquitaire a rapidement été exclue puisque nous avons montré par Northern blot et/ou RT-QPCR que les 3 U7snRNA WT canin, simien et humain présentent une expression similaire dans le foie et le muscle squelettique (figure 56). A noter cependant que toutes nos constructions U7snRNA optimisées pour le saut d'exon (U7-E6/8, U7-Dtex53 et U7-Jr53) ont été développées à partir du U7snRNA murin et que leur expression est donc drivée par le promoteur du U7snRNA WT murin. Nous n'avons cependant aucune raison de penser que le U7snRNA WT murin ne soit pas, lui aussi, ubiquitaire.

- *Inhibition espèce spécifique de l'expression du U7snRNA optimisé dans le foie ?*

Puisque le défaut d'expression du U7snRNA n'est observé que chez les chiens, il est possible que le promoteur murin ne puisse pas s'exprimer correctement dans le contexte hépatique canin. En dehors du promoteur, il est possible que le U7snRNA murin soit inhibé ou dégradé par des facteurs inhibiteurs. De très nombreuses protéines interagissent pour la transcription et la maturation du U7snRNA (Kiss 2004, Schumperli et Pillai 2004, Jawdekar 2008), l'une d'elle n'est peut-être pas totalement compatible avec le U7snRNA murin dans le foie.

- *Inhibition séquence spécifique de l'expression du U7snRNA optimisé dans le foie ?*

Comme nous l'avons évoqué, les analyses d'expression des U7snRNA que nous avons menées chez le chien, le primate non-humain et l'Homme concernaient différentes constructions : U7snRNA-E6 et -E8, U7snRNA-Dtex53 et U7snRNA-Jr53 respectivement. Or, seuls les U7snRNA-E6 et -E8 sont inhibés dans le foie.

Sans forcément identifier le mécanisme précis, nous souhaitons au moins déterminer si la « non expression » des U7snRNA-E6 et -8 dans le foie des chiens *GRMD* avait une origine « espèce spécifique » ou « séquence spécifique ». Nous avons envisagé une série de tests de transductions croisées avec les différentes constructions U7snRNA optimisées. Malheureusement, aucune réponse n'a pu être apportée, principalement à cause des limites de normalisation des analyses réalisées *in vitro* (figure 58). Sans normalisation des vg/dg il nous était en effet impossible de comparer des niveaux d'expression entre deux types cellulaires différents.

- *Inhibition de l'expression du U7snRNA optimisé dans un contexte pathologique DMD ?*

L'expression du U7snRNA dans le foie n'est pas altérée chez les primates et l'Homme, qui sont des modèles sains alors que dans le contexte des chiens *GRMD*, le transgène est peu exprimé dans le foie. Il est effectivement décrit chez la souris dystrophique que le contexte pathologique DMD du muscle peut empêcher l'expression d'un transgène (Dupont 2015). Mais dans ce cas, on peut se demander pourquoi est-ce que les U7snRNA-E6 et -E8 s'exprimeraient dans le muscle squelettique, plus touché par la pathologie DMD que le foie ? Peu de choses, à notre connaissance, sont rapportées sur les éventuelles lésions hépatiques chez les patients DMD. Une élévation du taux des enzymes hépatiques transaminases (Alanine transaminase, ALT et aspartate transaminase, AST) est fréquemment observée chez les patients DMD ou BMD, mais elle serait issue du muscle endommagé (Lin 1999, MacMillan

2011). Par contre, il a été montré que les souris *mdx* présentent des dysfonctions hépatiques telles qu'une élévation des taux des enzymes LDH (lactate dehydrogenase), AP (alkaline phosphatase) et AST ainsi qu'une diminution du cytochrome P450 (Brazeau 1992).

d- Pourquoi une expression de la dystrophine Dp427 dans le foie ?

Dès les premières analyses par RT-PCR nichées réalisées chez nos chiens *GRMD*, nous avons été surpris de constater l'expression du messager *DMD* Dp427 dans le foie (figure 41). Nous avons confirmé ces résultats dans des échantillons de foie et d'hépatocytes isolés de chien sain (non montré), dans les foies des primates non-humains et dans les modèles d'hépatocytes humains (figures 44 et 55).

L'isoforme de la dystrophine Dp427 correspond à l'isoforme majoritaire, la plus longue et spécifiquement exprimée dans les muscles, le cerveau ou les cellules de Purkinje à partir des promoteurs M, B et P respectivement (Muntoni 1995, Nudel 1989, Gorecki 1992). Seule l'isoforme Dp71 est décrite pour avoir une expression plus générale dans les tissus non musculaires et notamment dans le foie (Hugnot 1992), mais elle n'est transcrite qu'à partir de l'exon 62 (figure 4). Le messager Dp71 ne peut donc pas être détecté par des RT-PCR amplifiant le messager *DMD* des exons 3 à 10 chez le chien ou des exons 51 à 54 chez le primate ou l'Homme. Une autre étude avait en fait déjà démontré la présence du messager Dp427 dans différents tissus de souris incluant le foie, la rate, les reins et les poumons, notamment (Tokartz 1998), mais aucune preuve de l'expression de la protéine Dp427 n'a été faite.

Nous avons montré par Western blot que la protéine dystrophine Dp427 n'est pas exprimée dans le foie chez le chien *GRMD*, ni dans le foie et les hépatocytes isolés chez le chien sain (non montré). De plus, nous avons réalisé des analyses immunohistochimiques en marquant la dystrophine sur des coupes de foie de chien sain. Là encore, aucune expression de la protéine Dp427 n'a été détectée dans les hépatocytes. Par contre un léger signal fluorescent a été observé au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins hépatiques, suggérant une expression de l'isoforme Dp427 au niveau des muscles lisses des vaisseaux sanguins (non montré).

Chez les chiens *GRMD*, nous avons également observé que le transcrit *DMD* canin majoritaire dans le foie ne contenait pas l'exon 9 (figure 41), qui subit un épissage alternatif naturel (Reiss et Rininsland 1994). Une équipe a justement étudié la récurrence de l'épissage alternatif de l'exon 9 du gène *DMD* en fonction du tissu. Ils montrent que les tissus

n'exprimant pas la protéine dystrophine ont plus de transcrits sans exon 9 alors que dans le muscle, le cœur ou le cerveau, la forme majoritaire du transcrit contient l'exon 9 (Reiss et Rininsland 1994). Nos résultats sont donc en parfaite corrélation avec ces observations puisque nous n'avons pas détecté de protéine Dp427 dans le foie.

Chez les patients DMD, l'expression concomitante du U7snRNA-Jr53 et de sa cible, le messenger *DMD* Dp427 dans le foie devrait théoriquement aboutir à un saut de l'exon 53. Pourtant, puisque la protéine Dp427 n'y est pas exprimée, ce saut d'exon dans le foie ne devrait pas avoir d'impact. Dans le cas contraire, les conséquences auraient été difficiles à envisager étant donné le peu d'informations connues sur le foie dans un contexte DMD. Le messenger de la protéine Dp71, exprimée dans le foie, ne sera pas impacté puisqu'il ne contient pas l'exon 53.

3) Potentiels effets toxiques spécifiques du transgène U7snRNA – Effets off-targets

Si les analyses chez les rats et les primates non-humains ont permis d'analyser la potentielle toxicité de la capsid AAVr-8, les analyses off-targets spécifiques du U7snRNA-Jr53 peuvent être considérées comme une étude de toxicologie du transgène *per se*. Comme cela a été mis en évidence dans de nombreuses études pour les siRNA et les nucléases (*Introduction, Chapitre 4*), des hybridations off-targets sur d'autres transcrits du génome humain, pourraient avoir de lourdes conséquences selon *i)* l'amplitude des effets, *ii)* la fonction des gènes off-targets et *iii)* le timing d'expression du transgène. Contrairement aux thérapies par AON qui peuvent être stoppées en cas d'effets indésirables majeurs, le U7snRNA-Jr53 sera exprimé de façon stable sur le long terme (théoriquement toute la vie du patient). Ceci renforce donc la nécessité de caractériser ses potentiels effets off-targets avant l'administration aux patients DMD.

Comme la réaction de saut d'exon, les off-targets sont séquence et espèce spécifiques (Burchard 2009), nous avons donc réalisé ces analyses off-targets dans nos modèles de myotubes et d'hépatocytes primaires humains. Il nous a semblé intéressant de réaliser cette étude aussi bien dans le tissu cible, le muscle, que dans le foie puisque nous avons détecté un important transfert de gène et une expression du transgène dans ces deux tissus. Puisque chaque type cellulaire possède son propre transcriptome, il est probable qu'il possède également sa propre signature de cibles off-targets. Il aurait donc été pertinent de caractériser

les effets off-targets dans d'autres organes, notamment la rate, dans laquelle nous avons retrouvé un nombre de vg/dg important chez les chiens *GRMD* (figure 37) et les primates non-humains (non montré) ou bien dans d'autres types cellulaires au sein du muscle ou du foie. Pour des raisons matérielles, budgétaires et de contraintes de temps, nous n'avons pas pu réaliser ces analyses complémentaires et avons donc choisi de focaliser nos analyses sur le muscle squelettique et le foie. Notre objectif pour cette étude a été de développer une méthodologie d'analyse de la toxicité du transgène U7snRNA-Jr53 qui permette de mettre en évidence ses effets off-targets spécifiques, le cas échéant. Même si nous avons cherché à être le plus exhaustif possible, il s'agit surtout d'une preuve de principe pour la réalisation d'une telle analyse.

a- Choix des méthodes d'analyses, stratégie 1 vs stratégie 2

Recherche des cibles off-target *in silico* (stratégie 1) :

Cette première stratégie *in silico* est une méthode généralement utilisée pour la recherche de cibles off-targets. Nous avons utilisé l'outil miRanda (Enright 2003, John 2004) et une base de données refseq de NCBI pour identifier les cibles potentielles du U7snRNA-Jr53. Sur les 39 gènes potentiellement off-targets identifiés, aucun n'a montré de variations d'épissage ou d'expression après les validations expérimentales (figures 60 et 61). Malgré la simplicité et la rapidité de l'approche, une recherche *in silico* des cibles potentielles peut rapidement être biaisée. Elle dépend en effet de 3 éléments :

- *La base de données et le génome de référence à partir desquels la recherche est faite :*

Selon que l'on considère les bases de données de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/>) ou celles de Gencode (Ensembl + Hanova) (<http://www.gencodegenes.org/>), le nombre et la nature des gènes identifiés peuvent être différents. De même, en fonction des mises à jour effectuées par les deux plateformes et de la version du génome humain utilisée pour les recherches, les résultats seront variables. Pour les prédictions *in silico* de cette 1^{ère} stratégie analytique, nous avons utilisé NCBI et l'ancienne version du génome (hg19) alors qu'au moment de réaliser les prédictions pour notre 2^{nde} stratégie analytique (par RNAseq), il nous a semblé préférable d'utiliser Gencode et sa toute nouvelle version du génome (hg38). Entre les deux types de prédictions, très peu de gènes en commun ont finalement été identifiés !

- *L'outil / le logiciel d'alignement utilisé :*

Bien sûr la recherche de cibles *in silico* ne permet d'obtenir que des prédictions théoriques basées sur la complémentarité entre notre séquence d'intérêt et une cible. Mais certains outils sont plus adaptés que d'autres, en fonction de la question posée. Pour les siRNA, il a été montré que Blast ne semblait pas adapté (Snove 2004) puisque cet algorithme recherche un pourcentage de complémentarité sur les 21 pb du siRNA et ne prend pas en compte la spécificité de l'outil siRNA (appariement au niveau de la région graine). Certains algorithmes prennent en compte la stabilité thermodynamique des liaisons ARN/ARN (Naito 2012), ou recherchent des motifs sur les brins opposés de l'ADN pour les ZFN et TALEN (Cradick 2011). Pour notre étude sur U7snRNA-Jr53, nous avons choisi le logiciel miRanda, spécialisé dans l'identification des cibles miRNA et donc des interactions ARN/ARN. Pour la 2nde stratégie, nous avons complété les prédictions miRanda sur les exons étendus avec celles de Blast (variant « Blastn-short » pour les courtes séquences). Des candidats différents ont été mis en évidence avec miRanda et Blast, seuls 2 sont communs entre les deux outils (tableaux S2 et S3 en annexe), ce qui montre bien la nécessité de choisir l'outil avec attention.

- *Les valeurs seuils ou cut-offs entre la cible et la séquence d'intérêt :*

Il est bien sûr difficile de définir (aléatoirement ?) un nombre de mismatches, un score, ou un pourcentage d'identité minimum entre la séquence d'intérêt et les cibles potentielles. Le risque de fixer des valeurs seuils d'identité ou de similarité trop stringentes est de passer à côté de cibles off-targets. C'est justement probablement le cas dans l'étude de Ousterout et al., où aucune séquence cible off-target pour leur TALEN n'a été trouvée dans tout le génome humain (Ousterout 2013). L'idéal est de tester plusieurs valeurs seuils en élargissant les possibilités petit à petit, mais en prenant le risque de prédire un trop grand nombre de cibles off-targets dont la plupart ne seraient pas biologiquement pertinentes (Lindow 2012).

En dehors des biais possibles des prédictions *in silico* que nous venons d'évoquer, deux autres limitations concernent *i)* la sous-estimation des effets off-targets indirects sur des transcrits qui ne possèdent pas de site de fixation au U7snRNA-Jr53 et *ii)* les difficultés de conception des RT-PCR et RT-QPCR pour les validations expérimentales. En effet, même si un site potentiel de fixation du U7snRNA-Jr53 est prédit dans une cible off-target identifiée, on ne connaît pas l'effet qu'aura cette fixation sur le transcrit off-target (inclusion/saut d'exon, rétention d'intron, apparition d'un site alternatif d'épissage, activation d'un site cryptique, augmentation/diminution globale de l'expression du transcrit etc.). Or, pour

visualiser certains de ces effets, les amorces et les conditions PCR doivent être adaptées et optimisées spécifiquement. Il est donc nécessaire de partir à l'aveugle pour la validation d'effets off-targets et cela pourrait conduire à de mauvaises interprétations.

Pour toutes les raisons évoquées ci-dessus, nous avons considéré qu'une analyse *in silico* seule n'était pas adaptée à la recherche exhaustive des potentiels effets off-targets du U7snRNA-Jr53. Si la plupart des études off-targets se contentent de ce genre d'analyses *in silico*, c'est probablement parce qu'avec les siRNA, les CRISPR, les TALEN et les ZFN, des cibles off-targets sont systématiquement mises en évidence (*Introduction, Chapitre 4, 2*). En ce qui concerne les effets off-target des outils antisens (AON et U7snRNA), aucun effet off-target n'a été montré à ce jour (Obad 2011, Schmid 2013, Wilton et Fletcher 2005). Une autre technique de transcriptomique doit donc être utilisée pour évaluer les variations d'expression des gènes à un autre niveau.

Analyse transcriptomique par RNAseq pour l'identification des effets off-targets (stratégie 2):

Méthodologie de l'analyse par RNAseq :

Afin de mettre en évidence les effets off-targets spécifiques du U7snRNA-Jr53, nous avons analysé des échantillons de myotubes et d'hépatocytes primaires humains transduits avec un AAVr-3-U7-Jr53 ainsi que leurs contrôles non transduits. Il aurait été intéressant de faire séquencer des échantillons transduits avec un AAVr-U7-Scramble afin d'identifier directement les cibles spécifiques du U7snRNA-Jr53 parmi les gènes candidats dont l'épissage ou l'expression varient. Ce contrôle a par contre été incorporé pour nos validations expérimentales par RT-PCR et RT-QPCR (*Résultats, partie 2, B- 4) b-*). En plus du contrôle AAVr-U7-Scramble, le séquençage d'échantillons transduits avec un AAVr « vide » aurait aussi pu être réalisé. Il s'agit d'un AAVr produit sans le plasmide contenant le transgène et les ITR, et donc en théorie uniquement constitué de la capside. Ce genre de capsides vides a été utilisé, notamment pour évaluer l'impact de la capside seule sur les cellules transduites (Stilwell 2003, Dane 2015). Plusieurs études récentes ont également montré que le pourcentage non négligeable de capsides vides (c'est-à-dire sans le transgène d'intérêt) générées au cours de la production de vecteurs AAVr pose de nouvelles problématiques quant à leur rôle face aux réponses immunitaires anti-AAV (Wright 2014).

Avant l'envoi au séquençage de nos échantillons, nous y avons vérifié que l'effet du U7snRNA-Jr53 sur sa cible (saut d'exon 53 sur le messenger *DMD* humain) était visible en RT-PCR (figure 60). Par contre le niveau de saut d'exon dans les myotubes et surtout dans les hépatocytes est faible, et ce malgré le bon niveau de transduction par l'AAVr-3 à la MOI 1^{e5} (>70% pour les deux types cellulaires). Dans des cellules saines, le saut de l'exon 53 sur le messenger *DMD* sain entraîne un décalage du cadre de lecture. Le transcrit hors phase est alors sujet au NMD (nonsense mediated decay), un système de dégradation des ARNm épissés de façon aberrante (Kerr 2001, Cartegni 2002, Miller 2014). Dans un contexte *DMD*, au contraire, le saut de l'exon 53 permet de restaurer le cadre de lecture et de produire un transcrit en phase qui n'est plus dégradé par le système NMD. Ceci expliquerait les faibles pourcentages de saut d'exon observés dans des contextes sains (Aartsma Rus 2003).

Biais connus des analyses par RNAseq :

Depuis sa première utilisation en 2008 (Nagalakshmi 2008), le RNA seq a été utilisé intensivement et apparaît aujourd'hui comme l'alternative aux microarrays (Schena 1995) pour la compréhension du transcriptome humain. Comme nous l'avons évoqué (*Introduction, Chapitre 4, C-*), le RNAseq offre de nombreux avantages par rapport aux microarrays, en permettant notamment l'évaluation du transcriptome dans sa globalité via l'identification de nouveaux transcrits, de variants d'épissage, et de transcrits très faiblement exprimés (Marioni 2008, Xu 2013). Le RNA seq est basé sur le comptage des reads alignés sur chaque gène ou transcrit pour en estimer l'abondance dans un échantillon donné. Ces comptages nécessitent par contre des normalisations pour corriger les différentes sources de biais. D'abord, la plus grande partie des reads séquencés proviennent des gènes les plus fortement exprimés, entraînant la sous-représentation des autres gènes (surtout avec une profondeur de séquençage trop faible). De plus, le comptage des reads est également biaisé par la longueur du transcrit ; les transcrits les plus longs ayant plus de chance d'être séquencés que les plus courts (Oshlack 2009, Gao 2011, Finotello 2014). La nature de la séquence du transcrit peut également être une source de biais puisqu'il a été montré que le pourcentage de bases G/C (guanine/cytosine) affectait le séquençage (Risso 2011, Benjamini 2012). Quel que soit la méthode de normalisation choisie, les résultats seront faussés si les reads ne sont pas uniformément distribués le long des séquences. Ceci peut être dû à des biais générés au moment de la préparation des bibliothèques (fragmentations des ARN, retro-transcription en ADNc et amplification par PCR non uniformes), à des erreurs de séquençage ou à des ambiguïtés à l'étape d'alignement (Hansen 2010, Aird 2011, Li T. 2011, Roberts 2011, Jiang 2013).

De considérables progrès ont été réalisés ces dernières années pour minimiser ou corriger ces biais via l'optimisation des protocoles de préparation des librairies, de séquençage et des méthodologies d'analyse (Finotello 2014, Zypych-Walczak 2015). Les méthodologies d'analyse par RNAseq sont en constante évolution et sont multiples. Pour aider à choisir les méthodologies les plus adaptées et pour permettre la mise en place de standards et de « guidelines » pour les contrôles qualité en RNAseq, le consortium SEQC (FDA Sequencing Quality Control) a même récemment été créé (SEQC/MAQC-III Consortium 2014).

Pour ce qui est de l'analyse différentielle d'expression des gènes (ou des exons pour l'identification de variants d'épissage), de nombreuses méthodologies existent et divergent souvent par leur procédures de normalisation, leur méthode de détection de l'expression différentielle des isoformes et de leur méthodes statistiques notamment (Rapaport 2013, Hooper 2014, Rajkumar 2015).

Il existe principalement 3 méthodologies de comptages des reads pour estimer l'expression des transcrits/exons (Anders 2012).

La première est basée sur le simple comptage des reads sur chaque locus génique (quelque soit les isoformes du transcrit), pour mesurer l'expression globale de chaque gène dans les échantillons. Nous avons choisi l'outil DESeq2, qui suit cette méthode (Anders et Huber 2010, Love 2014) pour estimer les différences significatives d'expression des gènes entre nos deux échantillons.

Une autre méthode est basée sur l'assemblage des différents fragments d'un transcrit (obtenus après alignement sur le génome) en transcrits entiers. La couverture de reads sur chaque fragment permet alors l'estimation du niveau d'expression de tous les transcrits individuels d'un gène (Trapnell 2010).

Enfin, une troisième méthode s'abstient de l'étape d'assemblage des transcrits et s'intéresse aux différences d'utilisation des exons entre les échantillons en estimant la densité de reads sur chaque exon. L'outil DEXseq que nous avons utilisé pour mettre en évidence les variants d'épissage, suit cette dernière méthodologie et permet de mettre en évidence les différences significatives d'utilisation d'exon (ou de jonctions d'exons) (Anders 2012, Hooper 2014, Li Y. 2015b).

b- Effets off-targets identifiés in vitro après transduction par un AAVr-U7-Jr53

Variations d'épissage induites par l'AAVr-U7-Jr53 :

Grâce à notre analyse avec DEXseq des jonctions différentiellement utilisées, nous avons montré que, excepté le gène *DMD* (figure 64), très peu d'autres gènes possèdent des modifications significatives de l'utilisation d'une de leurs jonctions d'exons dans les myotubes (figures 65, tableau S2) ou dans les hépatocytes (figure 66, tableau S3) qui ont été transduits avec le vecteur AAVr-U7-Jr53. De plus, la plupart des jonctions différentiellement utilisées ne varient pas au-delà d'un facteur 2 (valeur absolue du $\log(\text{FC}) < 1$).

Dans les myotubes, 5 jonctions d'exons présentent un différentiel d'utilisation très élevé (valeurs absolues des $\log(\text{FC})$ entre 5.63 et 7.56), mais sont par contre très faiblement exprimées (valeur d'expression entre 2.1 et 4.1). De façon générale, les jonctions faiblement exprimées semblent montrer des différences d'utilisation plus fortes que les jonctions fortement exprimées (forme de triangle du MAplot). Ce phénomène est couramment observé dans les données de séquençage haut débit, et est une conséquence directe de l'utilisation des données de comptage des reads dans lesquelles les ratios sont biaisés quand le nombre de reads est faible (Love 2014).

Par exemple, comparons l'expression de 2 gènes A et B dans des échantillons transduits (T) et non transduits (NT). Pour le gène A, fortement exprimé, si l'on comptabilise 210 reads dans l'échantillon NT et 220 reads dans l'échantillon T, le ratio (ou fold change) serait de 1,04. Alors que pour le gène B, faiblement exprimé, si l'on comptabilise 10 reads dans l'échantillon NT et 20 reads dans l'échantillon T, le fold change sera de 2. Pourtant, pour les deux gènes, la différence de densité de reads n'est que de 10 reads entre les échantillons NT et T. Cette hétéroscédasticité (variance du $\log(\text{FC})$ en fonction du niveau d'expression) complique les analyses et l'interprétation des données. Pour cette raison, nous avons préféré ne pas tenir compte des variations d'épissage de ces 5 jonctions.

Outre leur forme de triangle révélant un biais d'interprétation, les MAplot (ainsi que les volcano plot) sont globalement symétriques, ce qui signifie qu'il y a autant de jonctions moins utilisées que de jonctions plus utilisées dans les échantillons transduits par rapport aux échantillons non transduits. Même si la séquence antisens du U7snRNA-Jr53 est théoriquement capable de bloquer ou de favoriser l'incorporation d'un exon à l'ARNm mature, en se fixant respectivement sur un ESE ou un ESS (*Introduction, Chapitre 3*), cette symétrie reflète peut être simplement des modifications d'épissage peu pertinentes biologiquement (significativité faible sur les volcano plots) et/ou non liées à l'expression spécifique du U7snRNA-Jr53.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons anticipé des validations expérimentales de nos résultats de RNAseq par RT-PCR et/ou RT-QPCR en nous concentrant sur *i)* les candidats possédant un site de fixation potentiel pour la séquence antisens du U7snRNA-Jr53 et sur *ii)* les quelques candidats « outliers » qui ressortent du lot, sur les représentations graphiques de MAplot et de volcano plot.

Le choix des candidats et les analyses de validations expérimentales sont encore en cours à l'heure de la rédaction de ce manuscrit. Nous espérons pouvoir valider par des techniques moléculaires (RT-PCR ou RT-QPCR), les variations d'épissage, quoique faibles, détectées par RNAseq sur ces gènes. Ces résultats nous permettront de conclure quant à l'existence d'effets off-targets spécifiques du U7snRNA-Jr53 (avec le contrôle U7snRNA-Scramble) et de valider notre méthodologie d'analyse des effets off-targets par RNA seq.

Variations d'expression des gènes induites par l'AAVr-U7-Jr53 :

L'analyse de l'expression globale des gènes avec l'outil DESeq2 dans les myotubes et les hépatocytes primaires humains a mis en évidence un ensemble de gènes différentiellement exprimés entre les échantillons transduits et non transduits (tableaux S4 et S5 en annexe), mais dont les variations sont le plus souvent très faibles (moins d'un facteur 2) (figures 69 et 70).

On peut noter la forme non triangulaire des MAplots, ce qui signifie que les biais d'hétéroscédasticité observés pour l'analyse de l'épissage différentiel, et impliquant des fold change plus élevés pour les gènes les plus faiblement exprimés, ne sont pas aussi marqués pour l'analyse de l'expression. En effet, DESeq2, contrairement à DEXseq, tiens compte de ce phénomène et minimise les biais qu'il peut engendrer en réduisant les estimations de fold change pour les gènes sur lesquels peu de reads sont comptabilisés (Love 2014).

Même si ça n'était pas l'objectif de cette étude off-target, nos résultats nous fournissent également des indications sur les effets d'une transduction AAVr *in vitro*. Les variations d'expression géniques détectées dans nos échantillons transduits sont restreintes (d'autant que parmi ces gènes, certains varient peut être sous l'effet du U7snRNA-Jr53) et sans grande ampleur, ce qui est plutôt rassurant d'un point de vue biosécurité, et en accord avec de précédentes études (Stilwell 2003, McCaffrey 2008).

Dans la première étude, les auteurs ont cherché à évaluer si les variations d'expression des gènes dans les cellules infectées/transduites par un AAV(r) ou un vecteur adénoviral (Ad)

sont prédictives d'une certaine toxicité (Stilwell 2003). Pour cela, ils ont analysé l'expression des gènes par microarrays à partir de fibroblastes de poumon humains infectés par un Ad de 1^{ère} génération, un Ad vide, un AAV sauvage, un AAV recombinant (portant un transgène rapporteur) et un AAV vide, entre 4 et 48h post infection. Après infection/transduction par l'AAV(r), les auteurs ne mettent en évidence que peu de variations d'expression des gènes (1.9% des gènes de la microarray) et les profils obtenus sont identiques pour les AAV sauvage, AAVr et AAV vide. Par contre, après infection par l'Ad (et l'Ad vide), les variations d'expression des gènes sont beaucoup plus importantes (4.9% des gènes). De plus, ces variations concernent des gènes liés à des processus inflammatoires (cytokines, chimiokines notamment), ce qui n'est pas le cas avec les AAV, confirmant ainsi de précédents travaux (Zaiss 2002). Les gènes dont l'expression varie après infection par l'AAV sont généralement impliqués dans la réplication ADN ou dans la régulation du cycle cellulaire, cohérent avec un arrêt du cycle en phase G2/M. Un arrêt transitoire du cycle cellulaire après transduction par l'AAVr a d'ailleurs été confirmé très récemment *in vivo* dans le foie de souris (Dane 2015).

Plus récemment, le même type d'analyses par microarrays a été réalisé *in vivo*, dans le foie de souris (McCaffrey 2008). L'objectif était d'évaluer les réponses transcriptionnelles de la cellule hôte après injection d'un Ad de 1^{ère} génération, d'un Ad gutless et d'un AAVr-FIX à 1h, 6h, 72h et 4 semaines post injection. Les auteurs ont d'abord montré que les deux Ad modulaient l'expression des mêmes gènes (gènes liés à surveillance de pathogènes, à la réponse immunitaire innée, codant des cytokines pro-inflammatoires et des gènes dépendant des réponses IFN notamment). Cette signature commune entre les deux Ad, malgré l'absence de gènes viraux dans l'Ad gutless, suggère que les réponses immunitaires dues aux Ad sont essentiellement dues à la capside virale plutôt qu'à l'expression résiduelle des gènes viraux. L'AAVr, quant à lui, cause significativement moins de variations du transcriptome de la cellule hôte que les Ad. De plus, comme dans notre étude, les fold change sont faibles (la grande majorité est < 2).

A notre connaissance, aucune étude n'a utilisé le RNAseq pour évaluer les variations d'expression des gènes après transduction AAVr *in vivo* ou *in vitro*.

Dans notre analyse par RNAseq, parmi les gènes dont l'expression varie significativement, seul 1 gène, MT1 (metallothionéine 1), est commun avec l'étude de McCaffrey 2008 (Mt1 chez la souris). De nombreux autres gènes MT1 (MT1X, MT1G, MT1F, MT1E et MT1H) montrent en effet des variations de leur expression dans nos hépatocytes

transduits, mais aucun lien n'a encore été décrit entre la fonction des métallothionéines et la transduction AAVr. Nous retrouvons quelques gènes, non communs, mais appartenant à la même famille entre l'étude de Stilwell 2003 et la nôtre : des kinésine like (KIF) et des gènes de la famille des MCM (mini chromosome maintenance), impliqués respectivement dans le transport intracellulaire ou dans la réplication de l'ADN. L'expression de ces gènes dans nos modèles cellulaires est donc vraisemblablement modifiée à cause de l'AAVr et non pas un effet off-target spécifique du U7snRNA-Jr53.

Les résultats que nous avons obtenus dans les hépatocytes primaires humains sont également très rassurants d'un point de vue sécurité puisque les niveaux de variation d'expression des gènes sont encore plus faibles que dans les myotubes (figure 69 et 70). Ainsi, nos inquiétudes quant à l'expression ectopique du U7snRNA-Jr53 dans le foie chez l'Homme sont atténuées par ces résultats, suggérant des effets off-targets limités et en tous cas plus faibles que dans le muscle. Il est possible que l'expression du messenger *DMD* Dp427 dans le foie limite les effets off-target du U7-Jr53 dans la mesure où celui-ci se fixera préférentiellement sur sa cible, plutôt que sur d'autres messagers avec qui la complémentarité ne serait pas parfaite.

L'ensemble des analyses réalisées dans le cadre de la recherche d'effets off-targets spécifiques du produit clinique U7snRNA-Jr53 a montré de faibles variations de l'épissage des transcrits et de l'expression des gènes (peu de candidats et des FC globalement < 2). Pour autant, certaines des variations observées pourraient avoir un impact non négligeable sur la biologie de la cellule, et doivent être caractérisées plus amplement. Nous commencerons par valider expérimentalement quelque uns de ces gènes candidats par des techniques moléculaires de RT-PCR et/ou RT-QPCR sur des échantillons similaires de myotubes et d'hépatocytes transduits ou non avec l'AAVr-U7-Jr53 ou l'AAVr-U7-Scramble. Si les variations d'expression ou d'épissage observées en RNAseq sont confirmées, nous nous concentrerons sur l'anticipation des impacts de tels effets off-targets sur la sécurité de notre approche thérapeutique chez l'Homme. Deux facteurs seront déterminants pour anticiper cela :

- L'effet off-target mesuré (sa nature et son amplitude). Cependant, il faut rester prudent dans l'interprétation des modifications transcriptomiques, car tous les effets ne sont pas forcément reflétés au niveau protéique (dans le cas des transcrits codants). Des analyses multi-omics (au niveau transcriptomique et protéomique) décrivent en effet une

corrélation faible à modérée entre l'expression des ARNm et celle des protéines (Ideker 2001, Maier 2009, Schwanhaussner 2011, Roberts 2015).

- La fonction du gène off-target. Pour les lincRNA, dont certains sont différentiellement exprimés (tableaux S4 et S5 en annexe), l'impact des effets off-targets sera plus difficilement prédictible puisque la vaste majorité des lincRNA n'ont pas encore été fonctionnellement caractérisés (Gloss et Dinger 2015).

4) Réflexions générales finales

Les concepts de thérapie génique et de vectorisation d'un ADN exogène par un vecteur viral pour le traitement des maladies génétiques monogéniques sont nés au milieu des années 1970 (Friedmann et Roblin 1972). Fort des nouvelles techniques et des nouvelles connaissances sur le génome et son fonctionnement acquises au fil des ans (la PCR inventée en 1983, les premières cartes du génome humain publiées dans les années 1990 et le séquençage du génome humain achevé en 2003, notamment), la thérapie génique a su s'imposer comme nouvelle alternative pour le traitement des maladies humaines. Malgré quelques revers au début des années 2000, notamment avec les travaux des Pr. Alain Fisher et Marina Cavazzana-Calvo sur les enfants atteints du syndrome de SCID-X ayant développés des leucémies après traitement par un vecteur rétroviral (Hacein-Bey-Abina 2003, *Nature* 2009), la thérapie génique a désormais fait ses preuves comme l'attestent les nombreux traitements aujourd'hui testés chez l'Homme. Alors qu'en Chine, un médicament de thérapie génique anti-cancer avait été approuvé en 2005 (<http://www.sunwaybio.com.cn/en/product.html>), ça n'est que très récemment que les agences sanitaires européennes ont pour la première fois autorisé la mise sur le marché d'un médicament de thérapie génique AAV pour le traitement d'un déficit en lipoprotéine lipase d'origine génétique (Glybera®, Ylä-Herttuala 2012). L'aboutissement du développement clinique de ces deux médicaments laisse entrevoir de manière optimiste l'avenir de la thérapie génique, et de nouvelles AMM devraient voir le jour dans les mois ou années à venir.

Le développement de tels médicaments innovants, depuis la découverte du gène jusqu'aux essais cliniques, peut être extrêmement long et coûteux, mais aujourd'hui les connaissances acquises et les techniques haut-débit développées permettront d'accélérer ce processus. De nombreux challenges ont déjà été relevés, notamment pour les procédés de production des vecteurs à grande échelle, étape qui a longtemps été une limitation.

Aujourd'hui, grâce à la plateforme Sf9/baculovirus (Galibert 2011, Kotin 2011) notamment, des bioréacteurs de 200L permettent une production de vecteurs AAVr en quantité suffisante pour leur administration dans des modèles gros animaux, et chez l'Homme à des doses thérapeutiques très élevées (jusqu'à 1^{e14} vg/kg !).

Malgré tout, des efforts restent à faire dans la conception et la réalisation des essais cliniques (standardisation des tests et des évaluations de l'efficacité des produits de thérapie génique (revoir *Introduction, Chapitre 3, B, 3*), et des études pré-cliniques, en particulier les études de toxicologie. Ces études pourraient en effet être optimisées pour accélérer le développement clinique du produit de thérapie génique et économiser plusieurs centaines de milliers d'euros ; sans oublier des considérations éthiques à prendre en compte dans la mesure où ces études de toxicologie sont généralement « gourmandes » en nombre d'animaux.

En effet, quelle est la pertinence de réaliser des études de toxicologie pharamineuses sur plusieurs espèces animales, avec des analyses multiples, mais qui, au final ne permettent pas de répondre à toutes les interrogations quant à la sécurité du produit ?...

Je pense notamment aux études de biodistribution du vecteur chez les modèles de rongeurs qui ne permettront pas d'anticiper la biodistribution dans un organisme tel que celui de l'Homme. Je pense également aux analyses des réponses immunitaires qui, quel que soit l'espèce, y compris chez le primate non-humain, le plus adéquat des modèles pour cette question, ne permettront pas d'anticiper pleinement les réponses immunitaires chez l'Homme, comme nous l'avons évoqué précédemment (Manno 2006, Mingozi 2007, Basner-Tschakarjan et Mingozi 2014). Enfin, je pense également à la question de la transmission à la descendance de la correction génétique apportée par le produit clinique. Dans notre cas, les modèles de rats et de primates non-humains n'étaient pas judicieux pour analyser la présence du vecteur dans les cellules germinales car ceux-ci n'avaient pas atteints leur maturité sexuelle au moment des analyses.

Cette question est d'autant plus légitime que des études pré-cliniques, généralement très exhaustives, sont déjà réalisées chez l'animal, sur des modèles animaux généralement bien plus pertinents que ne peuvent l'être ceux des études de toxicologie (notamment dans notre cas, le chien *GRMD* versus le rat sain). De plus, ces études pré-cliniques répondent déjà à certaines questions cruciales sur la toxicité de l'approche et du produit, telles que la tolérance

du mode d'injection, la biodistribution du produit clinique *in situ*, les réponses immunitaires humorales et cellulaires, les effets toxiques aigus et les effets toxiques sur le long terme. Nous avons par exemple suivi des chiens jusqu'à 6 mois post-injection, alors que les primates de notre étude de toxicologie n'ont été suivis « que » 90 jours.

L'idée ici n'est pas de démontrer l'inutilité des études de toxicologies qui sont indispensables à l'évaluation globale de la sécurité d'un produit avant son administration chez l'Homme: les doses de vecteur administrées aux animaux pendant les études pré-cliniques étant souvent bien plus faibles que celles administrées aux animaux des études de toxicologie. Par contre, il paraît nécessaire de trouver des moyens d'optimiser ces études, en lien avec les agences réglementaires, afin de rationaliser le nombre d'animaux utilisés et les analyses menées afin d'encore améliorer la pertinence des études pré-cliniques réalisées avec ces nouveaux médicaments de thérapie innovante.

La légitimité des études de toxicologie telles qu'actuellement menées se pose d'autant plus pour des stratégies de thérapie génique par saut d'exon. En effet, qu'elle soit modifiée chimiquement ou vectorisée dans un U7snRNA, la séquence antisens est le « principe actif » du produit clinique. Son efficacité, mais aussi sa toxicité sont, par définition, séquence- et espèce-dépendantes. Les études de toxicologie chez l'animal, quel que soit le modèle, ne sont donc pas adaptées à l'évaluation de la toxicité de ce genre de produit de thérapie génique.

Dans notre cas, ces études de toxicologie sont restées tout de même indispensables pour l'évaluation de la toxicité de la capside du vecteur AAVr-8, surtout au vu des doses que nous comptons administrer chez l'Homme (jusqu'à 5^e13 vg/kg). Mais nous avons également concentré nos efforts sur le développement d'autres tests, *in vitro* pour documenter la potentielle toxicité du transgène clinique U7snRNA-Jr53. En effet, les potentiels effets toxiques du transgène clinique doivent être caractérisés avant l'administration chez l'Homme. Nous avons, pour cela, développé une méthodologie d'analyses des off-targets spécifiques du U7snRNA-Jr53 par RNAseq dans des modèles *in vitro* humains. Nous pensons que des tests « tox-transgène » de ce genre devraient être mis au point sur des cellules humaines, voire des cellules de patients, pour chaque outil antisens de saut d'exon. Bien sûr cette méthodologie requiert des analyses standardisées et optimisées afin de réduire les biais et les temps d'analyses.

Ce genre d'analyses « tox-transgène » *in vitro*, rapides, peu coûteuses et pertinentes pourraient être réalisées à la place des études de toxicologie standards chez des modèles animaux pour chaque nouvelle séquence antisens qui serait à évaluer pour cibler d'autres points de mutations sur le gène *DMD* notamment. La thérapie génique par saut d'exon n'en serait qu'avantagée puisque cela permettrait considérablement de réduire les coûts de développement pré-clinique et de gagner du temps pour le développement de nouveaux produits cliniques afin d'en faire profiter les patients DMD portant différentes mutations génétiques.

BIBLIOGRAPHIE

- Aartsma-Rus, A. (2003). Therapeutic antisense-induced exon skipping in cultured muscle cells from six different DMD patients. *Hum. Mol. Genet.* 12, 907–914.
- Aartsma-Rus, A., Janson, A.A.M., Kaman, W.E., Bremmer-Bout, M., van Ommen, G.-J.B., den Dunnen, J.T., and van Deutekom, J.C.T. (2004). Antisense-induced multiexon skipping for Duchenne muscular dystrophy makes more sense. *Am. J. Hum. Genet.* 74, 83–92.
- Aartsma-Rus, A., De Winter, C.L., Janson, A.A.M., Kaman, W.E., Van Ommen, G.-J.B., Den Dunnen, J.T., and Van Deutekom, J.C.T. (2005). Functional analysis of 114 exon-internal AONs for targeted DMD exon skipping: indication for steric hindrance of SR protein binding sites. *Oligonucleotides* 15, 284–297.
- Aartsma-Rus, A., Van Deutekom, J.C.T., Fokkema, I.F., Van Ommen, G.-J.B., and Den Dunnen, J.T. (2006). Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: An overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule. *Muscle Nerve* 34, 135–144.
- Aartsma-Rus, A., van Vliet, L., Hirschi, M., Janson, A.A., Heemskerk, H., de Winter, C.L., de Kimpe, S., van Deutekom, J.C., 't Hoen, P.A., and van Ommen, G.-J.B. (2009). Guidelines for Antisense Oligonucleotide Design and Insight Into Splice-modulating Mechanisms. *Mol. Ther.* 17, 548–553.
- Aartsma-Rus, A., Houllberghs, H., van Deutekom, J.C.T., van Ommen, G.-J.B., and 't Hoen, P.A.C. (2010). Exonic sequences provide better targets for antisense oligonucleotides than splice site sequences in the modulation of Duchenne muscular dystrophy splicing. *Oligonucleotides* 20, 69–77.
- Acsadi, G., Dickson, G., Love, D.R., Jani, A., Walsh, F.S., Gurusinghe, A., Wolff, J.A., and Davies, K.E. (1991). Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 352, 815–818.
- Adams, M.E. (2001). In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4. *J. Cell Biol.* 155, 113–122.
- Ahn, K., Huh, J.-W., Park, S.-J., Kim, D.-S., Ha, H.-S., Kim, Y.-J., Lee, J.-R., Chang, K.-T., and Kim, H.-S. (2008). Selection of internal reference genes for SYBR green qRT-PCR studies of rhesus monkey (*Macaca mulatta*) tissues. *BMC Mol. Biol.* 9, 78.
- Aird, D., Ross, M.G., Chen, W.-S., Danielsson, M., Fennell, T., Russ, C., Jaffe, D.B., Nusbaum, C., and Gnirke, A. (2011). Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol* 12, R18.
- Alter, J., Lou, F., Rabinowitz, A., Yin, H., Rosenfeld, J., Wilton, S.D., Partridge, T.A., and Lu, Q.L. (2006). Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology. *Nat. Med.* 12, 175–177.
- Alwin, S., Gere, M., Guhl, E., Effertz, K., Barbasi, C., Segal, D., Weitzman, M., and Cathomen, T. (2005). Custom Zinc-Finger Nucleases for Use in Human Cells. *Mol. Ther.* 12, 610–617.
- Ananth, P., Goldsmith, G., and Yathindra, N. (2013). An innate twist between Crick's wobble and Watson-Crick base pairs. *RNA* 19, 1038–1053.
- Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* 11, R106.
- Anders, S., Reyes, A., and Huber, W. (2012). Detecting differential usage of exons from RNA-seq data. *Genome Res.* 22, 2008–2017.

- Aninat, C. (2005). Expression of cytochromes P450, conjugating enzymes and nuclear receptors in human hepatoma HepaRG cells. *Drug Metab. Dispos.* 34, 75–83.
- Aoki, Y., Yokota, T., Nagata, T., Nakamura, A., Tanihata, J., Saito, T., Duguez, S.M.R., Nagaraju, K., Hoffman, E.P., Partridge, T., et al. (2012). Bodywide skipping of exons 45-55 in dystrophic mdx52 mice by systemic antisense delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 13763–13768.
- Aoki, Y., Yokota, T., and Wood, M.J.A. (2013). Development of Multiexon Skipping Antisense Oligonucleotide Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. *BioMed Res. Int.* 2013, 1–8.
- Arechavala-Gomez, V., Graham, I.R., Popplewell, L.J., Adams, A.M., Aartsma-Rus, A., Kinali, M., Morgan, J.E., van Deutekom, J.C., Wilton, S.D., Dickson, G., et al. (2007). Comparative Analysis of Antisense Oligonucleotide Sequences for Targeted Skipping of Exon 51 During Dystrophin Pre-mRNA Splicing in Human Muscle. *Hum. Gene Ther.* 18, 798–810.
- Asokan, A., Conway, J.C., Phillips, J.L., Li, C., Hegge, J., Sinnott, R., Yadav, S., DiPrimio, N., Nam, H.-J., Agbandje-McKenna, M., et al. (2010). Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat. Biotechnol.* 28, 79–82.
- Asokan, A., Schaffer, D.V., and Jude Samulski, R. (2012). The AAV Vector Toolkit: Poised at the Clinical Crossroads. *Mol. Ther.* 20, 699–708.
- Asparuhova, M.B., Marti, G., Liu, S., Serhan, F., Trono, D., and Schümperli, D. (2007). Inhibition of HIV-1 multiplication by a modified U7 snRNA inducing Tat and Rev exon skipping. *J. Gene Med.* 9, 323–334.
- Atchison, R.W., Casto, B.C., and Hammon, W.M. (1965). Adenovirus-associated defective virus particles. *Science* 149, 754–755.
- Athanasopoulos, T., Graham, I.R., Foster, H., and Dickson, G. (2004). Recombinant adeno-associated viral (rAAV) vectors as therapeutic tools for Duchenne muscular dystrophy (DMD). *Gene Ther.* 11, S109–S121.
- Bachrach, E., Li, S., Perez, A.L., Schienda, J., Liadaki, K., Volinski, J., Flint, A., Chamberlain, J., and Kunkel, L.M. (2004). Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 3581–3586.
- Baillat, D., Hakimi, M.-A., Näär, A.M., Shilatifard, A., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear RNA Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of RNA Polymerase II. *Cell* 123, 265–276.
- Baralle, D. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J. Med. Genet.* 42, 737–748.
- Barbash, I.M., Cecchini, S., Faranesh, A.Z., Virag, T., Li, L., Yang, Y., Hoyt, R.F., Kornegay, J.N., Bogan, J.R., Garcia, L., et al. (2013). MRI roadmap-guided transendocardial delivery of exon-skipping recombinant adeno-associated virus restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther.* 20, 274–282.
- Bardoni, A., Felisari, G., Sironi, M., Comi, G., Lai, M., Robotti, M., and Bresolin, N. (2000). Loss of Dp140 regulatory sequences is associated with cognitive impairment in dystrophinopathies. *Neuromuscul. Disord.* NMD 10, 194–199.
- Barnea, E., Zuk, D., Simantov, R., Nudel, U., and Yaffe, D. (1990). Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron* 5, 881–888.
- Barthélémy, I., Barrey, E., Thibaud, J.-L., Uriarte, A., Voit, T., Blot, S., and Hogrel, J.-Y. (2009). Gait analysis using accelerometry in dystrophin-deficient dogs. *Neuromuscul. Disord.* 19, 788–796.

- Bartoli, M., Poupiot, J., Goyenvalle, A., Perez, N., Garcia, L., Danos, O., and Richard, I. (2006). Noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer in animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* 13, 20–28.
- Barton-Davis, E.R., Cordier, L., Shoturma, D.I., Leland, S.E., and Sweeney, H.L. (1999). Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J. Clin. Invest.* 104, 375–381.
- Basner-Tschakarjan, E., and Mingozzi, F. (2014). Cell-Mediated Immunity to AAV Vectors, Evolving Concepts and Potential Solutions. *Front. Immunol.* 5.
- Basner-Tschakarjan, E., Bijjiga, E., and Martino, A.T. (2014). Pre-Clinical Assessment of Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Front. Immunol.* 5.
- Bassi, E., Falzarano, S., Fabris, M., Gualandi, F., Merlini, L., Vattemi, G., Perrone, D., Marchesi, E., Sabatelli, P., Sparnacci, K., et al. (2012). Persistent Dystrophin Protein Restoration 90 Days after a Course of Intraperitoneally Administered Naked 2'OMePS AON and ZM2 NP-AON Complexes in mdx Mice. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–8.
- Bell, C.D., and Conen, P.E. (1968). Histopathological changes in Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 7, 529–544.
- Bell, P., Gao, G., Haskins, M.E., Wang, L., Sleeper, M., Wang, H., Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Chen, S.-J., Weisse, C., et al. (2011a). Evaluation of Adeno-Associated Viral Vectors for Liver-Directed Gene Transfer in Dogs. *Hum. Gene Ther.* 22, 985–997.
- Bell, P., Wang, L., Gao, G., Haskins, M.E., Tarantal, A.F., McCarter, R.J., Zhu, Y., Yu, H., and Wilson, J.M. (2011b). Inverse zonation of hepatocyte transduction with AAV vectors between mice and non-human primates. *Mol. Genet. Metab.* 104, 395–403.
- Benjamini, Y., and Speed, T.P. (2012). Summarizing and correcting the GC content bias in high-throughput sequencing. *Nucleic Acids Res.* 40, e72–e72.
- Bennett, C.F., and Swayze, E.E. (2010). RNA Targeting Therapeutics: Molecular Mechanisms of Antisense Oligonucleotides as a Therapeutic Platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50, 259–293.
- Bérout, C., Tuffery-Giraud, S., Matsuo, M., Hamroun, D., Humbertclaude, V., Monnier, N., Moizard, M.-P., Voelckel, M.-A., Calemard, L.M., Boisseau, P., et al. (2007). Multiexon skipping leading to an artificial DMD protein lacking amino acids from exons 45 through 55 could rescue up to 63% of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mutat.* 28, 196–202.
- Betts, C., Saleh, A.F., Arzumanov, A.A., Hammond, S.M., Godfrey, C., Coursindel, T., Gait, M.J., and Wood, M.J. (2012). Pip6-PMO, A New Generation of Peptide-oligonucleotide Conjugates With Improved Cardiac Exon Skipping Activity for DMD Treatment. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* 1, e38.
- Bevaart, L., Aalbers, C.J., Vierboom, M.P.M., Broekstra, N., Kondova, I., Breedveld, E., Hauck, B., Wright, J.F., Tak, P.P., and Vervoordeldonk, M.J. (2015). Safety, Biodistribution, and Efficacy of an AAV-5 Vector Encoding Human Interferon-Beta (ART-I02) Delivered via Intra-Articular Injection in Rhesus Monkeys with Collagen-Induced Arthritis. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 26, 103–112.
- Bish, L.T., Morine, K., Sleeper, M.M., Sanmiguel, J., Wu, D., Gao, G., Wilson, J.M., and Sweeney, H.L. (2008). Adeno-Associated Virus (AAV) Serotype 9 Provides Global Cardiac Gene Transfer Superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the Mouse and Rat. *Hum. Gene Ther.* 19, 1359–1368.
- Bish, L.T., Sleeper, M.M., Forbes, S.C., Wang, B., Reynolds, C., Singletary, G.E., Trafny, D., Morine, K.J., Sanmiguel, J., Cecchini, S., et al. (2012). Long-term Restoration of Cardiac Dystrophin Expression in Golden Retriever Muscular Dystrophy Following rAAV6-mediated Exon Skipping. *Mol. Ther.* 20, 580–589.

- Blake, D.J., and Kröger, S. (2000). The neurobiology of duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.* 23, 92–99.
- Blake, D.J., Weir, A., Newey, S.E., and Davies, K.E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol. Rev.* 82, 291–329.
- Blat, Y., and Blat, S. (2015). Drug Discovery of Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. *J. Biomol. Screen.* 1087057115586535.
- Blencowe, B.J. (2000). Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem. Sci.* 25, 106–110.
- Bogdanovich, S., Krag, T.O.B., Barton, E.R., Morris, L.D., Whittemore, L.-A., Ahima, R.S., and Khurana, T.S. (2002). Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade. *Nature* 420, 418–421.
- Boisguérin, P., Deshayes, S., Gait, M.J., O'Donovan, L., Godfrey, C., Betts, C.A., Wood, M.J.A., and Lebleu, B. (2015). Delivery of therapeutic oligonucleotides with cell penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 52–67.
- Bonati, U., Hafner, P., Schädelin, S., Schmid, M., Naduvilekoot Devasia, A., Schroeder, J., Zuesli, S., Pohlman, U., Neuhaus, C., Klein, A., et al. (2015). Quantitative muscle MRI: A powerful surrogate outcome measure in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 25, 679–685.
- Bonilla, E., Samitt, C.E., Miranda, A.F., Hays, A.P., Salviati, G., DiMauro, S., Kunkel, L.M., Hoffman, E.P., and Rowland, L.P. (1988). Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* 54, 447–452.
- Bostick, B., Shin, J.-H., Yue, Y., Wasala, N.B., Lai, Y., and Duan, D. (2012). AAV micro-dystrophin gene therapy alleviates stress-induced cardiac death but not myocardial fibrosis in >21-m-old mdx mice, an end-stage model of Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 53, 217–222.
- Bouard, D., Alazard-Dany, N., and Cosset, F.-L. (2009). Viral vectors: from virology to transgene expression: Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br. J. Pharmacol.* 157, 153–165.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M.F., and Masurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum. Gene Ther.* 21, 704–712.
- Bowles, D.E., McPhee, S.W., Li, C., Gray, S.J., Samulski, J.J., Camp, A.S., Li, J., Wang, B., Monahan, P.E., Rabinowitz, J.E., et al. (2012). Phase 1 Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy Using a Translational Optimized AAV Vector. *Mol. Ther.* 20, 443–455.
- Boyce, F.M., Beggs, A.H., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1991). Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 1276–1280.
- Brazeau, G.A., Mathew, M., and Entrikin, R.K. (1992). Serum and organ indices of the mdx dystrophic mouse. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 77, 179–189.
- Brenman, J.E., Chao, D.S., Xia, H., Aldape, K., and Bredt, D.S. (1995). Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 82, 743–752.
- Brun, C., Suter, D., Pauli, C., Dunant, P., Lochmüller, H., Burgunder, J.M., Schümperli, D., and Weis, J. (2003). U7 snRNAs induce correction of mutated dystrophin pre-mRNA by exon skipping. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 60, 557–566.

- Bulfield, G., Siller, W.G., Wight, P.A., and Moore, K.J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 1189–1192.
- Büning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadts-Humme, S., and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J. Gene Med.* *10*, 717–733.
- Burchard, J., Jackson, A.L., Malkov, V., Needham, R.H.V., Tan, Y., Bartz, S.R., Dai, H., Sachs, A.B., and Linsley, P.S. (2009). MicroRNA-like off-target transcript regulation by siRNAs is species specific. *RNA* *15*, 308–315.
- Burrow, K.L., Coover, D.D., Klein, C.J., Bulman, D.E., Kissel, J.T., Rammohan, K.W., Burghes, A.H., and Mendell, J.R. (1991). Dystrophin expression and somatic reversion in prednisone-treated and untreated Duchenne dystrophy. CIDD Study Group. *Neurology* *41*, 661–666.
- Bushby, K.M., and Gardner-Medwin, D. (1993). The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. I. Natural history. *J. Neurol.* *240*, 98–104.
- Bushby, K., Finkel, R., Wong, B., Barohn, R., Campbell, C., Comi, G.P., Connolly, A.M., Day, J.W., Flanigan, K.M., Goemans, N., et al. (2014). Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. *Muscle Nerve* *50*, 477–487.
- Buyse, G.M., Voit, T., Schara, U., Straathof, C.S., D'Angelo, M.G., Bernert, G., Cuisset, J.-M., Finkel, R.S., Goemans, N., McDonald, C.M., et al. (2015). Efficacy of idebenone on respiratory function in patients with Duchenne muscular dystrophy not using glucocorticoids (DELOS): a double-blind randomised placebo-controlled phase 3 trial. *The Lancet* *385*, 1748–1757.
- Byers, T.J., Lidov, H.G., and Kunkel, L.M. (1993). An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat. Genet.* *4*, 77–81.
- Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2013). Humoral Immune Response to AAV. *Front. Immunol.* *4*.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L.H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J.M. (2009). Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. *J. Infect. Dis.* *199*, 381–390.
- Capasso, C., Garofalo, M., Hirvinen, M., and Cerullo, V. (2014). The Evolution of Adenoviral Vectors through Genetic and Chemical Surface Modifications. *Viruses* *6*, 832–855.
- Cartegni, L. (2003). ESEfinder: a web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res.* *31*, 3568–3571.
- Cartegni, L., Chew, S.L., and Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 285–298.
- Cazzella, V., Martone, J., Pinnarò, C., Santini, T., Twayana, S.S., Sthandier, O., D'Amico, A., Ricotti, V., Bertini, E., Muntoni, F., et al. (2012). Exon 45 Skipping Through U1-snRNA Antisense Molecules Recovers the Dys-nNOS Pathway and Muscle Differentiation in Human DMD Myoblasts. *Mol. Ther.* *20*, 2134–2142.
- Cerletti, M., Negri, T., Cozzi, F., Colpo, R., Andreetta, F., Croci, D., Davies, K.E., Cornelio, F., Pozza, O., Karpati, G., et al. (2003). Dystrophic phenotype of canine X-linked muscular dystrophy is mitigated by adenovirus-mediated utrophin gene transfer. *Gene Ther.* *10*, 750–757.
- Chalmel, F., Lardenois, A., Evrard, B., Mathieu, R., Feig, C., Demougin, P., Gattiker, A., Schulze, W., Jegou, B., Kirchhoff, C., et al. (2012). Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. *Hum. Reprod.* *27*, 3233–3248.

- Chambers, M.C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D.L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., et al. (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 30, 918–920.
- Chan, J.H.P., Lim, S., and Wong, W.S.F. (2006). Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 33, 533–540.
- Chapman, V.M., Miller, D.R., Armstrong, D., and Caskey, C.T. (1989). Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 1292–1296.
- Chelly, J., Kaplan, J.C., Maire, P., Gautron, S., and Kahn, A. (1988). Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue. *Nature* 333, 858–860.
- Chen, S.-J., Sanmiguel, J., Lock, M., McMenamin, D., Draper, C., Limberis, M.P., Kassim, S.H., Somanathan, S., Bell, P., Johnston, J.C., et al. (2013a). Biodistribution of AAV8 Vectors Expressing Human Low-Density Lipoprotein Receptor in a Mouse Model of Homozygous Familial Hypercholesterolemia. *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 24, 154–160.
- Chen, X., Liu, P., and Chou, H.-H. (2013b). Whole-genome thermodynamic analysis reduces siRNA off-target effects. *PloS One* 8, e58326.
- Chen, Y., Zheng, Y., Kang, Y., Yang, W., Niu, Y., Guo, X., Tu, Z., Si, C., Wang, H., Xing, R., et al. (2015). Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum. Mol. Genet.*
- Cheng, B., Ling, C., Dai, Y., Lu, Y., Glushakova, L.G., Gee, S.W.Y., McGoogan, K.E., Aslanidi, G.V., Park, M., Stacpoole, P.W., et al. (2012). Development of optimized AAV3 serotype vectors: mechanism of high-efficiency transduction of human liver cancer cells. *Gene Ther.* 19, 375–384.
- Chicoine, L., Montgomery, C., Bremer, W., Shontz, K., Griffin, D., Heller, K., Lewis, S., Malik, V., Grose, W., Shilling, C., et al. (2014a). Plasmapheresis Eliminates the Negative Impact of AAV Antibodies on Microdystrophin Gene Expression Following Vascular Delivery. *Mol. Ther.* 22, 338–347.
- Chicoine, L.G., Rodino-Klapac, L.R., Shao, G., Xu, R., Bremer, W.G., Camboni, M., Golden, B., Montgomery, C.L., Shontz, K., Heller, K.N., et al. (2014b). Vascular Delivery of rAAVrh74.MCK.GALGT2 to the Gastrocnemius Muscle of the Rhesus Macaque Stimulates the Expression of Dystrophin and Laminin $\alpha 2$ Surrogates. *Mol. Ther.* 22, 713–724.
- Cho, S.W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H.S., Bae, S., and Kim, J.-S. (2014). Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.* 24, 132–141.
- Chun, J.L., O'Brien, R., and Berry, S.E. (2012). Cardiac dysfunction and pathology in the dystrophin and utrophin-deficient mouse during development of dilated cardiomyopathy. *Neuromuscul. Disord.* 22, 368–379.
- Cirak, S., Arechavala-Gomeza, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garraida, M.E., Bourke, J., Wells, D.J., et al. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet Lond. Engl.* 378, 595–605.
- Clark, K.R., Sferra, T.J., and Johnson, P.R. (1997). Recombinant adeno-associated viral vectors mediate long-term transgene expression in muscle. *Hum. Gene Ther.* 8, 659–669.
- Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1838, 635–642.

- Cooper, B.J., Winand, N.J., Stedman, H., Valentine, B.A., Hoffman, E.P., Kunkel, L.M., Scott, M.O., Fischbeck, K.H., Kornegay, J.N., and Avery, R.J. (1988). The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature* 334, 154–156.
- Cordero, F., Botta, M., and Calogero, R.A. (2008). Microarray data analysis and mining approaches. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* 6, 265–281.
- Cornu, T.I., Thibodeau-Beganny, S., Guhl, E., Alwin, S., Eichtinger, M., Joung, J., and Cathomen, T. (2008). DNA-binding Specificity Is a Major Determinant of the Activity and Toxicity of Zinc-finger Nucleases. *Mol. Ther.* 16, 352–358.
- Cradick, T.J., Ambrosini, G., Iseli, C., Bucher, P., and McCaffrey, A.P. (2011). ZFN-site searches genomes for zinc finger nuclease target sites and off-target sites. *BMC Bioinformatics* 12, 152.
- Cradick, T.J., Fine, E.J., Antico, C.J., and Bao, G. (2013). CRISPR/Cas9 systems targeting γ -globin and CCR5 genes have substantial off-target activity. *Nucleic Acids Res.* 41, 9584–9592.
- Crawford, G.E., Faulkner, J.A., Crosbie, R.H., Campbell, K.P., Froehner, S.C., and Chamberlain, J.S. (2000). Assembly of the dystrophin-associated protein complex does not require the dystrophin COOH-terminal domain. *J. Cell Biol.* 150, 1399–1410.
- Cuperlovic-Culf, M., Belacel, N., Culf, A.S., and Ouellette, R.J. (2006). Microarray analysis of alternative splicing. *Omics J. Integr. Biol.* 10, 344–357.
- Dane, A.P., Cunningham, S.C., Kok, C.Y., Logan, G.J., and Alexander, I.E. (2015). Transient suppression of hepatocellular replication in the mouse liver following transduction with recombinant adeno-associated virus. *Gene Ther.*
- Davies, K.E., Pearson, P.L., Harper, P.S., Murray, J.M., O'Brien, T., Sarfarazi, M., and Williamson, R. (1983). Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome. *Nucleic Acids Res.* 11, 2303–2312.
- De Angelis, F.G., Sthandier, O., Berarducci, B., Toso, S., Galluzzi, G., Ricci, E., Cossu, G., and Bozzoni, I. (2002). Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 9456–9461.
- Deconinck, A.E., Rafael, J.A., Skinner, J.A., Brown, S.C., Potter, A.C., Metzinger, L., Watt, D.J., Dickson, J.G., Tinsley, J.M., and Davies, K.E. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 90, 717–727.
- De Conti, L., Baralle, M., and Buratti, E. (2013). Exon and intron definition in pre-mRNA splicing. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4, 49–60.
- Del Gatto-Konczak, F., Olive, M., Gesnel, M.C., and Breathnach, R. (1999). hnRNP A1 recruited to an exon in vivo can function as an exon splicing silencer. *Mol. Cell. Biol.* 19, 251–260.
- Denti, M.A., Rosa, A., D'Antona, G., Sthandier, O., De Angelis, F.G., Nicoletti, C., Allocca, M., Pansarasa, O., Parente, V., Musarò, A., et al. (2006a). Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 3758–3763.
- Denti, M.A., Rosa, A., D'Antona, G., Sthandier, O., De Angelis, F.G., Nicoletti, C., Allocca, M., Pansarasa, O., Parente, V., Musarò, A., et al. (2006b). Chimeric adeno-associated virus/antisense U1 small nuclear RNA effectively rescues dystrophin synthesis and muscle function by local treatment of mdx mice. *Hum. Gene Ther.* 17, 565–574.

- Desguerre, I., Mayer, M., Leturcq, F., Barbet, J.-P., Gherardi, R.K., and Christov, C. (2009). Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 68, 762–773.
- van Deutekom, J.C., Bremmer-Bout, M., Janson, A.A., Ginjaar, I.B., Baas, F., den Dunnen, J.T., and van Ommen, G.J. (2001). Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells. *Hum. Mol. Genet.* 10, 1547–1554.
- van Deutekom, J.C., Janson, A.A., Ginjaar, I.B., Frankhuizen, W.S., Aartsma-Rus, A., Bremmer-Bout, M., den Dunnen, J.T., Koop, K., van der Kooi, A.J., Goemans, N.M., et al. (2007). Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051. *N. Engl. J. Med.* 357, 2677–2686.
- Dismuke, D., Tenenbaum, L., and Jude Samulski, R. (2013). Biosafety of recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr. Gene Ther.* 13, 434–452.
- Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., and Gingeras, T.R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29, 15–21.
- Dominski, Z., and Kole, R. (1993). Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8673–8677.
- Dominski, Z., Zheng, L.X., Sanchez, R., and Marzluff, W.F. (1999). Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3561–3570.
- Dominski, Z., Erkmann, J.A., Yang, X., Sánchez, R., and Marzluff, W.F. (2002). A novel zinc finger protein is associated with U7 snRNP and interacts with the stem-loop binding protein in the histone pre-mRNP to stimulate 3'-end processing. *Genes Dev.* 16, 58–71.
- Drachman, D.B., Toyka, K.V., and Myer, E. (1974). Prednisone in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Lond. Engl.* 2, 1409–1412.
- D'Souza, V.N., thi Man, N., Morris, G.E., Karges, W., Pillers, D.-A.M., and Ray, P.N. (1995). A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum. Mol. Genet.* 4, 837–842.
- Duan, D. (2001). Expanding AAV Packaging Capacity with Trans-splicing or Overlapping Vectors: A Quantitative Comparison. *Mol. Ther.* 4, 383–391.
- Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., Fisher, K.J., and Engelhardt, J.F. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* 72, 8568–8577.
- Duchenne, G.B., (1868). Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérotique. *Archives générales de médecine*, Paris.
- Dudley, R.W., Lu, Y., Gilbert, R., Matecki, S., Nalbantoglu, J., Petrof, B.J., and Karpati, G. (2004). Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Hum. Gene Ther.* 15, 145–156.
- Dupont, J.-B., Tournaire, B., Georger, C., Marolleau, B., Jeanson-Leh, L., Ledevin, M., Lindenbaum, P., Lecomte, E., Cogné, B., Dubreil, L., et al. (2015). Short-lived recombinant adeno-associated virus transgene expression in dystrophic muscle is associated with oxidative damage to transgene mRNA. *Mol. Ther. — Methods Clin. Dev.* 2, 15010.
- Eagle, M., Bourke, J., Bullock, R., Gibson, M., Mehta, J., Giddings, D., Straub, V., and Bushby, K. (2007). Managing Duchenne muscular dystrophy – The additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord.* 17, 470–475.

- Ebihara, S., Guibinga, G.H., Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Massie, B., Karpati, G., and Petrof, B.J. (2000). Differential effects of dystrophin and utrophin gene transfer in immunocompetent muscular dystrophy (mdx) mice. *Physiol. Genomics* 3, 133–144.
- Echigoya, Y., Aoki, Y., Miskew, B., Panesar, D., Touznik, A., Nagata, T., Tanihata, J., Nakamura, A., Nagaraju, K., and Yokota, T. (2015). Long-Term Efficacy of Systemic Multiexon Skipping Targeting Dystrophin Exons 45–55 With a Cocktail of Vivo-Morpholinos in Mdx52 Mice. *Mol. Ther. Acids* 4, e225.
- Eckenfelder, A., Tordo, J., Babbs, A., Davies, K.E., Goyenvall, A., and Danos, O. (2012). The Cellular Processing Capacity Limits the Amounts of Chimeric U7 snRNA Available for Antisense Delivery. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* 1, e31.
- Eghtesad, S., Zheng, H., Nakai, H., Epperly, M.W., and Clemens, P.R. (2010). Effects of irradiating adult mdx mice before full-length dystrophin cDNA transfer on host anti-dystrophin immunity. *Gene Ther.* 17, 1181–1190.
- Eiholzer, U., Boltshauser, E., Frey, D., Molinari, L., and Zachmann, M. (1988). Short stature: a common feature in Duchenne muscular dystrophy. *Eur. J. Pediatr.* 147, 602–605.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877–6888.
- Ellis, B.L., Hirsch, M.L., Barker, J.C., Connelly, J.P., Steininger, R.J., and Porteus, M.H. (2013). A survey of ex vivo/in vitro transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Viol. J.* 10, 74.
- Emery, A.E. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul. Disord.* 1, 19–29.
- Emery, A.E. (2002). The muscular dystrophies. *The Lancet* 359, 687–695.
- England, S.B., Nicholson, L.V., Johnson, M.A., Forrest, S.M., Love, D.R., Zubrzycka-Gaarn, E.E., Bulman, D.E., Harris, J.B., and Davies, K.E. (1990). Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature* 343, 180–182.
- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., Marks, D.S., and others (2004). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* 5, R1–R1.
- Errington, S.J., Mann, C.J., Fletcher, S., and Wilton, S.D. (2003). Target selection for antisense oligonucleotide induced exon skipping in the dystrophin gene. *J. Gene Med.* 5, 518–527.
- Ervasti, J.M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1772, 108–117.
- Escors, D., and Breckpot, K. (2010). Lentiviral Vectors in Gene Therapy: Their Current Status and Future Potential. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 58, 107–119.
- Evans, C.H., and Huard, J. (2015). Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system. *Nat. Rev. Rheumatol.* 11, 234–242.
- Ezzeddine, N., Chen, J., Waltenspiel, B., Burch, B., Albrecht, T., Zhuo, M., Warren, W.D., Marzluff, W.F., and Wagner, E.J. (2011). A Subset of *Drosophila* Integrator Proteins Is Essential for Efficient U7 snRNA and Spliceosomal snRNA 3'-End Formation. *Mol. Cell. Biol.* 31, 328–341.
- Fabb, S.A., Wells, D.J., Serpente, P., and Dickson, G. (2002). Adeno-associated virus vector gene transfer and sarcolemmal expression of a 144 kDa micro-dystrophin effectively restores the dystrophin-associated protein complex and inhibits myofibre degeneration in nude/mdx mice. *Hum. Mol. Genet.* 11, 733–741.

- Fan, Z., Kocis, K., Valley, R., Howard, J.F., Chopra, M., An, H., Lin, W., Muenzer, J., and Powers, W. (2012). Safety and Feasibility of High-pressure Transvenous Limb Perfusion With 0.9% Saline in Human Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 20, 456–461.
- Fan, Z., Kocis, K., Valley, R., Howard, J., Chopra, M., Chen, Y., An, H., Lin, W., Muenzer, J., and Powers, W. (2015). High-pressure Transvenous Perfusion of the Upper Extremity in Human Muscular Dystrophy: A Safety Study with 0.9% Saline. *Hum. Gene Ther.*
- Fanin, M., Danieli, G.A., Cadaldini, M., Miorin, M., Vitiello, L., and Angelini, C. (1995). Dystrophin-positive fibers in Duchenne dystrophy: origin and correlation to clinical course. *Muscle Nerve* 18, 1115–1120.
- Farini, A., Razini, P., Erratico, S., Torrente, Y., and Meregalli, M. (2009). Cell based therapy for duchenne muscular dystrophy. *J. Cell. Physiol.* 221, 526–534.
- Feener, C.A., Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1989). Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature* 338, 509–511.
- Feng, H., Qin, Z., and Zhang, X. (2013). Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq. *Cancer Lett.* 340, 179–191.
- Ferlini, A., Sabatelli, P., Fabris, M., Bassi, E., Falzarano, S., Vattei, G., Perrone, D., Gualandi, F., Maraldi, N.M., Merlini, L., et al. (2010). Dystrophin restoration in skeletal, heart and skin arrector pili smooth muscle of mdx mice by ZM2 NP-AON complexes. *Gene Ther.* 17, 432–438.
- Ferreira, V., Twisk, J., Kwikkers, K., Aronica, E., Brisson, D., Methot, J., Petry, H., and Gaudet, D. (2014). Immune Responses to Intramuscular Administration of Alipogene Tiparvovec (AAV1-LPL^{S447X}) in a Phase II Clinical Trial of Lipoprotein Lipase Deficiency Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 25, 180–188.
- Finkel, R.S., Flanigan, K.M., Wong, B., Bönnemann, C., Sampson, J., Sweeney, H.L., Reha, A., Northcutt, V.J., Elfving, G., Barth, J., et al. (2013). Phase 2a Study of Ataluren-Mediated Dystrophin Production in Patients with Nonsense Mutation Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE* 8, e81302.
- Finotello, F., Lavezzo, E., Bianco, L., Barzon, L., Mazzon, P., Fontana, P., Toppo, S., and Di Camillo, B. (2014). Reducing bias in RNA sequencing data: a novel approach to compute counts. *BMC Bioinformatics* 15, S7.
- Finsterer, J., Stöllberger, C., Blazek, G., Kunafer, M., and Prager, E. (2007). Cardiac involvement over 10 years in myotonic and Becker muscular dystrophy and mitochondrial disorder. *Int. J. Cardiol.* 119, 176–184.
- Fisette, J.-F., Toutant, J., Dugre-Brisson, S., Desgroseillers, L., and Chabot, B. (2010). hnRNP A1 and hnRNP H can collaborate to modulate 5' splice site selection. *RNA* 16, 228–238.
- Flanagan, W.M., Kothavale, A., and Wagner, R.W. (1996). Effects of oligonucleotide length, mismatches and mRNA levels on C-5 propyne-modified antisense potency. *Nucleic Acids Res.* 24, 2936–2941.
- Flanigan, K.M., Dunn, D.M., von Niederhausern, A., Howard, M.T., Mendell, J., Connolly, A., Saunders, C., Modrcin, A., Dasouki, M., Comi, G.P., et al. (2009). DMD Trp3X nonsense mutation associated with a founder effect in North American families with mild Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 19, 743–748.
- Flanigan, K.M., Campbell, K., Violette, L., Wang, W., Gomez, A.M., Walker, C.M., and Mendell, J.R. (2013). Anti-Dystrophin T Cell Responses in Duchenne Muscular Dystrophy: Prevalence and a Glucocorticoid Treatment Effect. *Hum. Gene Ther.* 24, 797–806.
- Flotte, T.R., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Calcedo, R., Rouhani, F., Campbell-Thompson, M., Yachnis, A.T., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., et al. (2011). Phase 2 Clinical Trial of a Recombinant Adeno-Associated Viral Vector Expressing α_1 -Antitrypsin: Interim Results. *Hum. Gene Ther.* 22, 1239–1247.

- Foster, H., Sharp, P.S., Athanasopoulos, T., Trollet, C., Graham, I.R., Foster, K., Wells, D.J., and Dickson, G. (2008). Codon and mRNA Sequence Optimization of Microdystrophin Transgenes Improves Expression and Physiological Outcome in Dystrophic mdx Mice Following AAV2/8 Gene Transfer. *Mol. Ther.* 16, 1825–1832.
- Foster, K., Graham, I.R., Otto, A., Foster, H., Trollet, C., Yaworsky, P.J., Walsh, F.S., Bickham, D., Curtin, N.A., Kavar, S.L., et al. (2009). Adeno-Associated Virus-8-Mediated Intravenous Transfer of Myostatin Propeptide Leads to Systemic Functional Improvements of Slow but Not Fast Muscle. *Rejuvenation Res.* 12, 85–94.
- Francke, U., Ochs, H.D., de Martinville, B., Giacalone, J., Lindgren, V., Distèche, C., Pagon, R.A., Hofker, M.H., van Ommen, G.-J.B., Pearson, P.L., et al. (1985). Minor Xp21 chromosome deletion in a male associated with expression of Duchenne muscular dystrophy, chronic granulomatous disease, retinitis pigmentosa, and McLeod syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 37, 250.
- Frazier, K.S. (2015). Antisense Oligonucleotide Therapies: The Promise and the Challenges from a Toxicologic Pathologist's Perspective. *Toxicol. Pathol.* 43, 78–89.
- Friedmann, T., and Roblin, R. (1972). Gene therapy for human genetic disease? *Science* 175, 949–955.
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., and Sander, J.D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat. Biotechnol.* 31, 822–826.
- Furger, A., Schaller, A., and Schümperli, D. (1998). Functional importance of conserved nucleotides at the histone RNA 3' processing site. *RNA N. Y. N* 4, 246–256.
- Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J.C., Genovese, P., Kaeppl, C., Nowrouzi, A., Bartholomae, C.C., Wang, J., Friedman, G., et al. (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 29, 816–823.
- Gagnon, K.T., Li, L., Janowski, B.A., and Corey, D.R. (2014). Analysis of nuclear RNA interference in human cells by subcellular fractionation and Argonaute loading. *Nat. Protoc.* 9, 2045–2060.
- Gaj, T., Guo, J., Kato, Y., Sirk, S.J., and Barbas, C.F. (2012). Targeted gene knockout by direct delivery of zinc-finger nuclease proteins. *Nat. Methods* 9, 805–807.
- Galibert, L., and Merten, O.-W. (2011). Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. *J. Invertebr. Pathol.* 107, S80–S93.
- Galli, G., Hofstetter, H., Stunnenberg, H.G., and Birnstiel, M.L. (1983). Biochemical complementation with RNA in the *Xenopus* oocyte: a small RNA is required for the generation of 3' histone mRNA termini. *Cell* 34, 823–828.
- Galvagni, F. (2002). The Utrophin Gene Is Transcriptionally Up-regulated in Regenerating Muscle. *J. Biol. Chem.* 277, 19106–19113.
- Gamazon, E.R., and Stranger, B.E. (2014). Genomics of alternative splicing: evolution, development and pathophysiology. *Hum. Genet.* 133, 679–687.
- Gao, L., Fang, Z., Zhang, K., Zhi, D., and Cui, X. (2011). Length bias correction for RNA-seq data in gene set analyses. *Bioinformatics* 27, 662–669.
- Gardner-Medwin, D. (1980). Clinical features and classification of the muscular dystrophies. *Br. Med. Bull.* 36, 109–116.

- Gaudet, D., de Wal, J., Tremblay, K., Déry, S., van Deventer, S., Freidig, A., Brisson, D., and Méthot, J. (2010). Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Atheroscler. Suppl.* 11, 55–60.
- Gedicke-Hornung, C., Behrens-Gawlik, V., Reischmann, S., Geertz, B., Stimpel, D., Weinberger, F., Schlossarek, S., Précigout, G., Braren, I., Eschenhagen, T., et al. (2013). Rescue of cardiomyopathy through U7snRNA-mediated exon skipping in *Mybpc3* -targeted knock-in mice: U7snRNA-based exon skipping in a HCM mouse model. *EMBO Mol. Med.* 5, 1128–1145.
- Geib, T., and Hertel, K.J. (2009). Restoration of Full-Length SMN Promoted by Adenoviral Vectors Expressing RNA Antisense Oligonucleotides Embedded in U7 snRNAs. *PLoS ONE* 4, e8204.
- Gernoux, G., Guilbaud, M., Dubreil, L., Larcher, T., Babarit, C., Ledevin, M., Jaulin, N., Planel, P., Moullier, P., and Adjali, O. (2015). Early Interaction of Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vector with the Host Immune System Following Intramuscular Delivery Results in Weak but Detectable Lymphocyte and Dendritic Cell Transduction. *Hum. Gene Ther.* 26, 1–13.
- Ghosh, A., Yue, Y., Lai, Y., and Duan, D. (2008). A Hybrid Vector System Expands Adeno-associated Viral Vector Packaging Capacity in a Transgene-independent Manner. *Mol. Ther.* 16, 124–130.
- Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Petrof, B.J., Ebihara, S., Guibinga, G.H., Tinsley, J.M., Kamen, A., Massie, B., Davies, K.E., and Karpati, G. (1999). Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Hum. Gene Ther.* 10, 1299–1310.
- Gilmartin, G.M., Schaufele, F., Schaffner, G., and Birnstiel, M.L. (1988). Functional analysis of the sea urchin U7 small nuclear RNA. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1076–1084.
- Gloss, B.S., and Dinger, M.E. (2015). The specificity of long noncoding RNA expression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.*
- Glushakova, L.G., Lisankie, M.J., Eruslanov, E.B., Ojano-Dirain, C., Zolotukhin, I., Liu, C., Srivastava, A., and Stacpoole, P.W. (2009). AAV3-mediated transfer and expression of the pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit gene causes metabolic remodeling and apoptosis of human liver cancer cells. *Mol. Genet. Metab.* 98, 289–299.
- Goemans, N., and Buyse, G. (2014). Current Treatment and Management of Dystrophinopathies. *Curr. Treat. Options Neurol.* 16.
- Goemans, N., Klingels, K., van den Hauwe, M., Boons, S., Verstraete, L., Peeters, C., Feys, H., and Buyse, G. (2013). Six-Minute Walk Test: Reference Values and Prediction Equation in Healthy Boys Aged 5 to 12 Years. *PLoS ONE* 8, e84120.
- Goemans, N.M., Tulinius, M., van den Akker, J.T., Burm, B.E., Ekhardt, P.F., Heuvelmans, N., Holling, T., Janson, A.A., Platenburg, G.J., Sipkens, J.A., et al. (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 364, 1513–1522.
- Goncalves, M.A. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virol J* 2, 517–534.
- Górecki, D.C., Monaco, A.P., Derry, J.M., Walker, A.P., Barnard, E.A., and Barnard, P.J. (1992). Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum. Mol. Genet.* 1, 505–510.
- Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schümperli, D., and Kole, R. (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 4929–4934.

- Gorman, L., Mercatante, D.R., and Kole, R. (2000). Restoration of Correct Splicing of Thalassemic α -Globin Pre-mRNA by Modified U1 snRNAs. *J. Biol. Chem.* 275, 35914–35919.
- Goudemant, J.F., Deconinck, N., Tinsley, J.M., Demeure, R., Robert, A., Davies, K.E., and Gillis, J.M. (1998). Expression of truncated utrophin improves pH recovery in exercising muscles of dystrophic mdx mice: a ^{31}P NMR study. *Neuromuscul. Disord.* 8, 371–379.
- Goyenvallé, A. (2004). Rescue of Dystrophic Muscle Through U7 snRNA-Mediated Exon Skipping. *Science* 306, 1796–1799.
- Goyenvallé, A., Babbs, A., van Ommen, G.-J.B., Garcia, L., and Davies, K.E. (2009). Enhanced Exon-skipping Induced by U7 snRNA Carrying a Splicing Silencer Sequence: Promising Tool for DMD Therapy. *Mol. Ther.* 17, 1234–1240.
- Goyenvallé, A., Seto, J.T., Davies, K.E., and Chamberlain, J. (2011). Therapeutic approaches to muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* doi:10.1093/hmg/ddr105.
- Goyenvallé, A., Babbs, A., Wright, J., Wilkins, V., Powell, D., Garcia, L., and Davies, K.E. (2012a). Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.* 21, 2559–2571.
- Goyenvallé, A., Wright, J., Babbs, A., Wilkins, V., Garcia, L., and Davies, K.E. (2012b). Engineering Multiple U7snRNA Constructs to Induce Single and Multiexon-skipping for Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 20, 1212–1221.
- Grau, J., Boch, J., and Posch, S. (2013). TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction. *Bioinformatics* 29, 2931–2932.
- Gregorevic, P., Blankinship, M.J., Allen, J.M., Crawford, R.W., Meuse, L., Miller, D.G., Russell, D.W., and Chamberlain, J.S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* 10, 828–834.
- Gregorevic, P., Allen, J.M., Minami, E., Blankinship, M.J., Haraguchi, M., Meuse, L., Finn, E., Adams, M.E., Froehner, S.C., Murry, C.E., et al. (2006). rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat. Med.* 12, 787–789.
- Gregorevic, P., Schultz, B.R., Allen, J.M., Halldorson, J.B., Blankinship, M.J., Meznarich, N.A., Kuhr, C.S., Doremus, C., Finn, E., Liggitt, D., et al. (2009). Evaluation of Vascular Delivery Methodologies to Enhance rAAV6-mediated Gene Transfer to Canine Striated Musculature. *Mol. Ther.* 17, 1427–1433.
- Grieger, J.C., and Samulski, R.J. (2012). Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing, and Clinical Applications. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 229–254.
- Grimm, C., Stefanovic, B., and Schümperli, D. (1993). The low abundance of U7 snRNA is partly determined by its Sm binding site. *EMBO J.* 12, 1229–1238.
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15655–15660.
- Grobet, L., Martin, L.J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménéssier, F., Massabanda, J., et al. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Genet.* 17, 71–74.

- Guenther, C.M., Kuypers, B.E., Lam, M.T., Robinson, T.M., Zhao, J., and Suh, J. (2014). Synthetic virology: engineering viruses for gene delivery: Synthetic viruses for gene delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 6, 548–558.
- Guilinger, J.P., Pattanayak, V., Reyon, D., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Joung, J.K., and Liu, D.R. (2014). Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity. *Nat. Methods* 11, 429–435.
- Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F., and Guguen-Guillouzo, C. (2007). The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* 168, 66–73.
- Guiraud, S., Squire, S.E., Edwards, B., Chen, H., Burns, D.T., Shah, N., Babbs, A., Davies, S.G., Wynne, G.M., Russell, A.J., et al. (2015). Second-generation compound for the modulation of utrophin in the therapy of DMD. *Hum. Mol. Genet.* 24, 4212–4224.
- Gupta, A., Meng, X., Zhu, L.J., Lawson, N.D., and Wolfe, S.A. (2011). Zinc finger protein-dependent and -independent contributions to the in vivo off-target activity of zinc finger nucleases. *Nucleic Acids Res.* 39, 381–392.
- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415–419.
- Haidet, A.M., Rizo, L., Handy, C., Umapathi, P., Eagle, A., Shilling, C., Boue, D., Martin, P.T., Sahenk, Z., Mendell, J.R., et al. (2008). Long-term enhancement of skeletal muscle mass and strength by single gene administration of myostatin inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4318–4322.
- Hammond, S.M., and Wood, M.J.A. (2011). Genetic therapies for RNA mis-splicing diseases. *Trends Genet.* 27, 196–205.
- Handa, A., Muramatsu, S., Qiu, J., Mizukami, H., and Brown, K.E. (2000). Adeno-associated virus (AAV)-3-based vectors transduce haematopoietic cells not susceptible to transduction with AAV-2-based vectors. *J. Gen. Virol.* 81, 2077–2084.
- Hansen, K.D., Brenner, S.E., and Dudoit, S. (2010). Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Res.* 38, e131–e131.
- Harding, P.L., Fall, A.M., Honeyman, K., Fletcher, S., and Wilton, S.D. (2007). The Influence of Antisense Oligonucleotide Length on Dystrophin Exon Skipping. *Mol. Ther.* 15, 157–166.
- Harper, S.Q., Hauser, M.A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R.W., Phelps, S.F., Harper, H.A., Robinson, A.S., Engelhardt, J.F., Brooks, S.V., et al. (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* 8, 253–261.
- Harris, M.E., Böhni, R., Schneiderman, M.H., Ramamurthy, L., Schümperli, D., and Marzluff, W.F. (1991). Regulation of histone mRNA in the unperturbed cell cycle: evidence suggesting control at two posttranscriptional steps. *Mol. Cell. Biol.* 11, 2416–2424.
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J.M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B.L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., et al. (2012). GENCODE: The reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* 22, 1760–1774.
- Haurigot, V., Mingozzi, F., Buchlis, G., Hui, D.J., Chen, Y., Basner-Tschakarjan, E., Arruda, V.R., Radu, A., Franck, H.G., Wright, J.F., et al. (2010). Safety of AAV Factor IX Peripheral Transvenular Gene Delivery to Muscle in Hemophilia B Dogs. *Mol. Ther.* 18, 1318–1329.

- Havens, M.A., Duelli, D.M., and Hastings, M.L. (2013). Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 4, 247–266.
- Heemskerk, H.A., de Winter, C.L., de Kimpe, S.J., van Kuik-Romeijn, P., Heuvelmans, N., Platenburg, G.J., van Ommen, G.-J.B., van Deutekom, J.C.T., and Aartsma-Rus, A. (2009). *In vivo* comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping. *J. Gene Med.* 11, 257–266.
- Hendriksen, R.G.F., Hoogland, G., Schipper, S., Hendriksen, J.G.M., Vles, J.S.H., and Aalbers, M.W. (2015). A possible role of dystrophin in neuronal excitability: A review of the current literature. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 51, 255–262.
- Hernandez, N. (2001). Small Nuclear RNA Genes: a Model System to Study Fundamental Mechanisms of Transcription. *J. Biol. Chem.* 276, 26733–26736.
- Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C.S., Gao, Q., Cassady, J.P., Cost, G.J., Zhang, L., Santiago, Y., Miller, J.C., et al. (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat. Biotechnol.* 29, 731–734.
- Hoffman, E.P., and McNally, E.M. (2014). Exon-skipping therapy: a roadblock, detour, or bump in the road? *Sci. Transl. Med.* 6, 230fs14.
- Hoffman, E.P., Brown, R.H., and Kunkel, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919–928.
- Hoffman, E.P., Fischbeck, K.H., Brown, R.H., Johnson, M., Medori, R., Loike, J.D., Harris, J.B., Waterston, R., Brooke, M., and Specht, L. (1988). Characterization of dystrophin in muscle-biopsy specimens from patients with Duchenne's or Becker's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 318, 1363–1368.
- Hoffman, E.P., Morgan, J.E., Watkins, S.C., and Partridge, T.A. (1990). Somatic reversion/suppression of the mouse mdx phenotype in vivo. *J. Neurol. Sci.* 99, 9–25.
- Holder, E., Maeda, M., and Bies, R.D. (1996). Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. *Hum. Genet.* 97, 232–239.
- Hoogaars, W.M.H., Mouisel, E., Pasternack, A., Hulmi, J.J., Relizani, K., Schuelke, M., Schirwis, E., Garcia, L., Ritvos, O., Ferry, A., et al. (2012). Combined Effect of AAV-U7-Induced Dystrophin Exon Skipping and Soluble Activin Type IIB Receptor in mdx Mice. *Hum. Gene Ther.* 23, 1269–1279.
- Hoogerwaard, E.M., Van der Wouw, P.A., Wilde, A.A.M., Bakker, E., Ippel, P.F., Oosterwijk, J.C., Majoor-Krakauer, D.F., van Essen, A.J., Leschot, N.J., and de Visser, M. (1999). Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 9, 347–351.
- Hooper, J.E. (2014). A survey of software for genome-wide discovery of differential splicing in RNA-Seq data. *Hum. Genomics* 8, 3.
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 31, 827–832.
- Hugnot, J.P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G.E., Monaco, A.P., Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Kaplan, J.C., and Kahn, A. (1992). Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7506–7510.

- Humbert, O., Davis, L., and Maizels, N. (2012). Targeted gene therapies: tools, applications, optimization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 47, 264–281.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Hood, L. (2001). Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292, 929–934.
- Incitti, T., De Angelis, F.G., Cazzella, V., Sthandier, O., Pinnarò, C., Legnini, I., and Bozzoni, I. (2010). Exon Skipping and Duchenne Muscular Dystrophy Therapy: Selection of the Most Active U1 snRNA Antisense Able to Induce Dystrophin Exon 51 Skipping. *Mol. Ther.* 18, 1675–1682.
- Jackson, A.L. (2006). Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12, 1179–1187.
- Jackson, A.L., and Linsley, P.S. (2010). Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 57–67.
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G., and Linsley, P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21, 635–637.
- Jacobs, F., Gordts, S., Muthuramu, I., and De Geest, B. (2012). The Liver as a Target Organ for Gene Therapy: State of the Art, Challenges, and Future Perspectives. *Pharmaceuticals* 5, 1372–1392.
- Jacobs, P.A., Hunt, P.A., Mayer, M., and Bart, R.D. (1981). Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosomal translocation: Further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am. J. Hum. Genet.* 33, 513.
- Jager, L., and Ehrhardt, A. (2009). Persistence of high-capacity adenoviral vectors as replication-defective monomeric genomes in vitro and in murine liver. *Hum. Gene Ther.* 20, 883–896.
- Jawdekar, G., and Henry, R. (2008). Transcriptional regulation of human small nuclear RNA genes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1779, 295–305.
- Jay, V., and Vajsar, J. (2001). The dystrophy of Duchenne. *The Lancet* 357, 550–552.
- Jensen, N.M., Dalsgaard, T., Jakobsen, M., Nielsen, R.R., Sorensen, C.B., Bolund, L., and Jensen, T.G. (2011). An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms. *J Biomed Sci* 18.
- Jessup, M., Greenberg, B., Mancini, D., Cappola, T., Pauly, D.F., Jaski, B., Yaroshinsky, A., Zsebo, K.M., Dittrich, H., Hajjar, R.J., et al. (2011). Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Patients With Advanced Heart Failure. *Circulation* 124, 304–313.
- Jiang, H., and Salzman, J. (2013). A penalized likelihood approach for robust estimation of isoform expression. *ArXiv Prepr. ArXiv13100379*.
- Jiang, Z., Schiedner, G., Gilchrist, S.C., Kochanek, S., and Clemens, P.R. (2004). CTLA4Ig delivered by high-capacity adenoviral vector induces stable expression of dystrophin in mdx mouse muscle. *Gene Ther.* 11, 1453–1461.
- John, B., Enright, A.J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2004). Human MicroRNA Targets. *PLoS Biol.* 2, e363.
- Johnson, F.B., Ozer, H.L., and Hoggan, M.D. (1971). Structural proteins of adenovirus-associated virus type 3. *J. Virol.* 8, 860–863.

- Juillerat, A., Dubois, G., Valton, J., Thomas, S., Stella, S., Marechal, A., Langevin, S., Benomari, N., Bertonati, C., Silva, G.H., et al. (2014). Comprehensive analysis of the specificity of transcription activator-like effector nucleases. *Nucleic Acids Res.* 42, 5390–5402.
- Kanebratt, K.P., and Andersson, T.B. (2008). Evaluation of HepaRG Cells as an in Vitro Model for Human Drug Metabolism Studies. *Drug Metab. Dispos.* 36, 1444–1452.
- Karpati, G., Carpenter, S., Morris, G.E., Davies, K.E., Guerin, C., and Holland, P. (1993). Localization and quantitation of the chromosome 6-encoded dystrophin-related protein in normal and pathological human muscle. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 52, 119–128.
- Kass, S., Tyc, K., Steitz, J.A., and Sollner-Webb, B. (1990). The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing. *Cell* 60, 897–908.
- Keil, J.M., Seo, J., Howell, M.D., Hsu, W.H., Singh, R.N., and DiDonato, C.J. (2014). A Short Antisense Oligonucleotide Ameliorates Symptoms of Severe Mouse Models of Spinal Muscular Atrophy. *Mol. Ther. Acids* 3, e174.
- Kendall, G.C., Mokhonova, E.I., Moran, M., Sejbuk, N.E., Wang, D.W., Silva, O., Wang, R.T., Martinez, L., Lu, Q.L., Damoiseaux, R., et al. (2012). Dantrolene Enhances Antisense-Mediated Exon Skipping in Human and Mouse Models of Duchenne Muscular Dystrophy. *Sci. Transl. Med.* 4, 164ra160–ra164ra160.
- Kerr, T.P., Sewry, C.A., Robb, S.A., and Roberts, R.G. (2001). Long mutant dystrophins and variable phenotypes: evasion of nonsense-mediated decay? *Hum. Genet.* 109, 402–407.
- Khurana, T.S., Watkins, S.C., Chafey, P., Chelly, J., Tomé, F.M., Fardeau, M., Kaplan, J.C., and Kunkel, L.M. (1991). Immunolocalization and developmental expression of dystrophin related protein in skeletal muscle. *Neuromuscul. Disord.* 1, 185–194.
- Kim, S., Kim, D., Cho, S.W., Kim, J., and Kim, J.-S. (2014). Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24, 1012–1019.
- Kinali, M., Arechavala-Gomez, V., Feng, L., Cirak, S., Hunt, D., Adkin, C., Guglieri, M., Ashton, E., Abbs, S., Nihoyannopoulos, P., et al. (2009). Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet Neurol.* 8, 918–928.
- Kingston, H.M., Thomas, N.S., Pearson, P.L., Sarfarazi, M., and Harper, P.S. (1983). Genetic linkage between Becker muscular dystrophy and a polymorphic DNA sequence on the short arm of the X chromosome. *J. Med. Genet.* 20, 255–258.
- Kingston, H.M., Sarfarazi, M., Thomas, N.S.T., and Harper, P.S. (1984). Localisation of the Becker muscular dystrophy gene on the short arm of the X chromosome by linkage to cloned DNA sequences. *Hum. Genet.* 67, 6–17.
- Kiss, T. (2004). Biogenesis of small nuclear RNPs. *J. Cell Sci.* 117, 5949–5951.
- Klein, C.J., Coovert, D.D., Bulman, D.E., Ray, P.N., Mendell, J.R., and Burghes, A.H. (1992). Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers. *Am. J. Hum. Genet.* 50, 950.
- Klymiuk, N., Blutke, A., Graf, A., Krause, S., Burkhardt, K., Wuensch, A., Krebs, S., Kessler, B., Zakhartchenko, V., Kurome, M., et al. (2013). Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4368–4382.

- Koenig, M., and Kunkel, L.M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J. Biol. Chem.* 265, 4560–4566.
- Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50, 509–517.
- Koenig, M., Monaco, A.P., and Kunkel, L.M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* 53, 219–228.
- Kole, R., and Krieg, A.M. (2015). Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 87, 104–107.
- Kole, R., Krainer, A.R., and Altman, S. (2012). RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.*
- Koo, T., and Wood, M.J. (2013). Clinical Trials Using Antisense Oligonucleotides in Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 24, 479–488.
- Koo, T., Malerba, A., Athanasopoulos, T., Trollet, C., Boldrin, L., Ferry, A., Popplewell, L., Foster, H., Foster, K., and Dickson, G. (2011a). Delivery of AAV2/9-Microdystrophin Genes Incorporating Helix 1 of the Coiled-Coil Motif in the C-Terminal Domain of Dystrophin Improves Muscle Pathology and Restores the Level of $\alpha 1$ -Syntrophin and α -Dystrobrevin in Skeletal Muscles of *mdx* Mice. *Hum. Gene Ther.* 22, 1379–1388.
- Koo, T., Okada, T., Athanasopoulos, T., Foster, H., Takeda, S. 'ichi, and Dickson, G. (2011b). Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog: AAV2/8 expressing microdystrophin in CXMDj dog muscles. *J. Gene Med.* 13, 497–506.
- Koo, T., Popplewell, L., Athanasopoulos, T., and Dickson, G. (2014). Triple Trans-Splicing Adeno-Associated Virus Vectors Capable of Transferring the Coding Sequence for Full-Length Dystrophin Protein into Dystrophic Mice. *Hum. Gene Ther.* 25, 98–108.
- Koo, T., Lee, J., and Kim, J.-S. (2015). Measuring and Reducing Off-Target Activities of Programmable Nucleases Including CRISPR-Cas9. *Mol. Cells* 38, 475–481.
- Kornegay, J.N., Tuler, S.M., Miller, D.M., and Levesque, D.C. (1988). Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* 11, 1056–1064.
- Kornegay, J.N., Li, J., Bogan, J.R., Bogan, D.J., Chen, C., Zheng, H., Wang, B., Qiao, C., Howard, J.F., and Xiao, X. (2010). Widespread Muscle Expression of an AAV9 Human Mini-dystrophin Vector After Intravenous Injection in Neonatal Dystrophin-deficient Dogs. *Mol. Ther.* 18, 1501–1508.
- Kornegay, J.N., Bogan, J.R., Bogan, D.J., Childers, M.K., Li, J., Nghiem, P., Detwiler, D.A., Larsen, C.A., Grange, R.W., Bhavaraju-Sanka, R.K., et al. (2012). Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm. Genome* 23, 85–108.
- Kornegay, J.N., Spurney, C.F., Nghiem, P.P., Brinkmeyer-Langford, C.L., Hoffman, E.P., and Nagaraju, K. (2014). Pharmacologic Management of Duchenne Muscular Dystrophy: Target Identification and Preclinical Trials. *ILAR J.* 55, 119–149.
- Kota, J., Handy, C.R., Haidet, A.M., Montgomery, C.L., Eagle, A., Rodino-Klapac, L.R., Tucker, D., Shilling, C.J., Therlfall, W.R., Walker, C.M., et al. (2009). Follistatin Gene Delivery Enhances Muscle Growth and Strength in Nonhuman Primates. *Sci. Transl. Med.* 1, 6ra15–ra16ra15.
- Kotin, R.M. (2011). Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Mol. Genet.* 20, R2–R6.

- Kotin, R.M., Siniscalco, M., Samulski, R.J., Zhu, X.D., Hunter, L., Laughlin, C.A., McLaughlin, S., Muzyczka, N., Rocchi, M., and Berns, K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 2211–2215.
- Kotterman, M.A., and Schaffer, D.V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nat. Rev. Genet.* 15, 445–451.
- Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Middlesworth, W., Ochs, H.D., and Latt, S.A. (1985). Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 4778–4782.
- Kurreck, J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* 270, 1628–1644.
- Lai, Y., Yue, Y., Liu, M., Ghosh, A., Engelhardt, J.F., Chamberlain, J.S., and Duan, D. (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat. Biotechnol.* 23, 1435–1439.
- Lai, Y., Thomas, G.D., Yue, Y., Yang, H.T., Li, D., Long, C., Judge, L., Bostick, B., Chamberlain, J.S., Terjung, R.L., et al. (2009). Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. *J. Clin. Invest.* 119, 624–635.
- Lakics, V., Karran, E.H., and Boess, F.G. (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59, 367–374.
- Larcher, T., Lafoux, A., Tesson, L., Remy, S., Thepenier, V., François, V., Le Guiner, C., Goubin, H., Dutilleul, M., Guigand, L., et al. (2014). Characterization of Dystrophin Deficient Rats: A New Model for Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS ONE* 9, e110371.
- Larochelle, N., Teng, Q., Gilbert, R., Deol, J.R., Karpati, G., Holland, P.C., and Nalbantoglu, J. (2010). Modulation of coxsackie and adenovirus receptor expression for gene transfer to normal and dystrophic skeletal muscle. *J. Gene Med.* n/a – n/a.
- Law, P.K., Goodwin, T.G., and Wang, M.G. (1988). Normal myoblast injections provide genetic treatment for murine dystrophy. *Muscle Nerve* 11, 525–533.
- Lee, S.-J. (2004). Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 61–86.
- Lee, S.-J. (2007). Quadrupling muscle mass in mice by targeting TGF-beta signaling pathways. *PloS One* 2, e789.
- Lee, H.J., Kim, E., and Kim, J.-S. (2010). Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. *Genome Res.* 20, 81–89.
- Lee, H.J., Kweon, J., Kim, E., Kim, S., and Kim, J.-S. (2012). Targeted chromosomal duplications and inversions in the human genome using zinc finger nucleases. *Genome Res.* 22, 539–548.
- Le Hir, M., Goyenvallé, A., Peccate, C., Précigout, G., Davies, K.E., Voit, T., Garcia, L., and Lorain, S. (2013). AAV Genome Loss From Dystrophic Mouse Muscles During AAV-U7 snRNA-mediated Exon-skipping Therapy. *Mol. Ther.* 21, 1551–1558.
- Lerch, T.F., and Chapman, M.S. (2012). Identification of the heparin binding site on adeno-associated virus serotype 3B (AAV-3B). *Virology* 423, 6–13.
- Le Rumeur, E., Winder, S.J., and Hubert, J.-F. (2010). Dystrophin: More than just the sum of its parts. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* 1804, 1713–1722.

- Levi, O., Genin, O., Angelini, C., Halevy, O., and Pines, M. (2015). Inhibition of muscle fibrosis results in increases in both utrophin levels and the number of revertant myofibers in Duchenne muscular dystrophy. *Oncotarget*.
- Li, H., Murphy, S.L., Giles-Davis, W., Edmonson, S., Xiang, Z., Li, Y., Lasaro, M.O., High, K.A., and Ertl, H.C. (2007). Pre-existing AAV Capsid-specific CD8⁺ T Cells are Unable to Eliminate AAV-transduced Hepatocytes. *Mol. Ther.* *15*, 792–800.
- Li, H.L., Fujimoto, N., Sasakawa, N., Shirai, S., Ohkame, T., Sakuma, T., Tanaka, M., Amano, N., Watanabe, A., Sakurai, H., et al. (2015a). Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient Induced Pluripotent Stem Cells by TALEN and CRISPR-Cas9. *Stem Cell Rep.* *4*, 143–154.
- Li, J., Jiang, H., and Wong, W. (2010). Method Modeling non-uniformity in short-read rates in RNA-Seq data. *Genome Biol* *11*, R25.
- Li, S., Kimura, E., Fall, B.M., Reyes, M., Angello, J.C., Welikson, R., Hauschka, S.D., and Chamberlain, J.S. (2005). Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther.* *12*, 1099–1108.
- Li, T., Huang, S., Zhao, X., Wright, D.A., Carpenter, S., Spalding, M.H., Weeks, D.P., and Yang, B. (2011). Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* *39*, 6315–6325.
- Li, Y., Rao, X., Mattox, W.W., Amos, C.I., and Liu, B. (2015b). RNA-Seq Analysis of Differential Splice Junction Usage and Intron Retentions by DEXSeq. *PloS One* *10*, e0136653.
- Li, Z., Düllmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., et al. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* *296*, 497–497.
- Liang, P., and Pardee, A.B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* *257*, 967–971.
- Lidov, H.G., Selig, S., and Kunkel, L.M. (1995). Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 329–335.
- Lin, X. (2005). siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res.* *33*, 4527–4535.
- Lin, Y.C., Lee, W.T., Huang, S.F., Young, C., Wang, P.J., and Shen, Y.Z. (1999). Persistent hypertransaminasemia as the presenting findings of muscular dystrophy in childhood. *Acta Paediatr. Taiwanica Taiwan Er Ke Yi Xue Hui Za Zhi* *40*, 424–429.
- Lin, S., and Burgunder, J.M. (2000). Utrophin may be a precursor of dystrophin during skeletal muscle development. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *119*, 289–295.
- Lin, A.Y., Prochniewicz, E., Henderson, D.M., Li, B., Ervasti, J.M., and Thomas, D.D. (2012). Impacts of Dystrophin and Utrophin Domains on Actin Structural Dynamics: Implications for Therapeutic Design. *J. Mol. Biol.* *420*, 87–98.
- Lindenbaum, R.H., Clarke, G., Patel, C., Moncrieff, M., and Hughes, J.T. (1979). Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. *J. Med. Genet.* *16*, 389–392.
- Lindow, M., Vornlocher, H.-P., Riley, D., Kornbrust, D.J., Burchard, J., Whiteley, L.O., Kamens, J., Thompson, J.D., Nochur, S., Younis, H., et al. (2012). Assessing unintended hybridization-induced biological effects of oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* *30*, 920–923.

- Ling, C., Lu, Y., Kalsi, J.K., Jayandharan, G.R., Li, B., Ma, W., Cheng, B., Gee, S.W.Y., McGoogan, K.E., Govindasamy, L., et al. (2010). Human Hepatocyte Growth Factor Receptor Is a Cellular Coreceptor for Adeno-Associated Virus Serotype 3. *Hum. Gene Ther.* 21, 1741–1747.
- Liu, S. (2004). Inhibition of HIV-1 multiplication by antisense U7 snRNAs and siRNAs targeting cyclophilin A. *Nucleic Acids Res.* 32, 3752–3759.
- Liu, D., Donegan, J., Nuovo, G., Mitra, D., and Laurence, J. (1997). Stable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) resistance in transformed CD4⁺ monocytic cells treated with multitargeting HIV-1 antisense sequences incorporated into U1 snRNA. *J. Virol.* 71, 4079–4085.
- Liu, H.X., Zhang, M., and Krainer, A.R. (1998). Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev.* 12, 1998–2012.
- Longhese, M.P., Bonetti, D., Manfrini, N., and Clerici, M. (2010). Mechanisms and regulation of DNA end resection. *EMBO J.* 29, 2864–2874.
- Lostal, W., Kodippili, K., Yue, Y., and Duan, D. (2014). Full-Length Dystrophin Reconstitution with Adeno-Associated Viral Vectors. *Hum. Gene Ther.* 25, 552–562.
- Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15, 550.
- Lu, Q.L., Morris, G.E., Wilton, S.D., Ly, T., Artem'yeva, O.V., Strong, P., and Partridge, T.A. (2000). Massive idiosyncratic exon skipping corrects the nonsense mutation in dystrophic mouse muscle and produces functional revertant fibers by clonal expansion. *J. Cell Biol.* 148, 985–996.
- Lu, Q.L., Mann, C.J., Lou, F., Bou-Gharios, G., Morris, G.E., Xue, S., Fletcher, S., Partridge, T.A., and Wilton, S.D. (2003). Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat. Med.* 9, 1009–1014.
- Lu, Q.L., Rabinowitz, A., Chen, Y.C., Yokota, T., Yin, H., Alter, J., Jadoon, A., Bou-Gharios, G., and Partridge, T. (2005). Systemic delivery of antisense oligoribonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 198–203.
- Ma, Y., Zhang, L., and Huang, X. (2014). Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J.* 281, 5186–5193.
- Mah, J.K., Korngut, L., Dykeman, J., Day, L., Pringsheim, T., and Jette, N. (2014). A systematic review and meta-analysis on the epidemiology of Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 24, 482–491.
- Maier, T., Güell, M., and Serrano, L. (2009). Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. *FEBS Lett.* 583, 3966–3973.
- Maione, D., Della Rocca, C., Giannetti, P., D'Arrigo, R., Liberatoscioli, L., Franlin, L.L., Sandig, V., Ciliberto, G., La Monica, N., and Savino, R. (2001). An improved helper-dependent adenoviral vector allows persistent gene expression after intramuscular delivery and overcomes preexisting immunity to adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 5986–5991.
- Malerba, A., Kang, J.K., McClorey, G., Saleh, A.F., Popplewell, L., Gait, M.J., Wood, M.J., and Dickson, G. (2012). Dual Myostatin and Dystrophin Exon Skipping by Morpholino Nucleic Acid Oligomers Conjugated to a Cell-penetrating Peptide Is a Promising Therapeutic Strategy for the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther. — Nucleic Acids* 1, e62.

- Malhotra, S.B., Hart, K.A., Klamut, H.J., Thomas, N.S., Bodrug, S.E., Burghes, A.H., Bobrow, M., Harper, P.S., Thompson, M.W., and Ray, P.N. (1988). Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy. *Science* 242, 755–759.
- Malik, V., Rodino-Klapac, L.R., Viollet, L., Wall, C., King, W., Al-Dahhak, R., Lewis, S., Shilling, C.J., Kota, J., Serrano-Munuera, C., et al. (2010). Gentamicin-induced readthrough of stop codons in Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* NA – NA.
- Mann, C.J., Honeyman, K., Cheng, A.J., Ly, T., Lloyd, F., Fletcher, S., Morgan, J.E., Partridge, T.A., and Wilton, S.D. (2001). Antisense-induced exon skipping and synthesis of dystrophin in the mdx mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 42–47.
- Manno, C.S., Chew, A.J., Hutchison, S., Larson, P.J., Herzog, R.W., Arruda, V.R., Tai, S.J., Ragni, M.V., Thompson, A., Ozelo, M., et al. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood* 101, 2963–2972.
- Manno, C.S., Arruda, V.R., Pierce, G.F., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J., Ozelo, M.C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., et al. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* 12, 342–347.
- Manzur, A.Y., and Muntoni, F. (2009). Diagnosis and new treatments in muscular dystrophies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80, 706–714.
- Manzur, A.Y., Kuntzer, T., Pike, M., and Swan, A.V. (2008). Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, The Cochrane Collaboration, ed. (Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd),.
- Marioni, J.C., Mason, C.E., Mane, S.M., Stephens, M., and Gilad, Y. (2008). RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res.* 18, 1509–1517.
- Markham, L.W., Kinnett, K., Wong, B.L., Woodrow Benson, D., and Cripe, L.H. (2008). Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* 18, 365–370.
- Marquis, J., Meyer, K., Angehrn, L., Kämpfer, S.S., Rothen-Rutishauser, B., and Schümperli, D. (2007). Spinal Muscular Atrophy: SMN2 Pre-mRNA Splicing Corrected by a U7 snRNA Derivative Carrying a Splicing Enhancer Sequence. *Mol. Ther.* 15, 1479–1486.
- Matsumura, K., Burghes, A.H., Mora, M., Tomé, F.M., Morandi, L., Cornello, F., Leturcq, F., Jeanpierre, M., Kaplan, J.C., and Reinert, P. (1994). Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J. Clin. Invest.* 93, 99–105.
- McCaffrey, A.P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R.L., Ehrhardt, A., Pham, T.-T.T., Pandey, K., Xu, H., Feuss, S., Storm, T.A., et al. (2008). The Host Response to Adenovirus, Helper-dependent Adenovirus, and Adeno-associated Virus in Mouse Liver. *Mol. Ther.* 16, 931–941.
- McCarty, D.M., Fu, H., Monahan, P.E., Toulson, C.E., Naik, P., and Samulski, R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* 10, 2112–2118.
- McCourt, J.L., Rhett, K.K., Jaeger, M.A., Belanto, J.J., Talsness, D.M., and Ervasti, J.M. (2015). In vitro stability of therapeutically relevant, internally truncated dystrophins. *Skelet. Muscle* 5.
- McDonald, C.M., Henricson, E.K., Abresch, R.T., Florence, J., Eagle, M., Gappmaier, E., Glanzman, A.M., Spiegel, R., Barth, J., Elfring, G., et al. (2013). The 6-minute walk test and other clinical endpoints in duchenne

muscular dystrophy: Reliability, concurrent validity, and minimal clinically important differences from a multicenter study. *Muscle Nerve* 48, 357–368.

McDouall, R.M., Dunn, M.J., and Dubowitz, V. (1990). Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* 99, 199–217.

McElroy, S.P., Nomura, T., Torrie, L.S., Warbrick, E., Gartner, U., Wood, G., and McLean, W.H.I. (2013). A Lack of Premature Termination Codon Read-Through Efficacy of PTC124 (Ataluren) in a Diverse Array of Reporter Assays. *PLoS Biol.* 11, e1001593.

McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., and Duan, D. (2015). Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.* 8, 195–213.

McMillan, H.J., Gregas, M., Darras, B.T., and Kang, P.B. (2011). Serum Transaminase Levels in Boys With Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *PEDIATRICS* 127, e132–e136.

McPherron, A.C., Lawler, A.M., and Lee, S.J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 387, 83–90.

Mendell, J.R., and Lloyd-Puryear, M. (2013). Report of MDA muscle disease symposium on newborn screening for Duchenne muscular dystrophy: Issues & Opinions: Newborn Screening for DMD. *Muscle Nerve* 48, 21–26.

Mendell, J.R., Moxley, R.T., Griggs, R.C., Brooke, M.H., Fenichel, G.M., Miller, J.P., King, W., Signore, L., Pandya, S., and Florence, J. (1989). Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 320, 1592–1597.

Mendell, J.R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., Bowles, D., Gray, S., Li, C., Galloway, G., et al. (2010). Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* 363, 1429–1437.

Mendell, J.R., Shilling, C., Leslie, N.D., Flanigan, K.M., al-Dahhak, R., Gastier-Foster, J., Kneile, K., Dunn, D.M., Duval, B., Aoyagi, A., et al. (2012). Evidence-based path to newborn screening for duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* 71, 304–313.

Mendell, J.R., Rodino-Klapac, L.R., Sahenk, Z., Roush, K., Bird, L., Lowes, L.P., Alfano, L., Gomez, A.M., Lewis, S., Kota, J., et al. (2013). Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Eteplirsen for DMD. *Ann. Neurol.* 74, 637–647.

Mendell, J.R., Sahenk, Z., Malik, V., Gomez, A.M., Flanigan, K.M., Lowes, L.P., Alfano, L.N., Berry, K., Meadows, E., Lewis, S., et al. (2015). A Phase 1/2a Follistatin Gene Therapy Trial for Becker Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 23, 192–201.

Meng, X., Noyes, M.B., Zhu, L.J., Lawson, N.D., and Wolfe, S.A. (2008). Targeted gene inactivation in zebrafish using engineered zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26, 695–701.

Mercier, S., Toutain, A., Toussaint, A., Raynaud, M., de Barace, C., Marcorelles, P., Pasquier, L., Blayau, M., Espil, C., Parent, P., et al. (2013). Genetic and clinical specificity of 26 symptomatic carriers for dystrophinopathies at pediatric age. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* 21, 855–863.

Merlini, L., and Sabatelli, P. (2015). Improving clinical trial design for Duchenne muscular dystrophy. *BMC Neurol.* 15.

Merten, O.-W. (2004). State-of-the-art of the production of retroviral vectors. *J. Gene Med.* 6, S105–S124.

Meryon, E. (1852). On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles. *Medico-Chir. Trans.* 35, 73–84.1.

Michienzi, A., Conti, L., Varano, B., Prislei, S., Gessani, S., and Bozzoni, I. (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by nuclear chimeric anti-HIV ribozymes in a human T lymphoblastoid cell line. *Hum. Gene Ther.* 9, 621–628.

Mietzsch, M., Grasse, S., Zurawski, C., Weger, S., Bennett, A., Agbandje-McKenna, M., Muzyczka, N., Zolotukhin, S., and Heilbronn, R. (2014). OneBac: Platform for Scalable and High-Titer Production of Adeno-Associated Virus Serotype 1–12 Vectors for Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.* 25, 212–222.

Miller, J.N., and Pearce, D.A. (2014). Nonsense-mediated decay in genetic disease: Friend or foe? *Mutat. Res. Mutat. Res.* 762, 52–64.

Mingozzi, F., and High, K.A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12, 341–355.

Mingozzi, F., Maus, M.V., Hui, D.J., Sabatino, D.E., Murphy, S.L., Rasko, J.E.J., Ragni, M.V., Manno, C.S., Sommer, J., Jiang, H., et al. (2007). CD8⁺ T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat. Med.* 13, 419–422.

Mockenhaupt, S., Grosse, S., Rupp, D., Bartenschlager, R., and Grimm, D. (2015). Alleviation of off-target effects from vector-encoded shRNAs via codelivered RNA decoys. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201510476.

Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Middlesworth, W., Colletti, C.A., Aldridge, J., Fischbeck, K.H., Bartlett, R., Pericak-Vance, M.A., Roses, A.D., and Kunkel, L.M. (1985). Detection of deletions spanning the Duchenne muscular dystrophy locus using a tightly linked DNA segment. *Nature* 316, 842–845.

Monaco, A.P., Neve, R.L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C.J., Kurnit, D.M., and Kunkel, L.M. (1986). Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* 323, 646–650.

Monaco, A.P., Bertelson, C.J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L.M. (1988). An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics* 2, 90–95.

Montgomery, R.A., and Dietz, H.C. (1997). Inhibition of fibrillin 1 expression using U1 snRNA as a vehicle for the presentation of antisense targeting sequence. *Hum. Mol. Genet.* 6, 519–525.

Moser, H. (1984). Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum. Genet.* 66, 17–40.

Mosqueira, M., Zeiger, U., Förderer, M., Brinkmeier, H., and Fink, R.H. (2013). Cardiac and Respiratory Dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy and the Role of Second Messengers: ROLE OF SECOND MESSENGERS IN DMD. *Med. Res. Rev.* 33, 1174–1213.

Mostacciolo, M.L., Lombardi, A., Cambissa, V., Danieli, G.A., and Angelini, C. (1987). Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy. *Hum. Genet.* 75, 217–220.

Mouly, V., Edom, F., Decary, S., Vicart, P., Barbet, J.P., and Butler-Browne, G.S. (1996). SV40 large T antigen interferes with adult myosin heavy chain expression, but not with differentiation of human satellite cells. *Exp. Cell Res.* 225, 268–276.

Mowry, K.L., and Steitz, J.A. (1987). Identification of the human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3' end maturation of histone premessenger RNA's. *Science* 238, 1682–1687.

- Mueller, C., Chulay, J.D., Trapnell, B.C., Humphries, M., Carey, B., Sandhaus, R.A., McElvaney, N.G., Messina, L., Tang, Q., Rouhani, F.N., et al. (2013). Human Treg responses allow sustained recombinant adeno-associated virus-mediated transgene expression. *J. Clin. Invest.* 123, 5310–5318.
- Müller, B., and Schümperli, D. (1997). The U7 snRNP and the hairpin binding protein: Key players in histone mRNA metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 8, 567–576.
- Muntoni, F., Melis, M.A., Ganau, A., and Dubowitz, V. (1995). Transcription of the dystrophin gene in normal tissues and in skeletal muscle of a family with X-linked dilated cardiomyopathy. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 151–157.
- Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol.* 2, 731–740.
- Muntoni, F. (2015). A Phase I/IIa Clinical Trial in Duchenne Muscular Dystrophy Using Systemically Delivered Morpholino Antisense Oligomer to Skip Exon 53 (SKIP-NMD). *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 26, 92–95.
- Mussolino, C., Morbitzer, R., Lutge, F., Dannemann, N., Lahaye, T., and Cathomen, T. (2011). A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity. *Nucleic Acids Res.* 39, 9283–9293.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., and Snyder, M. (2008). The Transcriptional Landscape of the Yeast Genome Defined by RNA Sequencing. *Science* 320, 1344–1349.
- Naito, Y., and Ui-Tei, K. (2012). siRNA Design Software for a Target Gene-Specific RNA Interference. *Front. Genet.* 3.
- Nakai, H., Yant, S.R., Storm, T.A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M.A. (2001). Extrachromosomal Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes Are Primarily Responsible for Stable Liver Transduction In Vivo. *J. Virol.* 75, 6969–6976.
- Nakamura, A., and Takeda, S. 'ichi (2011). Mammalian Models of Duchenne Muscular Dystrophy: Pathological Characteristics and Therapeutic Applications. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 1–8.
- Nakamura, K., Fujii, W., Tsuboi, M., Tanihata, J., Teramoto, N., Takeuchi, S., Naito, K., Yamanouchi, K., and Nishihara, M. (2014). Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci. Rep.* 4.
- Naldini, L., Blömer, U., Galloway, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263–267.
- Nance, M.E., and Duan, D. (2015). Perspective on Adeno-Associated Virus (AAV) Capsid Modification for Duchenne Muscular Dystrophy Gene Therapy. *Hum. Gene Ther.*
- Nathwani, A.C., Gray, J.T., McIntosh, J., Ng, C.Y.C., Zhou, J., Spence, Y., Cochrane, M., Gray, E., Tuddenham, E.G.D., and Davidoff, A.M. (2007). Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates. *Blood* 109, 1414–1421.
- Nathwani, A.C., Tuddenham, E.G.D., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D.C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A.J., Harrington, C., et al. (2011a). Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 365, 2357–2365.
- Nathwani, A.C., Rosales, C., McIntosh, J., Rastegarlar, G., Nathwani, D., Raj, D., Nawathe, S., Waddington, S.N., Bronson, R., Jackson, S., et al. (2011b). Long-term Safety and Efficacy Following Systemic Administration of a Self-complementary AAV Vector Encoding Human FIX Pseudotyped With Serotype 5 and 8 Capsid Proteins. *Mol. Ther.* 19, 876–885.

- Nathwani, A.C., Reiss, U.M., Tuddenham, E.G.D., Rosales, C., Chowdary, P., McIntosh, J., Della Peruta, M., Lheriteau, E., Patel, N., Raj, D., et al. (2014). Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* 371, 1994–2004.
- Nature (2009). Gene therapy deserves a fresh chance. *Nature* 461, 1173.
- Nault, J.-C., Datta, S., Imbeaud, S., Franconi, A., Mallet, M., Couchy, G., Letouzé, E., Pilati, C., Verret, B., Blanc, J.-F., et al. (2015). Recurrent AAV2-related insertional mutagenesis in human hepatocellular carcinomas. *Nat. Genet.* 47, 1187–1193.
- Nevo, Y., Muntoni, F., Sewry, C., Legum, C., Kutai, M., Harel, S., and Dubowitz, V. (2003). Large in-frame deletions of the rod-shaped domain of the dystrophin gene resulting in severe phenotype. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* 5, 94–97.
- Niemeyer, G.P., Herzog, R.W., Mount, J., Arruda, V.R., Tillson, D.M., Hathcock, J., van Ginkel, F.W., High, K.A., and Lothrop, C.D. (2009). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* 113, 797–806.
- Nowrouzi, A., Penaud-Budloo, M., Kaepfel, C., Appelt, U., Le Guiner, C., Moullier, P., Kalle, C. von, Snyder, R.O., and Schmidt, M. (2012). Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver. *Mol. Ther.* 20, 1177–1186.
- Nudel, U., Zuk, D., Einat, P., Zeelon, E., Levy, Z., Neuman, S., and Yaffe, D. (1989). Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature* 337, 76–78.
- Obad, S., dos Santos, C.O., Petri, A., Heidenblad, M., Broom, O., Ruse, C., Fu, C., Lindow, M., Stenvang, J., Straarup, E.M., et al. (2011). Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs. *Nat. Genet.* 43, 371–378.
- Odom, G.L., Gregorevic, P., Allen, J.M., Finn, E., and Chamberlain, J.S. (2008). Microtrophin Delivery Through rAAV6 Increases Lifespan and Improves Muscle Function in Dystrophic Dystrophin/Utrophin-deficient Mice. *Mol. Ther.* 16, 1539–1545.
- Ohshima, S., Shin, J.-H., Yuasa, K., Nishiyama, A., Kira, J., Okada, T., and Takeda, S. (2009). Transduction Efficiency and Immune Response Associated With the Administration of AAV8 Vector Into Dog Skeletal Muscle. *Mol. Ther.* 17, 73–80.
- Onori, A., Pisani, C., Strimpakos, G., Monaco, L., Mattei, E., Passananti, C., and Corbi, N. (2013). UtroUp is a novel six zinc finger artificial transcription factor that recognises 18 base pairs of the utrophin promoter and efficiently drives utrophin upregulation. *BMC Mol. Biol.* 14, 3.
- Oshlack, A., and Wakefield, M.J. (2009). Transcript length bias in RNA-seq data confounds systems biology. *Biol. Direct* 4, 14.
- Ousterout, D.G., Perez-Pinera, P., Thakore, P.I., Kabadi, A.M., Brown, M.T., Qin, X., Fedrigo, O., Mouly, V., Tremblay, J.P., and Gersbach, C.A. (2013). Reading Frame Correction by Targeted Genome Editing Restores Dystrophin Expression in Cells From Duchenne Muscular Dystrophy Patients. *Mol. Ther.* 21, 1718–1726.
- Pacak, C.A. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circ. Res.* 99, e3–e9.
- Pacak, C.A., and Byrne, B.J. (2011). AAV Vectors for Cardiac Gene Transfer: Experimental Tools and Clinical Opportunities. *Mol. Ther.* 19, 1582–1590.
- Pacak, C.A., Conlon, T., Mah, C.S., and Byrne, B.J. (2008). Relative persistence of AAV serotype 1 vector genomes in dystrophic muscle. *Genet. Vaccines Ther.* 6, 14.

- Palmer, E., Wilhelm, J.M., and Sherman, F. (1979). Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics. *Nature* 277, 148–150.
- Palmieri, B., Tremblay, J.P., and Daniele, L. (2010). Past, present and future of myoblast transplantation in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Myoblast to treat Duchenne. *Pediatr. Transplant.* 14, 813–819.
- Pandya-Jones, A. (2011). Pre-mRNA splicing during transcription in the mammalian system. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 700–717.
- Pane, M., Fanelli, L., Mazzone, E.S., Olivieri, G., D’Amico, A., Messina, S., Scutifero, M., Battini, R., Petillo, R., Frosini, S., et al. (2015). Benefits of glucocorticoids in non-ambulant boys/men with Duchenne muscular dystrophy: A multicentric longitudinal study using the Performance of Upper Limb test. *Neuromuscul. Disord.* 25, 749–753.
- Parent, A. (2005). Duchenne De Boulogne: a pioneer in neurology and medical photography. *Can. J. Neurol. Sci.* 32, 369–377.
- Parks, R.J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M.A., and Graham, F.L. (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 13565–13570.
- Partridge, T.A., Morgan, J.E., Coulton, G.R., Hoffman, E.P., and Kunkel, L.M. (1989). Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature* 337, 176–179.
- Patel, S.B., and Bellini, M. (2008). The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res.* 36, 6482–6493.
- Pattanayak, V., Ramirez, C.L., Joung, J.K., and Liu, D.R. (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat. Methods* 8, 765–770.
- Pattanayak, V., Lin, S., Guilinger, J.P., Ma, E., Doudna, J.A., and Liu, D.R. (2013). High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.* 31, 839–843.
- Pattanayak, V., Guilinger, J.P., and Liu, D.R. (2014). Determining the Specificities of TALENs, Cas9, and Other Genome-Editing Enzymes. In *Methods in Enzymology*, (Elsevier), pp. 47–78.
- Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Cherel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., et al. (2008). Adeno-Associated Virus Vector Genomes Persist as Episomal Chromatin in Primate Muscle. *J. Virol.* 82, 7875–7885.
- Peters, I.R., Peeters, D., Helps, C.R., and Day, M.J. (2007). Development and application of multiple internal reference (housekeeper) gene assays for accurate normalisation of canine gene expression studies. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 117, 55–66.
- Petrof, B.J., Shrager, J.B., Stedman, H.H., Kelly, A.M., and Sweeney, H.L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 3710–3714.
- Phillips, S.C., and Turner, P.C. (1991). Nucleotide sequence of the mouse U7 snRNA gene. *Nucleic Acids Res.* 19, 1344.
- Phillips, S.C., and Turner, P.C. (1992). A transcriptional analysis of the gene encoding mouse U7 small nuclear RNA. *Gene* 116, 181–186.
- Pillai, R.S., Will, C.L., Lührmann, R., Schümperli, D., and Müller, B. (2001). Purified U7 snRNPs lack the Sm proteins D1 and D2 but contain Lsm10, a new 14 kDa Sm D1-like protein. *EMBO J.* 20, 5470–5479.

- Pillai, R.S., Grimmer, M., Meister, G., Will, C.L., Lührmann, R., Fischer, U., and Schümperli, D. (2003). Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev.* 17, 2321–2333.
- Pillers, D.A., Bulman, D.E., Weleber, R.G., Sigesmund, D.A., Musarella, M.A., Powell, B.R., Murphey, W.H., Westall, C., Panton, C., and Becker, L.E. (1993). Dystrophin expression in the human retina is required for normal function as defined by electroretinography. *Nat. Genet.* 4, 82–86.
- Plantié, E., Migocka-Patrzałek, M., Daczewska, M., and Jagla, K. (2015). Model Organisms in the Fight against Muscular Dystrophy: Lessons from *Drosophila* and Zebrafish. *Molecules* 20, 6237–6253.
- Popplewell, L., Koo, T., Leclerc, X., Duclert, A., Mamchaoui, K., Gouble, A., Mouly, V., Voit, T., Pâques, F., Cédronne, F., et al. (2013). Gene correction of a duchenne muscular dystrophy mutation by meganuclease-enhanced exon knock-in. *Hum. Gene Ther.* 24, 692–701.
- Popplewell, L.J., Trollet, C., Dickson, G., and Graham, I.R. (2009). Design of Phosphorodiamidate Morpholino Oligomers (PMOs) for the Induction of Exon Skipping of the Human DMD Gene. *Mol. Ther.* 17, 554–561.
- Porteus, M. (2006). Mammalian gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Mol. Ther.* 13, 438–446.
- Pramono, Z.A., Takeshima, Y., Alimsardjono, H., Ishii, A., Takeda, S., and Matsuo, M. (1996). Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 445–449.
- Qiao, C., Li, J., Jiang, J., Zhu, X., Wang, B., Li, J., and Xiao, X. (2008). Myostatin Propeptide Gene Delivery by Adeno-Associated Virus Serotype 8 Vectors Enhances Muscle Growth and Ameliorates Dystrophic Phenotypes in *mdx* Mice. *Hum. Gene Ther.* 19, 241–254.
- Raal, F.J., Santos, R.D., Blom, D.J., Marais, A.D., Charng, M.-J., Cromwell, W.C., Lachmann, R.H., Gaudet, D., Tan, J.L., Chasan-Taber, S., et al. (2010). Mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, for lowering of LDL cholesterol concentrations in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 375, 998–1006.
- Rabinowitz, J.E., Rolling, F., Li, C., Conrath, H., Xiao, W., Xiao, X., and Samulski, R.J. (2002). Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity. *J. Virol.* 76, 791–801.
- Rajkumar, A.P., Qvist, P., Lazarus, R., Lescai, F., Ju, J., Nyegaard, M., Mors, O., Børghlum, A.D., Li, Q., and Christensen, J.H. (2015). Experimental validation of methods for differential gene expression analysis and sample pooling in RNA-seq. *BMC Genomics* 16.
- Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.-Y., Gootenberg, J.S., Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., et al. (2013). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 154, 1380–1389.
- Rapaport, F., Khanin, R., Liang, Y., Pirun, M., Krek, A., Zumbo, P., Mason, C.E., Socci, N.D., and Betel, D. (2013). Comprehensive evaluation of differential gene expression analysis methods for RNA-seq data. *Genome Biol* 14, R95.
- Raper, S.E., Chirmule, N., Lee, F.S., Wivel, N.A., Bagg, A., Gao, G., Wilson, J.M., and Batshaw, M.L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148–158.

- Ray, P.N., Belfall, B., Duff, C., Logan, C., Kean, V., Thompson, M.W., Sylvester, J.E., Gorski, J.L., Schmickel, R.D., and Worton, R.G. (1985). Cloning of the breakpoint of an X;21 translocation associated with Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 318, 672–675.
- Reiss, J., and Rininsland, F. (1994). An explanation for the constitutive exon 9 cassette splicing of the DMD gene. *Hum. Mol. Genet.* 3, 295–298.
- Relizani, K., Mouisel, E., Giannesini, B., Hourdé, C., Patel, K., Morales Gonzalez, S., Jülich, K., Vignaud, A., Piétri-Rouxel, F., Fortin, D., et al. (2014). Blockade of ActRIIB Signaling Triggers Muscle Fatigability and Metabolic Myopathy. *Mol. Ther.* 22, 1423–1433.
- Riordan, S.M., Heruth, D.P., Zhang, L.Q., and Ye, S.Q. (2015). Application of CRISPR/Cas9 for biomedical discoveries. *Cell Biosci.* 5.
- Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G., and Dudoit, S. (2011). GC-content normalization for RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* 12, 480.
- Rivera, V.M. (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* 105, 1424–1430.
- Roberts, A., Trapnell, C., Donaghey, J., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2011). Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biol.* 12, R22.
- Roberts, T.C., Johansson, H.J., McClorey, G., Godfrey, C., Blomberg, K.E.M., Coursindel, T., Gait, M.J., Smith, C.I.E., Lehtiö, J., EL Andaloussi, S., et al. (2015). Multi-level omics analysis in a murine model of dystrophin loss and therapeutic restoration. *Hum. Mol. Genet.* ddv381.
- Rodino-Klapac, L.R., Mendell, J.R., and Sahenk, Z. (2013). Update on the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 13.
- Romero, N.B., Braun, S., Benveniste, O., Leturcq, F., Hogrel, J.-Y., Morris, G.E., Barois, A., Eymard, B., Payan, C., Ortega, V., et al. (2004). Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 15, 1065–1076.
- Rosenberg, S.A., Aebersold, P., Cornetta, K., Kasid, A., Morgan, R.A., Moen, R., Karson, E.M., Lotze, M.T., Yang, J.C., and Topalian, S.L. (1990). Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N. Engl. J. Med.* 323, 570–578.
- Rothe, M., Modlich, U., and Schambach, A. (2013). Biosafety challenges for use of lentiviral vectors in gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 13, 453–468.
- Rotundo, I.L., Lancioni, A., Savarese, M., D’Orsi, L., Iacomino, M., Nigro, G., Piluso, G., Auricchio, A., and Nigro, V. (2013). Use of a Lower Dosage Liver-Detargeted AAV Vector to Prevent Hamster Muscular Dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 24, 424–430.
- Rouger, K., Larcher, T., Dubreil, L., Deschamps, J.-Y., Le Guiner, C., Jouvion, G., Delorme, B., Lieubeau, B., Carlus, M., Fornasari, B., et al. (2011). Systemic Delivery of Allogenic Muscle Stem Cells Induces Long-Term Muscle Repair and Clinical Efficacy in Duchenne Muscular Dystrophy Dogs. *Am. J. Pathol.* 179, 2501–2518.
- Ryan, N.J. (2014). Ataluren: First Global Approval. *Drugs* 74, 1709–1714.
- Rybakova, I.N., and Ervasti, J.M. (2005). Identification of Spectrin-like Repeats Required for High Affinity Utrophin-Actin Interaction. *J. Biol. Chem.* 280, 23018–23023.

- Rybakova, I.N., Patel, J.R., and Ervasti, J.M. (2000). The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.* 150, 1209–1214.
- Rymond, B. (2007). Targeting the spliceosome. *Nat. Chem. Biol.* 3, 533–535.
- Saha, B., Wong, C., and Parks, R. (2014). The Adenovirus Genome Contributes to the Structural Stability of the Virion. *Viruses* 6, 3563–3583.
- Sakamoto, M., Yuasa, K., Yoshimura, M., Yokota, T., Ikemoto, T., Suzuki, M., Dickson, G., Miyagoe-Suzuki, Y., and Takeda, S. (2002). Micro-dystrophin cDNA ameliorates dystrophic phenotypes when introduced into mdx mice as a transgene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 1265–1272.
- Saleh, A.F., Arzumanov, A.A., and Gait, M.J. (2012). Overview of Alternative Oligonucleotide Chemistries for Exon Skipping. In *Exon Skipping*, A. Aartsma-Rus, ed. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 365–378.
- Salganik, M., Aydemir, F., Nam, H.-J., McKenna, R., Agbandje-McKenna, M., and Muzyczka, N. (2014). Adeno-Associated Virus Capsid Proteins May Play a Role in Transcription and Second-Strand Synthesis of Recombinant Genomes. *J. Virol.* 88, 1071–1079.
- Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.-L., Galvez, B.G., Barthélémy, I., et al. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* 444, 574–579.
- SEQC/MAQC-III Consortium (2014). A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium. *Nat. Biotechnol.* 32, 903–914.
- Scacheri, P.C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplen, N.J., Wolfsberg, T.G., Umayam, L., Lee, J.C., Hughes, C.M., Shanmugam, K.S., Bhattacharjee, A., Meyerson, M., et al. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1892–1897.
- Schumperli, D., and Pillai, R.S. (2004). The special Sm core structure of the U7 snRNP: far-reaching significance of a small nuclear ribonucleoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2560–2570.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., and Brown, P.O. (1995). Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270, 467–470.
- Schmid, F., Hiller, T., Korner, G., Glaus, E., Berger, W., and Neidhardt, J. (2013). A Gene Therapeutic Approach to Correct Splice Defects with Modified U1 and U6 snRNPs. *Hum. Gene Ther.* 24, 97–104.
- Schnepp, B.C., Clark, K.R., Klemanski, D.L., Pacak, C.A., and Johnson, P.R. (2003). Genetic Fate of Recombinant Adeno-Associated Virus Vector Genomes in Muscle. *J. Virol.* 77, 3495–3504.
- Schuelke, M., Wagner, K.R., Stolz, L.E., Hübner, C., Riebel, T., Kömen, W., Braun, T., Tobin, J.F., and Lee, S.-J. (2004). Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.* 350, 2682–2688.
- Schwanhäusser, B., Busse, D., Li, N., Dittmar, G., Schuchhardt, J., Wolf, J., Chen, W., and Selbach, M. (2011). Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature* 473, 337–342.
- Seinen, E., Burgerhof, J.G.M., Jansen, R.C., and Sibon, O.C.M. (2010). RNAi Experiments in *D. melanogaster*: Solutions to the Overlooked Problem of Off-Targets Shared by Independent dsRNAs. *PLoS ONE* 5, e13119.
- Seow, Y., Yin, H., and Wood, M.J.A. (2010). Identification of a novel muscle targeting peptide in mdx mice. *Peptides* 31, 1873–1877.

- Sharp, N.J., Kornegay, J.N., Van Camp, S.D., Herbstreith, M.H., Secore, S.L., Kettle, S., Hung, W.Y., Constantinou, C.D., Dykstra, M.J., and Roses, A.D. (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* 13, 115–121.
- Sheehan, J.P., and Phan, T.M. (2001). Phosphorothioate Oligonucleotides Inhibit the Intrinsic Tenase Complex by an Allosteric Mechanism [†]. *Biochemistry (Mosc.)* 40, 4980–4989.
- Shimatsu, Y., Katagiri, K., Furuta, T., Nakura, M., Tanioka, Y., Yuasa, K., Tomohiro, M., Kornegay, J.N., Nonaka, I., and Takeda, S. 'ichi (2003). Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp. Anim. Jpn. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 52, 93–97.
- Shin, J.-H., Yue, Y., Srivastava, A., Smith, B., Lai, Y., and Duan, D. (2012). A Simplified Immune Suppression Scheme Leads to Persistent Micro-dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy Dogs. *Hum. Gene Ther.* 23, 202–209.
- Shin, J.-H., Pan, X., Hakim, C.H., Yang, H.T., Yue, Y., Zhang, K., Terjung, R.L., and Duan, D. (2013). Microdystrophin Ameliorates Muscular Dystrophy in the Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol. Ther.* 21, 750–757.
- Sigoillot, F.D., Lyman, S., Huckins, J.F., Adamson, B., Chung, E., Quattrochi, B., and King, R.W. (2012). A bioinformatics method identifies prominent off-targeted transcripts in RNAi screens. *Nat. Methods* 9, 363–366.
- Simonds, A.K., Muntoni, F., Heather, S., and Fielding, S. (1998). Impact of nasal ventilation on survival in hypercapnic Duchenne muscular dystrophy. *Thorax* 53, 949–952.
- Singh, N.N., Shishimorova, M., Cao, L.C., Gangwani, L., and Singh, R.N. (2009). A short antisense oligonucleotide masking a unique intronic motif prevents skipping of a critical exon in spinal muscular atrophy. *RNA Biol.* 6, 341–350.
- Skuk, D. (2004). Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach. *Expert Opin. Biol. Ther.* 4, 1871–1885.
- Skuk, D., and Tremblay, J.P. (2015). Cell therapy in muscular dystrophies: many promises in mice and dogs, few facts in patients. *Expert Opin. Biol. Ther.* 1–13.
- Sledz, C.A., Holko, M., de Veer, M.J., Silverman, R.H., and Williams, B.R.G. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* 5, 834–839.
- Smith, R.H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther.* 15, 817–822.
- Snøve, O., and Holen, T. (2004). Many commonly used siRNAs risk off-target activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 256–263.
- Soldati, D., and Schümperli, D. (1988). Structural and functional characterization of mouse U7 small nuclear RNA active in 3' processing of histone pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* 8, 1518–1524.
- Spellman, R., and Smith, C.W.J. (2006). Novel modes of splicing repression by PTB. *Trends Biochem. Sci.* 31, 73–76.
- Spycher, C., Streit, A., Stefanovic, B., Albrecht, D., Koning, T.H., and Schümperli, D. (1994). 3' end processing of mouse histone pre-mRNA: evidence for additional base-pairing between U7 snRNA and pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.* 22, 4023–4030.
- Staněk, D., and Neugebauer, K.M. (2006). The Cajal body: a meeting place for spliceosomal snRNPs in the nuclear maze. *Chromosoma* 115, 343–354.

- Stefanovic, B., Hackl, W., Lührmann, R., and Schümperli, D. (1995). Assembly, nuclear import and function of U7 snRNPs studied by microinjection of synthetic U7 RNA into *Xenopus* oocytes. *Nucleic Acids Res.* 23, 3141–3151.
- Stefanovic, B., Schnabl, B., and Brenner, D.A. (2002). Inhibition of Collagen 1(I) Expression by the 5' Stem-Loop as a Molecular Decoy. *J. Biol. Chem.* 277, 18229–18237.
- Stein, C.A., and Krieg, A.M. (1994). Problems in interpretation of data derived from in vitro and in vivo use of antisense oligodeoxynucleotides. *Antisense Res. Dev.* 4, 67–69.
- Stilwell, J. (2004). Role of Viral Vectors and Virion Shells in Cellular Gene Expression. *Mol. Ther.* 9, 337–346.
- Strimpakos, G., Corbi, N., Pisani, C., Di Certo, M.G., Onori, A., Luvisetto, S., Severini, C., Gabanella, F., Monaco, L., Mattei, E., et al. (2014). Novel Adeno-Associated Viral Vector Delivering the Utrophin Gene Regulator Jazz Counteracts Dystrophic Pathology in mdx Mice: mAAV8-JAZZ COUNTERACTS PATHOLOGY IN MDX MICE. *J. Cell. Physiol.* 229, 1283–1291.
- Strub, K., Galli, G., Busslinger, M., and Birnstiel, M.L. (1984). The cDNA sequences of the sea urchin U7 small nuclear RNA suggest specific contacts between histone mRNA precursor and U7 RNA during RNA processing. *EMBO J.* 3, 2801–2807.
- Su, L.T. (2005). Uniform Scale-Independent Gene Transfer to Striated Muscle After Transvenular Extravasation of Vector. *Circulation* 112, 1780–1788.
- Su, Z., Łabaj, P.P., Li, S., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., Shi, W., Wang, C., Schroth, G.P., Setterquist, R.A., Thompson, J.F., et al. (2014). A comprehensive assessment of RNA-seq accuracy, reproducibility and information content by the Sequencing Quality Control Consortium. *Nat. Biotechnol.* 32, 903–914.
- Summerford, C., and Samulski, R.J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J. Virol.* 72, 1438–1445.
- Summerton, J.E. (2007). Morpholino, siRNA, and S-DNA compared: impact of structure and mechanism of action on off-target effects and sequence specificity. *Curr. Top. Med. Chem.* 7, 651–660.
- Sun, H., and Chasin, L.A. (2000). Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol. Cell. Biol.* 20, 6414–6425.
- Suter, D., Tomasini, R., Reber, U., Gorman, L., Kole, R., and Schümperli, D. (1999). Double-target antisense U7 snRNAs promote efficient skipping of an aberrant exon in three human beta-thalassemic mutations. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2415–2423.
- Tadayoni, R., Rendon, A., Soria-Jasso, L.E., and Cisneros, B. (2012). Dystrophin Dp71: The Smallest but Multifunctional Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. *Mol. Neurobiol.* 45, 43–60.
- Takeshima, Y., Wada, H., Yagi, M., Ishikawa, Y., Ishikawa, Y., Minami, R., Nakamura, H., and Matsuo, M. (2001). Oligonucleotides against a splicing enhancer sequence led to dystrophin production in muscle cells from a Duchenne muscular dystrophy patient. *Brain Dev.* 23, 788–790.
- Tenney, R.M., Bell, C.L., and Wilson, J.M. (2014). AAV8 capsid variable regions at the two-fold symmetry axis contribute to high liver transduction by mediating nuclear entry and capsid uncoating. *Virology* 454-455, 227–236.
- Tennyson, C.N., Klamut, H.J., and Worton, R.G. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat. Genet.* 9, 184–190.

- Thanh, L.T., Nguyen, T.M., Helliwell, T.R., and Morris, G.E. (1995). Characterization of revertant muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, using exon-specific monoclonal antibodies against dystrophin. *Am. J. Hum. Genet.* 56, 725–731.
- Thibaud, J.-L., Monnet, A., Bertoldi, D., Barthélémy, I., Blot, S., and Carlier, P.G. (2007). Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul. Disord.* 17, 575–584.
- Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J.M., and Davies, K. (1998). Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat. Med.* 4, 1441–1444.
- Tinsley, J., Robinson, N., and Davies, K.E. (2015). Safety, tolerability, and pharmacokinetics of SMT C1100, a 2-arylbenzoxazole utrophin modulator, following single- and multiple-dose administration to healthy male adult volunteers. *J. Clin. Pharmacol.* 55, 698–707.
- Tinsley, J.M., Blake, D.J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B.C., Knight, A.E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G.K., and Love, D.R. (1992). Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature* 360, 591–593.
- Tinsley, J.M., Potter, A.C., Phelps, S.R., Fisher, R., Trickett, J.I., and Davies, K.E. (1996). Amelioration of the dystrophic phenotype of mdx mice using a truncated utrophin transgene. *Nature* 384, 349–353.
- Tokarz, S.A., Duncan, N.M., Rash, S.M., Sadeghi, A., Dewan, A.K., and Pillers, D.A. (1998). Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Genet. Metab.* 65, 272–281.
- Toromanoff, A., Chérel, Y., Guilbaud, M., Penaud-Budloo, M., Snyder, R.O., Haskins, M.E., Deschamps, J.-Y., Guigand, L., Podevin, G., Arruda, V.R., et al. (2008). Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 16, 1291–1299.
- Toromanoff, A., Adjali, O., Larcher, T., Hill, M., Guigand, L., Chenuaud, P., Deschamps, J.-Y., Gauthier, O., Blancho, G., Vanhove, B., et al. (2010). Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 18, 151–160.
- Toussaint, M., Steens, M., Wasteels, G., and Soudon, P. (2006). Diurnal ventilation via mouthpiece: survival in end-stage Duchenne patients. *Eur. Respir. J.* 28, 549–555.
- Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 25, 1105–1111.
- Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* 28, 511–515.
- Tse, L.V., Moller-Tank, S., and Asokan, A. (2015). Strategies to circumvent humoral immunity to adeno-associated viral vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 15, 845–855.
- Tuffery-Giraud, S., Bérout, C., Leturcq, F., Yaou, R.B., Hamroun, D., Michel-Calemard, L., Moizard, M.-P., Bernard, R., Cossée, M., Boisseau, P., et al. (2009). Genotype-phenotype analysis in 2,405 patients with a dystrophinopathy using the UMD-DMD database: a model of nationwide knowledgebase. *Hum. Mutat.* 30, 934–945.
- Turner, I.A., Norman, C.M., Churcher, M.J., and Newman, A.J. (2004). Roles of the U5 snRNP in spliceosome dynamics and catalysis. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 928–931.

- Turner, P.R., Schultz, R., Ganguly, B., and Steinhardt, R.A. (1993). Proteolysis results in altered leak channel kinetics and elevated free calcium in mdx muscle. *J. Membr. Biol.* *133*, 243–251.
- Tuschl, T., Zamore, P.D., Lehmann, R., Bartel, D.P., and Sharp, P.A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* *13*, 3191–3197.
- Tyler, K.L. (2003). Origins and early descriptions of “Duchenne muscular dystrophy.” *Muscle Nerve* *28*, 402–422.
- Uhrig, S., Coutelle, O., Wiehe, T., Perabo, L., Hallek, M., and Büning, H. (2012). Successful target cell transduction of capsid-engineered rAAV vectors requires clathrin-dependent endocytosis. *Gene Ther.* *19*, 210–218.
- Urabe, M., Ding, C., and Kotin, R.M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Hum. Gene Ther.* *13*, 1935–1943.
- Vandenberghe, L.H., Wang, L., Somanathan, S., Zhi, Y., Figueredo, J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Desai, R.A., Chen, C.S., Johnston, J., et al. (2006). Heparin binding directs activation of T cells against adeno-associated virus serotype 2 capsid. *Nat. Med.* *12*, 967–971.
- Venables, J.P. (2007). Downstream intronic splicing enhancers. *FEBS Lett.* *581*, 4127–4131.
- Verhaart, I.E.C., and Aartsma-Rus, A. (2012). The Effect of 6-Thioguanine on Alternative Splicing and Antisense-Mediated Exon Skipping Treatment for Duchenne Muscular Dystrophy. *PLoS Curr.*
- Vetrini, F., and Ng, P. (2010). Gene Therapy with Helper-Dependent Adenoviral Vectors: Current Advances and Future Perspectives. *Viruses* *2*, 1886–1917.
- Vikman, P., Fadista, J., and Oskolkov, N. (2014). RNA sequencing: current and prospective uses in metabolic research. *J. Mol. Endocrinol.* *53*, R93–R101.
- Voit, T., Topaloglu, H., Straub, V., Muntoni, F., Deconinck, N., Campion, G., De Kimpe, S.J., Eagle, M., Guglieri, M., Hood, S., et al. (2014). Safety and efficacy of drisapersen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy (DEMAND II): an exploratory, randomised, placebo-controlled phase 2 study. *Lancet Neurol.* *13*, 987–996.
- Vulin, A., Barthélémy, I., Goyenvallé, A., Thibaud, J.-L., Beley, C., Griffith, G., Benchaouir, R., le Hir, M., Unterfinger, Y., Lorain, S., et al. (2012). Muscle Function Recovery in Golden Retriever Muscular Dystrophy After AAV1-U7 Exon Skipping. *Mol. Ther.* *20*, 2120–2133.
- Wahl, M.C., Will, C.L., and Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* *136*, 701–718.
- Wakefield, P.M., Tinsley, J.M., Wood, M.J., Gilbert, R., Karpati, G., and Davies, K.E. (2000). Prevention of the dystrophic phenotype in dystrophin/utrophin-deficient muscle following adenovirus-mediated transfer of a utrophin minigene. *Gene Ther.* *7*, 201–204.
- Wallace, G.Q., and McNally, E.M. (2009). Mechanisms of Muscle Degeneration, Regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. *Annu. Rev. Physiol.* *71*, 37–57.
- Wang, L. (2005). Sustained correction of disease in naive and AAV2-pretreated hemophilia B dogs: AAV2/8-mediated, liver-directed gene therapy. *Blood* *105*, 3079–3086.
- Wang, B., Li, J., and Xiao, X. (2000). Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 13714–13719.

- Wang, B., Li, J., Fu, F.H., and Xiao, X. (2009a). Systemic human *minidystrophin* gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. *J. Orthop. Res.* 27, 421–426.
- Wang, D., Zhong, L., Nahid, M.A., and Gao, G. (2014). The potential of adeno-associated viral vectors for gene delivery to muscle tissue. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11, 345–364.
- Wang, L., Bell, P., Somanathan, S., Wang, Q., He, Z., Yu, H., McMenamin, D., Goode, T., Calcedo, R., and Wilson, J.M. (2015). Comparative Study of Liver Gene Transfer With AAV Vectors Based on Natural and Engineered AAV Capsids. *Mol. Ther.*
- Wang, L., Figueredo, J., Calcedo, R., Lin, J., and Wilson, J.M. (2007a). Cross-Presentation of Adeno-Associated Virus Serotype 2 Capsids Activates Cytotoxic T Cells But Does Not Render Hepatocytes Effective Cytolytic Targets. *Hum. Gene Ther.* 18, 185–194.
- Wang, X., Wang, Y., Wu, X., Wang, J., Wang, Y., Qiu, Z., Chang, T., Huang, H., Lin, R.-J., and Yee, J.-K. (2015). Unbiased detection of off-target cleavage by CRISPR-Cas9 and TALENs using integrase-defective lentiviral vectors. *Nat. Biotechnol.* 33, 175–178.
- Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J., and Xiao, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* 23, 321–328.
- Wang, Z., Kuhr, C.S., Allen, J.M., Blankinship, M., Gregorevic, P., Chamberlain, J.S., Tapscott, S.J., and Storb, R. (2007b). Sustained AAV-mediated Dystrophin Expression in a Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy with a Brief Course of Immunosuppression. *Mol. Ther.*
- Wang, Z., Gerstein, M., and Snyder, M. (2009b). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 10, 57–63.
- Ward, A.J., and Cooper, T.A. (2009). The pathobiology of splicing. *J. Pathol.* n/a – n/a.
- Watkins, S.C., Hoffman, E.P., Slayter, H.S., and Kunkel, L.M. (1988). Immunoelectron microscopic localization of dystrophin in myofibres. *Nature* 333, 863–866.
- Webster, C., and Blau, H.M. (1990). Accelerated age-related decline in replicative life-span of Duchenne muscular dystrophy myoblasts: implications for cell and gene therapy. *Somat. Cell Mol. Genet.* 16, 557–565.
- Wein, N., Alfano, L., and Flanigan, K.M. (2015a). Genetics and Emerging Treatments for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *Pediatr. Clin. North Am.* 62, 723–742.
- Wein, N., Alfano, L., and Flanigan, K.M. (2015b). Genetics and Emerging Treatments for Duchenne and Becker Muscular Dystrophy. *Pediatr. Clin. North Am.* 62, 723–742.
- Welch, E.M., Barton, E.R., Zhuo, J., Tomizawa, Y., Friesen, W.J., Trifillis, P., Paushkin, S., Patel, M., Trotta, C.R., Hwang, S., et al. (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* 447, 87–91.
- van Westering, T., Betts, C., and Wood, M. (2015). Current Understanding of Molecular Pathology and Treatment of Cardiomyopathy in Duchenne Muscular Dystrophy. *Molecules* 20, 8823–8855.
- White, S.J., Aartsma-Rus, A., Flanigan, K.M., Weiss, R.B., Kneppers, A.L.J., Lalic, T., Janson, A.A.M., Ginjaar, H.B., Breuning, M.H., and den Dunnen, J.T. (2006). Duplications in the DMD gene. *Hum. Mutat.* 27, 938–945.
- Whitfield, M.L., Zheng, L.-X., Baldwin, A., Ohta, T., Hurt, M.M., and Marzluff, W.F. (2000). Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4188–4198.

- Wijshake, T., Baker, D.J., and van de Sluis, B. (2014). Endonucleases: new tools to edit the mouse genome. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 1842, 1942–1950.
- Wilton, S.D., and Fletcher, S. (2005). Antisense oligonucleotides in the treatment of Duchenne muscular dystrophy: Where are we now? *Neuromuscul. Disord.* 15, 399–402.
- Wilton, S.D., Lloyd, F., Carville, K., Fletcher, S., Honeyman, K., Agrawal, S., and Kole, R. (1999). Specific removal of the nonsense mutation from the mdx dystrophin mRNA using antisense oligonucleotides. *Neuromuscul. Disord.* NMD 9, 330–338.
- Wilton, S.D., Fall, A.M., Harding, P.L., McClorey, G., Coleman, C., and Fletcher, S. (2007). Antisense Oligonucleotide-induced Exon Skipping Across the Human Dystrophin Gene Transcript. *Mol. Ther.* 15, 1288–1296.
- Wright, J.F. (2014). AAV Empty Capsids: For Better or for Worse? *Mol. Ther.* 22, 1–2.
- Wu, B., Moulton, H.M., Iversen, P.L., Jiang, J., Li, J., Li, J., Spurney, C.F., Sali, A., Guerron, A.D., Nagaraju, K., et al. (2008). Effective rescue of dystrophin improves cardiac function in dystrophin-deficient mice by a modified morpholino oligomer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 14814–14819.
- Wu, C.H., Murphy, C., and Gall, J.G. (1996). The Sm binding site targets U7 snRNA to coiled bodies (spheres) of amphibian oocytes. *RNA N. Y. N* 2, 811–823.
- Wu, X., Scott, D.A., Kriz, A.J., Chiu, A.C., Hsu, P.D., Dadon, D.B., Cheng, A.W., Trevino, A.E., Konermann, S., Chen, S., et al. (2014). Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 32, 670–676.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R.J. (1998). Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* 72, 2224–2232.
- Xu, R., Camboni, M., and Martin, P.T. (2007). Postnatal overexpression of the CT GalNAc transferase inhibits muscular dystrophy in mdx mice without altering muscle growth or neuromuscular development: evidence for a utrophin-independent mechanism. *Neuromuscul. Disord.* NMD 17, 209–220.
- Xu, X., Zhang, Y., Williams, J., Antoniou, E., McCombie, W.R., Wu, S., Zhu, W., Davidson, N.O., Denoya, P., and Li, E. (2013). Parallel comparison of Illumina RNA-Seq and Affymetrix microarray platforms on transcriptomic profiles generated from 5-aza-deoxy-cytidine treated HT-29 colon cancer cells and simulated datasets. *BMC Bioinformatics* 14, S1.
- Yang, B., Ming, X., Cao, C., Laing, B., Yuan, A., Porter, M.A., Hull-Ryde, E.A., Maddry, J., Suto, M., Janzen, W.P., et al. (2015). High-throughput screening identifies small molecules that enhance the pharmacological effects of oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 43, 1987–1996.
- Yang, J., Zhou, W., Zhang, Y., Zidon, T., Ritchie, T., and Engelhardt, J.F. (1999). Concatamerization of adeno-associated virus circular genomes occurs through intermolecular recombination. *J. Virol.* 73, 9468–9477.
- Yang, L., Jiang, J., Drouin, L.M., Agbandje-Mckenna, M., Chen, C., Qiao, C., Pu, D., Hu, X., Wang, D.-Z., Li, J., et al. (2009). A myocardium tropic adeno-associated virus (AAV) evolved by DNA shuffling and in vivo selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 3946–3951.
- Yasuma, F., Konagaya, M., Sakai, M., Kuru, S., and Kawamura, T. (2004). A new lease on life for patients with Duchenne muscular dystrophy in Japan. *Am. J. Med.* 117, 363.
- Yin, H., Moulton, H.M., Seow, Y., Boyd, C., Boutilier, J., Iverson, P., and Wood, M.J.A. (2008). Cell-penetrating peptide-conjugated antisense oligonucleotides restore systemic muscle and cardiac dystrophin expression and function. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3909–3918.

- Yin, H., Saleh, A.F., Betts, C., Camelliti, P., Seow, Y., Ashraf, S., Arzumanov, A., Hammond, S., Merritt, T., Gait, M.J., et al. (2011). Pip5 Transduction Peptides Direct High Efficiency Oligonucleotide-mediated Dystrophin Exon Skipping in Heart and Phenotypic Correction in mdx Mice. *Mol. Ther.* 19, 1295–1303.
- Ylä-Herttuala, S. (2012). Endgame: Glybera Finally Recommended for Approval as the First Gene Therapy Drug in the European Union. *Mol. Ther.* 20, 1831–1832.
- Ylä-Herttuala, S. (2015). Glybera's Second Act: The Curtain Rises on the High Cost of Therapy. *Mol. Ther.* 23, 217–218.
- Yokota, T., Lu, Q., Partridge, T., Kobayashi, M., Nakamura, A., Takeda, S., and Hoffman, E. (2009). Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in duchenne dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* 65, 667–676.
- Yokota, T., Nakamura, A., Nagata, T., Saito, T., Kobayashi, M., Aoki, Y., Echigoya, Y., Partridge, T., Hoffman, E.P., and Takeda, S. 'ichi (2012). Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther.* 22, 306–315.
- Yoshida, M., and Ozawa, E. (1990). Glycoprotein complex anchoring dystrophin to sarcolemma. *J. Biochem. (Tokyo)* 108, 748–752.
- Yoshida, M., Suzuki, A., Yamamoto, H., Noguchi, S., Mizuno, Y., and Ozawa, E. (1994). Dissociation of the complex of dystrophin and its associated proteins into several unique groups by n-octyl beta-D-glucoside. *Eur. J. Biochem. FEBS* 222, 1055–1061.
- Yu, C.-Y., Yuan, Z., Cao, Z., Wang, B., Qiao, C., Li, J., and Xiao, X. (2009). A muscle-targeting peptide displayed on AAV2 improves muscle tropism on systemic delivery. *Gene Ther.* 16, 953–962.
- Yue, Y., Liu, M., and Duan, D. (2006). C-Terminal-Truncated Microdystrophin Recruits Dystrobrevin and Syntrophin to the Dystrophin-Associated Glycoprotein Complex and Reduces Muscular Dystrophy in Symptomatic Utrophin/Dystrophin Double-Knockout Mice. *Mol. Ther.* 14, 79–87.
- Yue, Y., Pan, X., Hakim, C.H., Kodippili, K., Zhang, K., Shin, J.-H., Yang, H.T., McDonald, T., and Duan, D. (2015). Safe and bodywide muscle transduction in young adult Duchenne muscular dystrophy dogs with adeno-associated virus. *Hum. Mol. Genet.* 24, 5880–5890.
- Yuo, C.Y., and Weiner, A.M. (1989). A U1 small nuclear ribonucleoprotein particle with altered specificity induces alternative splicing of an adenovirus E1A mRNA precursor. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3429–3437.
- Zaiss, A.-K., Liu, Q., Bowen, G.P., Wong, N.C.W., Bartlett, J.S., and Muruve, D.A. (2002). Differential Activation of Innate Immune Responses by Adenovirus and Adeno-Associated Virus Vectors. *J. Virol.* 76, 4580–4590.
- Zamaratski, E., Pradeepkumar, P.I., and Chattopadhyaya, J. (2001). A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J. Biochem. Biophys. Methods* 48, 189–208.
- Zamecnik, P.C., and Stephenson, M.L. (1978). Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 280–284.
- Zammit, P.S., Partridge, T.A., and Yablonka-Reuveni, Z. (2006). The Skeletal Muscle Satellite Cell: The Stem Cell That Came in From the Cold. *J. Histochem. Cytochem.* 54, 1177–1191.
- Zhang, X.H.-F., Leslie, C.S., and Chasin, L.A. (2005). Dichotomous splicing signals in exon flanks. *Genome Res.* 15, 768–779.
- Zieve, G.W., Sauterer, R.A., and Margolis, R.L. (1990). Cell Biology of the snRNP Particle. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, 1–46.

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., and Rabinowitz, J.E. (2008). Analysis of AAV Serotypes 1–9 Mediated Gene Expression and Tropism in Mice After Systemic Injection. *Mol. Ther.* 16, 1073–1080.

Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G., Koch, W.J., and Rabinowitz, J.E. (2010). Comparative Cardiac Gene Delivery of Adeno-Associated Virus Serotypes 1-9 reveals that AAV6 Mediates the Most Efficient Transduction in Mouse Heart. *Clin. Transl. Sci.* 3, 81–89.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.* 31, 3406–3415.

Zyprych-Walczak, J., Szabelska, A., Handschuh, L., Górczak, K., Klamecka, K., Figlerowicz, M., and Siatkowski, I. (2015). The Impact of Normalization Methods on RNA-Seq Data Analysis. *BioMed Res. Int.* 2015, 1–10.

MATERIEL ET METHODES

Production des vecteurs AAV

Nos vecteurs AAV8-U7snRNA-E6/8, AAV8-U7-Dtex53 et AAV3b-U7-Jr53 contiennent des cassettes d'expression U7snRNA murines (sous le contrôle du promoteur naturel du U7snRNA murin) portant des séquences antisens ciblant des ESE (exon skipping enhancers) dans *i)* les exons 6 et 8 du gène *dmd* canin ou *ii)* dans l'exon 53 du gène *dmd* humain. Les vecteurs AAV8-U7snRNA-E6/8 et AAV8-U7-Dtex53, injectés chez l'animal ont été produits comme décrit dans Le Guiner et al. (en annexe).

Le AAV3b-U7-Jr53, tous les vecteurs AAV-CMV-GFP et les 7 constructions testées pour l'optimisation de U7 (*RESULTATS PARTIE 1, C-*) ont été produits sur la plateforme de production de vecteurs de l'INSERM UMR1089, par tri-transfection de cellules HEK293 et purifiés par gradients de densité de chlorure de césium.

Animaux et protocoles d'injection de vecteur

Les chiens GRMD présentés dans ce manuscrit sont les mêmes que ceux utilisés dans l'étude de Le Guiner et al. (en annexe). Les primates non-humains (*Macaca fascicularis* de l'île Maurice) ont été obtenus chez Bioprime (Bazège, France). Ils ont été manipulés et hébergés dans le Centre de thérapie génique de Boisbonne (ONIRIS, Atlantic Gene Therapies, Nantes, France). Les primates séronégatifs pour l'AAV8 ont été injectés à l'âge de 30-40 mois selon le même protocole d'injection locorégionale qui a été utilisé chez les chiens GRMD. Les primates ont été euthanasiés 7 ou 90 jours après l'injection du vecteur AAV8-U7-Dtex53, par l'injection intraveineuse de penthobarbital sodique (Dolethal, Vetoquinol, Paris, France).

Culture cellulaire et transduction in vitro

Toutes les cellules ont été cultivées à 37°C et 5% de CO₂.

Les 3 souches de myoblastes primaires humains sont issues de muscles de 3 patients sains et nous ont été données par l'Institut de myologie (Paris). Les cellules ont poussé dans un milieu de culture pour cellules musculaires (Skeletal muscle cell growth medium, Promocell) supplémenté avec divers compléments (SupplementPack, Promocell), 20% de SVF (sérum de veau fœtal) (Hyclone) et 1% de pénicilline/streptomycine (Life technologies). Pour la transduction AAV, 140 000 myoblastes ont étéensemencés dans chaque puits d'une plaque 12-puits. Le lendemain, les cellules ont été transduites avec le vecteur AAV à une MOI de 1^e5 dans un volume de 750µL de milieu. Après 6h d'incubation, 750µL de milieu ont été ajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été récoltées 3 jours après transduction.

La différenciation en myotubes est induite 3 jours après la transduction de myoblastes préalablement ensemencés dans des puits recouverts de gélatine de plaques 12-puits. Le milieu de différenciation est constitué de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) high glutamax (Gibco) supplémenté avec 100 µg/ml d'apo-transferrine humaine (Sigma-Aldrich), 10 µg/ml d'insuline humaine (SAFC biosciences) et 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les cellules ont été gardées 4 jours en différenciation avant d'être récoltées (c'est-à-dire 7 jours après transduction).

Les hépatocytes primaires humains sont commercialisés par Biopredic International (Rennes, France) et ont été obtenus à partir de foies de différents donneurs humains. Les cellules ont été cultivées dans un milieu spécifique de Biopredic. Pour la transduction AAV, 300 000 hépatocytes, déjà ensemencés dans des puits de plaques 24-puits (recouverts de collagène de type I de queue de rat) ont été transduits le jour de la réception avec le vecteur AAV à la MOI 1^e5 , dans un volume de 500 µL de milieu. Après 6h d'incubation, 500 µL de milieu ont été rajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été récoltées à 3 jours post transduction.

Les cellules HepaRG ont été cultivées dans des puits de plaques 24-puits dans du milieu William's E (contenant du sodium bicarbonate sans L glutamine, Sigma-Aldrich) supplémenté comme le décrit l'article de Gripon et al 2002. La différenciation des HepaRG en cellules hépatocytes-like a été induite par ajout de DMSO (dimethyl sulfoxide) (Sigma-Aldrich) 1% puis 2% (Gripon 2002). Pour la transduction AAV, les cellules à confluence ont été transduites avec le vecteur AAV à la MOI de 1^e5 dans un volume de 500 µL de milieu. Après 6h d'incubation, 500 µL de milieu ont été rajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été récoltées à 3 jours post transduction.

Les myotubes primaires canins (isolés à partir de muscle d'un chien sain par l'UMR 703, Nantes) ont été cultivés et transduits selon les mêmes conditions que les myotubes primaires humains (MOI 1^e6).

Les hépatocytes primaires canins ont été isolés du foie d'un chien sain et ensemencés juste après décongélation dans des puits de plaques 24-puits recouverts de collagène (Biocoat). Le milieu de culture est constitué de milieu William's E supplémenté de 1,2% de BSA (bovine serum albumin) (Gibco), 5 µg/mL d'insuline bovine (Sigma-Aldrich), 1.10^{-2} µg/mL de dexaméthasone (Sigma-Aldrich) et 1% de pénicilline/streptomycine/fungizone (Gibco). Le lendemain, les cellules ont été transduites avec le vecteur AAV à la MOI de 1^e6 dans un volume de 500 µL de milieu. Après 6h d'incubation, 500 µL de milieu ont été rajoutés dans chaque puits. Les cellules ont été récoltées à 3 jours post transduction.

Pour la récolte des cellules, le milieu de culture a été aspiré et les cellules rincées au PBS 1X. Puis un petit volume de trypsine (trypsin-EDTA, Sigma-Aldrich) a été ajouté dans chaque puits (200µL/ puits des plaques 24-puits ou 500µL/puits dans les plaques 12-puits). Les cellules ont ensuite été rincées aux PBS 1X (Lonza) et centrifugées pour obtenir des culots secs. Finalement, les culots cellulaires ont été congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Biodistribution des vecteurs

Les analyses de biodistribution chez les chiens *GRMD* sont décrites dans Le Guiner et al (en annexe). La biodistribution de l'AAV8-U7-Dtex53 dans les tissus des primates non-humain a été réalisée par Génosafe (Evry, France). Pour l'extraction d'ADNg à partir de muscles et de foie, le kit Nucleospin 8 virus (Macherey Nagel) a été utilisé. Les analyses ont ensuite été réalisées par QPCR duplex sur un thermocycleur 7900HT Fast Real-Time PCR system (Life Technologies) avec 600 ng d'ADNg de chaque échantillon, en triplicat. Les ADN extraits des tissus des animaux non traités ont été spikés avec 1^e4 copies d'un plasmide contenant la séquence d'intérêt (pFBD_U7-Dtex53). Toutes les réactions ont été réalisées dans un mélange réactionnel final contenant l'ADN, le tampon de réaction « gene expression master mix » (Applied), 0.3 µmol/l de chaque amorce (tableau S6), et 0.15 µmol/l de la sonde Taqman spécifique (tableau S6). Pour chaque échantillon, les valeurs de Ct ont été comparées avec celles obtenues avec une gamme de dilutions d'un plasmide standard (contenant la séquence d'intérêt) afin de déterminer un nombre de copies de vecteur. Pour la normalisation, le nombre de copies d'un gène endogène (albumine de primate) est déterminé par une QPCR, comme décrit ci-dessus en utilisant des amorces et une sonde spécifique (tableau S6). Les résultats sont exprimés en génome viral par génome diploïde (vg/dg).

L'absence d'inhibition de la QPCR en présence d'ADNg a été vérifiée en comparant les Ct obtenus dans chaque échantillon (1^e4 copies de plasmide standard pFBD_U7-Dtex53 ont été ajoutées à des échantillons des primates non traités) et les Ct obtenus dans les puits contenant le plasmide standard dans 600 ng d'ADN de sperme de saumon.

Analyses de l'expression des U7snRNA optimisés par RT-QPCR

Les ARN totaux ont été extraits *i)* à partir des muscles et foies des chiens et primates avec le réactif TRIzol (Ambion) comme décrit dans Le Guiner et al. (en annexe) ou *ii)* à partir des cellules humaines et canines avec le kit Nucleospin® RNA (Macherey Nagel). Les ARN ont ensuite été traités à la DNase I avec le kit TURBO DNA-free (Ambion) et 500 ng d'ARN ont

été rétro-transcrits grâce à des amorces aléatoires (Invitrogen) et la reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen), selon les instructions du fabricant.

Les analyses QPCR ont ensuite été réalisées sur des échantillons d'ADNc dilués 15 fois et avec un thermocycleur StepOne Plus (Applied Biosystems).

Pour les QPCR basées sur la technologie Sybr-green (U7-E6, U7-E8, RPL32), le volume réactionnel d'un volume final de 25 µL contient l'ADNc, le réactif Sybr green (Applied Biosystems) et 0.2 µmol/l de chaque amorce (tableau S6). Pour les autres QPCR, basées sur la technologie Taqman, le volume réactionnel d'un volume final de 25 µL contient l'ADNc, le tampon Premix Ex taq (Takara), 0.4 µl du fluorophore ROX (Takara), 0.25 µmol/l de chaque amorce, et 0.2 µmol/l de la sonde Taqman (tableau S6). Pour les réactions de RT-QPCR U7-Jr53 et U7 WT humain, le tampon réactionnel utilisé est différent puisqu'il s'agit du gene expression master mix (Applied Biosystems). Pour valider l'efficacité de QPCR, une gamme de dilutions d'un plasmide de référence contenant la séquence d'intérêt a été déposée en parallèle des échantillons sur la plaque. Pour vérifier l'inhibition des QPCR en présence d'ADNc, les valeurs de Ct obtenues pour différentes gammes du plasmide de référence ont été comparées (une gamme en présence de 5µL d'ADNc de chaque tissu testé (animal non traité) ou en présence de 5µL d'H₂O).

Pour chaque échantillon, les valeurs de Ct ont été comparées avec celles obtenues pour des RT-QPCR sur des gènes de référence (gènes de ménage exprimés de façon identique entre tous les échantillons): RPL32 (ribosomal protein L32) pour les chiens, HPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) pour les primates non-humain et POLR2L (Polymerase (RNA) II polypeptide L) pour l'Homme (Peters 2007, Ahn 2008, Lakics 2010). Les RQ (relative quantification) ont été calculées selon la méthode du $2^{-\Delta Ct}$ ($RQ = 2^{-(Ct_{\text{cible}} - Ct_{\text{endogène}})}$). L'absence d'inhibition des QPCR en présence d'ADNc a été vérifiée en analysant une gamme de dilutions d'ADNc de chaque tissu et en comparant les facteurs de dilutions théoriques et expérimentaux.

Pour les tests statistiques des figures 43B et 46, étant donné la petite taille des échantillons et le fait que ce soient des données appariées, nous avons utilisé le test des rangs de Wilcoxon. Pour la figure 43B (RQ/vg chiens *GRMD*), nous avons comparé les RQ/vg du foie aux médianes des 2 données RQ/vg des muscles m.FDS et m.FCR de chaque animal. Pour la figure 46 (RQ/vg primates), nous avons comparé les médianes des 3 données RQ/vg du foie (lobe droit, médian et gauche) aux médianes des 4 ou 8 données RQ/vg des muscles (m. TB, m. BB, m. S, m. FCU) de chaque animal.

Analyses de l'expression des U7snRNAs expression par northern blot

Les northern blots ont été réalisés sur 10 ou 20 µg d'ARN total. Les échantillons d'ARN ont été dénaturés à 90°C pendant 3 min et chargés sur un gel constitué d'urée de et polyacrylamide 12%. La migration a été faite par électrophorèse à 5 watts (250V, 25mA) pendant environ 3h30 dans du tampon TBE 1X. Les ARN ont ensuite été transférés sur une membrane Biodyne B (positive) 0,45µm (MP Biomedicals) pendant 1h30 à 20mA dans du TBE 1X (transfert liquide). La membrane a été chauffée 20 min à 70°C puis pré-hybridée 1h30 à 42°C dans 20mL d'un tampon contenant du denhardt (2x final, Invitrogen), tampon SSPE (6x final, Invitrogen), du sodium dodecyl sulfate (0.1% final) et de l'eau.

Pour le radio-marquage des sondes complémentaires, chaque oligonucléotide (100 ng): U7-E6/8 (5'-AGGGGTTTTCCGACCGAAGT-3'), U7-Dtex53 (5'-AGGGGTTTTCCGACCGAAGT-3'), U7 WT canin (5'-GGGGGCTTTCCGGTGAGGAC-3'), U7 WT simien (5'-CAGTGTTACAGCTCTTTTAGAA-3') ou ARN 5S endogène (5'-AAGTACTAACCAGGCCCGAC-3') a été marqué à l'extrémité 5'OH en utilisant du γ-32P-ATP (Perkin Elmer) et la T4 PolyNucleotide Kinase (Invitrogen) pendant 1 heure à 37 °C. Les sondes ont été purifiées sur des colonnes G-25 MicroSpin (GE Healthcare) et ajoutées à la solution d'hybridation dans laquelle se trouve la membrane avant l'incubation d'une nuit à 42°C. Le lendemain, après un lavage rapide à température ambiante, deux lavages successifs ont été réalisés pendant 1h à 42°C. Puis la membrane a été placée dans une cassette avec un autoradiogramme pendant 1 nuit complète (ou 15 min pour la révélation des ARN 5S). Les marquages radioactifs ont été analysés avec un Cyclone Plus Phosphor Imager® (Perkin Elmer) et quantifiés en utilisant l'outil GeneTools. Toutes les manipulations de 32^P ont été réalisées sur la plateforme technique de radioactivité de l'IRS UN (Nantes, France).

Analyse du saut d'exon du messenger dmd

La détection du messenger *dmd* canin a été réalisée via une RT-PCR nichée amplifiant de l'exon 3 à l'exon 10, en utilisant la GoTaq DNA polymerase (Promega), des amorces spécifiques (tableau S6) et des conditions d'amplification précédemment décrites (Vulin 2012). La détection des messagers *dmd* simien et humain a été réalisée via une RT-PCR nichée amplifiant de l'exon 51 à 54, en utilisant la GoTaq DNA polymerase et les conditions d'amplification décrites dans le tableau S6. Une première réaction de PCR a été réalisée avec des amorces « externes » spécifiques (tableau S6) puis 1 µL de la 1^{ère} réaction est réamplifié en dans une 2^{nde} réaction de PCR avec des amorces « internes » (tableau S6). Les produits

PCR ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% et révélés au bromure d'éthidium.

Fractionnement cellulaire, isolation nucléaire et validations par QPCR

Pour le fractionnement cellulaire, les cellules ont été cultivées et récoltées comme décrit précédemment. Après trypsine les cellules ont été culottées à 2000 g à 4°C, lavées avec du PBS 1X et reculottées à 2000g à 4°C. Puis les cellules ont été laissées telles quelles, non fractionnées (protocole témoin négatif) ou bien lysées pour isoler la fraction nucléaire (protocoles 1 à 5), comme décrit ci-dessous. Les manipulations ont été faites sur glace, autant que possible et les toutes les centrifugations à 4°C.

Protocole témoin négatif : les culots cellulaires ont été resuspendus par pipetages répétés dans 800 µL de PBS 1X puis culotées à 200g pendant 5 min. 700 µL du surnageant ont été éliminé et les culots ont été congelés dans l'azote liquide. Un autre témoin a été effectué en culottant simplement les cellules à 2000g, sans pipetage dans le PBS. Les résultats pour ces deux témoins sont similaires.

Protocole 1 : les culots cellulaires ont été resuspendus par pipetages répétés dans 400 µL de tampon de lyse (Reagent A100, Chemometec) avant l'ajout de 400 µL de tampon neutralisant (Reagent B, Chemometec). Après centrifugation à 200g pendant 5 min, 700 µL du surnageant ont été éliminés (fraction cytoplasmique), et le culot cellulaire, correspondant à la fraction nucléaire, a été collecté et congelé dans l'azote liquide.

Protocole 2 : Une étape de resuspension du culot au PBS 1X a été ajoutée par rapport au protocole 1 après la centrifugation à 200 g pour rincer les traces de tampons.

Protocole 3/4 : Remplacement des tampons A et B (Chemometec) du protocole 1 par des tampons « maison » contenant du Nonidet P-40.

Protocole 5 : Ce protocole utilise le kit NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific). Les cellules ont été resuspendues dans 100 µL de solution CER I en vortexant et incubées sur glace pendant 10 min. Puis 5,5µL de solution CER II ont été ajoutés et les échantillons ont été mélangés en vortexant puis incubés 1 min sur glace. Les fractions nucléaires ont été culottées à 16000g pendant 5 min et les culots ont été repris dans 50 µL de NER, vortexés 15 sec, placés sur glace et vortexés 15 sec toutes les 10 min pendant 40 min. Les échantillons ont été centrifugés 10 min à 16 000 g et l'extrait nucléaire a été récupéré (surnageant).

A partir des culots cellulaires (fractions nucléaires), l'ADNg a été extrait et purifié avec le kit Gentra Puregene Blood Core (Qiagen) suivant les instructions du fournisseur (protocole

d'extraction à partir d'un culot cellulaire). Les ADN ont été resuspendus dans un volume final de 25 µL, dosés par mesure de la DO_{260} , et ajustés à 5 ng/µL. Des QPCR Taqman ont été réalisées dans un volume réactionnel de 25 µL contenant 10 µL d'échantillon ADN (50 ng), le tampon Premix Ex taq (Takara), 0.4 µl du fluorophore ROX (Takara), 0.2 µmol/l de chaque amorce ciblant i) le gène humain albumine pour la quantification de l'ADN génomique cellulaire (nucléaire) ou ii) le gène cytochrome B pour la quantification de l'ADN cellulaire mitochondrial (cytoplasmique), et 0.1 µmol/l des sondes Taqman correspondantes (tableau S6). Le nombre de copies a été déterminé en comparant les Ct obtenus à ceux obtenus par une gamme de dilutions (10^2 à 10^8) d'un plasmide de référence (pCQAAV1) contenant toutes les séquences d'intérêt. Les pourcentages de noyaux perdus (a) et de mitochondries restantes (b) ont été calculés comme suit :

- (a) $(100 - (\text{nb copies albumine de l'échantillon} \times 100)) / \text{nb copies albumine dans le témoin}$
(b) $(\text{nb copies cytB de l'échantillon} \times 100) / \text{nb copies cytB dans le témoin}$

Immunomarquage des myotubes

Pour le marquage des myotubes, une lamelle a été placée au fond des puits avant ensemencement des cellules. Sept jours après transduction, les cellules ont été rincées 2 fois au PBS 1X puis fixées à l'éthanol absolu pendant 10 min. Pour saturer les sites de fixation aspécifiques, les myotubes ont été rincés et incubés 30 min dans une solution PBS 1X-SVF 1%. Après de nouveaux rinçages, le marquage de la myosine a été réalisé par un anticorps primaire MF20 (hybridome, Myosin heavy chain, DSHB, Iowa) dilué au 1/300 et incubé 1h. L'incubation avec l'anticorps secondaire a été faite 30 min à l'obscurité avec un anticorps Alexa Fluor 555 anti-souris IgG (Thermo Scientific). Une incubation de 10 min au Dapi (Sigma-Aldrich) dilué au 1/500 permet le marquage des noyaux. Finalement, après plusieurs rinçages, la lamelle a été montée sur lame avec une goutte de Mowiol (Sigma-Aldrich) et séchée plusieurs heures à l'obscurité.

RT-PCR classiques des gènes tissus spécifiques et candidats off-targets

La détection des messagers myoD, myogénine, MYHC3 dans les cellules musculaires et CYP2C9, CYP3A4, albumine et aldolase B dans les cellules hépatiques a été réalisée via des RT-PCR classique en utilisant la GoTaq DNA polymérase (Promega), des amorces spécifiques et des conditions d'amplification indiquées dans le tableau S6. Les produits PCR ont été migrés par électrophorèse sur un gel d'agarose 2% et révélés au bromure d'éthidium.

Prédictions des motifs de fixation de U7-Jr53 à partir d'une base de données

Les cibles imparfaites de la séquence de reconnaissance du U7-Jr53 (CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC) ont été prédites sur l'ensemble des transcrits humains présents dans la banque de donnée Refseq (NCBI, release 20140505) avec l'algorithme miRanda (miRanda v3.3a, Enright 2003, http://cbio.mskcc.org/microna_data/manual.html). Les motifs prédits par miRanda ont été filtrés selon les paramètres suivants : identité $\geq 70\%$, similarité $\geq 80\%$, énergie ≤ -40 kcal/mol. Un pourcentage de couverture du motif prédit sur la taille de la séquence U7-JR53 a également été évalué afin de sélectionner les motifs présentant un pourcentage de couverture $\geq 80\%$. Les motifs prédits par miRanda et répondant à l'ensemble de ces critères ont finalement été sélectionnés.

Préparations des librairies RNAseq et séquençage

La préparation des librairies et le séquençage ont été réalisés par la plateforme de séquençage et microarrays IGBMC, membre du consortium "France Génomique" (ANR-10-INBS-0009). L'ARN total a été isolé à partir des cellules humaines comme décrit précédemment et l'intégrité des ARN a été validée avec le bioanalyser 2100 (Agilent) : tous les échantillons avaient un score de RIN (RNA integrity number) d'au moins 7,5.

Des librairies d'ADNc déplétées en ARN ribosomiques (protocole "Ribozero") ont été préparées en utilisant le kit « TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold Prep » (RS-122-2301, Illumina). En partant de 300 ng d'ARN, la première étape implique l'élimination des ARNr cytoplasmiques et mitochondriaux grâce à des amorces cible-spécifique biotinylées combinées à des billes « Ribo-Zero rRNA removal ». Après purification, l'ARN a été fragmenté en petits fragments en utilisant des cations divalents sous haute température. Les fragments d'ARN ont été rétro-transcrits en un premier brin d'ADNc grâce à une reverse transcriptase et des amorces aléatoires suivi de la synthèse du second brin d'ADNc par une DNA polymérase I et une RNase H.

Les fragments d'ADNc double brin ont été coupés (bouts francs) avec les T4 DNA polymérase, Klenow DNA polymérase et T4 PNK. Un unique nucléotide « A » a été ajouté aux extrémités 3' des fragments francs grâce à une enzyme Klenow (3' à 5'exo minus). Les fragments d'ADNc ont ensuite été ligués à des adaptateurs double brin grâce à la T4 DNA Ligase. Les produits ligués ont été enrichis par amplification PCR (30 sec à 98°C; [10 sec à 98°C, 30 sec à 60°C, 30 sec à 72°C] x 12 cycles; 5 min à 72°C). Le surplus d'amorces PCR a été retiré par purification avec des billes AMPure XP (Beckman Coulter).

Les bibliothèques d'ADNc final ont été validées du point de vue qualité et ont été quantifiées avec le Bioanalyzer 2100.

Pour le séquençage, deux bibliothèques ont été chargées par ligne sur la flow cell Illumina à une concentration de 7pM et les clusters ont été générés en utilisant le Cbot et séquencés sur le HiSeq 2500 (Illumina) comme des reads paillés (paired-end), brin spécifiques et de 100 bases selon les instructions d'Illumina. L'analyse des images et la désignation des bases a été réalisée en utilisant RTA 1.18.61 et CASAVA 1.8.2.

Pré-traitement des données

L'assemblage du génome humain (GRCh38 primary assembly), les séquences des transcrits humains et les fichiers d'annotations ont été extraits de la dernière version de Gencode ([Release 23 GRCh38.p3](#)) (Harrow 2012).

Les données brutes BCL des échantillons ont été dé-multiplexées avec CASAVA (Illumina) selon leur code-barres et ont été stockées dans des fichiers fastq indépendants. Un sous-ensemble de reads a été aligné pour sélectionner les séquences ADN/génomiques pour évaluer la présence de contamination dans les échantillons en utilisant [FastQScreen 0.5.0](#). Après un contrôle général de la qualité des séquences en utilisant [FastQC v0.10.1](#), les fichiers fastq ont été filtrés avec [Cutadapt 1.8.1](#) en mode « paired-end » pour nettoyer les séquences avec des extrémités de mauvaise qualité (`-q 30,30`) et celles contenant des fragments d'adaptateurs, des polyA/T (`-a file:adapters.fa -A file:adapters.fa`) ou bases N (`--trim-n`). Finalement, les séquences plus courtes que 25pb après filtration sont éliminées du dataset (`-m 25`). Après cette étape de filtration, une amélioration significative de la qualité des datasets est observée.

Alignement sur le génome humain

L'alignement des reads a été réalisé avec [STAR 2.4.2a](#) (Dobin 2013). Premièrement, un index a été créé en utilisant les options recommandées pour le génome humain avec un fichier d'annotations gff (STAR `--runMode genomeGenerate --genomeDir ./ --genomeFastaFiles GRCh38.primary_assembly.genome.fa --sjdbGTFfile gencode.v23.primary_assembly.annotation.gff3 --sjdbOverhang 100 --sjdbGTFtagExonParentTranscript Parent`). L'étape d'alignement, le traitement des reads avec [samtools 1.2](#), [samstat 1.5](#) et [bedtools 2.17.0](#), et le comptage des reads par gène avec [HTSeq 0.6.1](#) ont été automatisés avec un script bash disponible sur https://github.com/alslide/BASH_NGS_Tools/blob/master/RNAseq_U7_pipeline.sh. Excepté pour le MAPQ (`mapping quality`) qui a été fixé à plus de 30 au minimum, toutes les autres options sont

encodées directement dans le script. En plus des fichiers de sortie de STAR, le script génère des bedgraph, des bam triés, des index de bam, des contrôles qualités de bam et des fichiers de comptage des reads par transcrits. Un résumé des statistiques de STAR, de la distribution de la qualité d'alignement et des comptages de reads par chromosome sont disponibles dans les tableaux [SZ1](#), [SZ2](#), [SZ3](#).

Analyse différentielle d'épissage

L'analyse de l'épissage différentiel repose sur l'utilisation du comptage du nombre de reads chevauchant une jonction particulière. Cette analyse est appelée jonction centrique par opposition à l'analyse exon centrique utilisée d'ordinaire, où l'abondance relative des exons est comparée. L'analyse jonction centrique a été récemment décrite (Li 2015). Le paquet « DEXSeq » initialement développé pour l'analyse exon centrique est utilisé sans modification pour l'analyse jonction centrique (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DEXSeq.html>).

Brièvement, les jonctions identifiées par le RNASeq sont quantifiées lors de l'étape d'alignement par starmapper. Dans un deuxième temps les jonctions sont annotées en fonction de leur position chromosomique (nom du chromosome, début et fin des coordonnées génomiques et information du brin) et attribuées à un gène donné. Seules les jonctions non-ambiguës (c'est-à-dire ne pouvant pas se trouver sur 2 gènes différents) sont utilisées.

Une analyse différentielle est alors conduite. Les jonctions différentielles sont sélectionnées sur la base d'un test de Wald ajusté pour test multiple (FDR <0.05).

Analyse d'expression différentielle

Les données de comptage par gènes ont été générées par HTSEQ sur la base de l'annotation gencode.v23.primary_assembly.annotation.gff3. L'analyse de l'expression différentielle a été conduite en utilisant le paquet R « DESEQ2 » disponible sur bioconductor (<https://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/DESeq2.html>). Les gènes codant des protéines et les lincRNA ont été inclus dans l'analyse. Les gènes différentiellement exprimés sont sélectionnés sur la base d'un test de Wald ajusté pour test multiple (FDR <0.05).

Prédictions in silico des cibles potentielles off-target de U7-Jr53

Pour prédire les possibles impacts de U7-Jr53 sur la stabilité des ARNm matures dans le cytoplasme par RNA interférence, des prédictions ont été réalisées sur les transcrits humains extraits de Gencode. Afin de recueillir davantage d'informations, le nom des transcrits dans

les fichiers fasta ont été enrichis grâce au fichier d'annotation gff, en utilisant un notebook ipython ([FastaEnhanceFromGff](#)). Ce dataset est référencé comme “*gencode_v23_transcripts_enhanced*”.

Pour prédire les possibles impacts de U7-Jr53 sur les dérégulations d'épissage des ARNm, les séquences des exons ont été extraites de la séquence du genome humain à partir des annotations gencode en utilisant GffFastaExtractor du package [TargetPredict](#) (voir [GffFastaExtractor report](#) pour les paramètres utilisés). Les séquences d'exons ont été étendues de 100 pb en amont et en aval pour inclure les éléments de régulation de l'épissage introniques. Les régions exoniques étendues qui se chevauchaient ont été fusionnées pour éviter de rapporter plusieurs fois des mêmes cibles génomiques. Ce dataset fasta est référencé comme “*GRCh38_gencode_Offset-100_Features-exon_Chrom-all_fused*”.

Les cibles imparfaites de la séquence de reconnaissance du U7-Jr53 (CATTCAACTGTTGCCTCCGGTTCTGAAGGTGTTCTTGTAC) ont été recherchées dans les datasets de séquences obtenues comme décrit ci-dessus en utilisant [TargetPredict](#), disponible avec sa documentation à l'adresse <http://a-slide.github.io/TargetPredict/>. Les rapports contenant les paramètres utilisés pour le programme et les résultats bruts sont disponibles pour les deux dataset (*gencode_v23_transcripts_enhanced* et *GRCh38_gencode_Offset-100_Features-exon_Chrom-all_fused*) sur [LIEN 1](#) et [LIEN 2](#).

Croisement des résultats d'analyses des gènes ou des jonctions différentiels et des prédictions in silico

Afin d'identifier les gènes différentiellement exprimés pouvant être associés à des sites off-target du U7-Jr53, l'ensemble des off-targets potentielles définies par miRanda a été confronté à l'ensemble des gènes différentiels définis dans les myotubes ou les hépatocytes. Les gènes présents dans les deux ensembles sont considérés comme cibles off-target potentielles différentiellement exprimées.

Afin d'identifier les jonctions pouvant être topologiquement associées à un site off-target du U7-Jr53, nous avons recherché si les jonctions différentiellement utilisées chevauchaient des régions exoniques étendues présentant des sites de fixation off-target potentiels définis soit par miRanda soit par Blast.

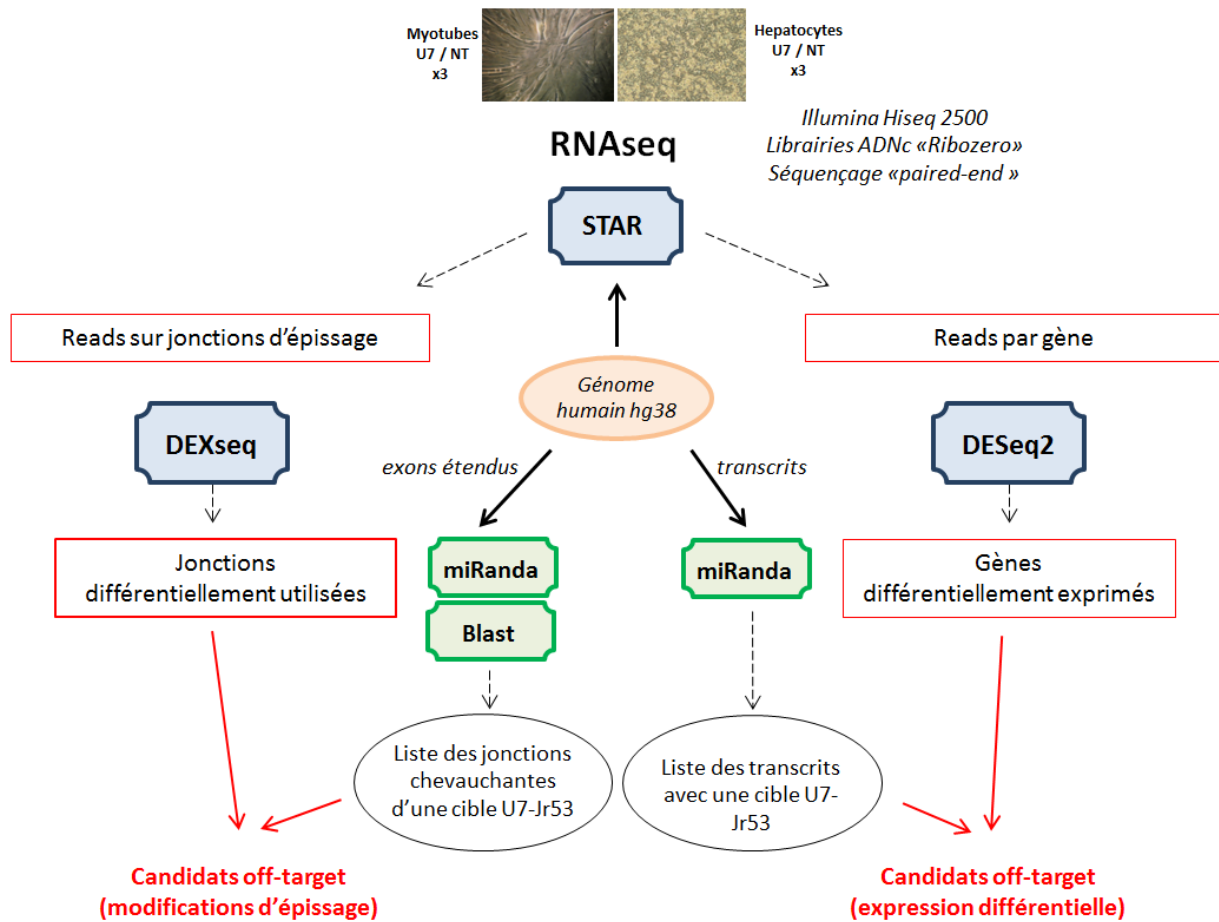


Figure 72 : Représentation schématique de la méthodologie d'analyse des effets off-targets spécifiques du U7snRNA-Jr53 après analyse RNAseq. Après séquençage des échantillons, les reads sont alignés sur le génome humain (version hg38) avec l'outil STAR. Les données de reads jonctionnels sont analysées par DEXseq pour quantifier les jonctions différentiellement utilisées alors que les données de reads par gène sont analysées par DESeq2 pour quantifier l'expression différentielle des gènes. Les outils d'alignement miRanda et Blast fournissent des prédictions de cibles de fixation pour U7-Jr53 sur les exons étendus ou sur les transcrits. Les gènes candidats off-targets qui ont subi une modification d'épissage ou qui ont une expression différentielle sont définis après croisement des données *in silico* et des résultats de DEXseq et DESeq2, respectivement.

ANNEXES

Publication Caroline Le Guiner et al. 2014

Le Guiner, C., Montus, M., Servais, L., Cherel, Y., Francois, V., Thibaud, J.-L., Wary, C., Matot, B., Larcher, T., Guigand, L., et al. (2014). Forelimb Treatment in a Large Cohort of Dystrophic Dogs Supports Delivery of a Recombinant AAV for Exon Skipping in Duchenne Patients. *Mol. Ther.* 22, 1923–1935.

Tableau S1 : Liste des 39 gènes candidats off-targets du U7snRNA-Jr53, d’après les prédictions in silico de miRanda.

Tableau S2 : Liste des jonctions différenciellement utilisées dans les myotubes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DEXseq)

Tableau S3 : Liste des jonctions différenciellement utilisées dans les hépatocytes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DEXseq)

Tableau S4 : Liste des gènes différenciellement exprimés dans les myotubes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DESeq2)

Tableau S5: Liste des gènes différenciellement exprimés dans les hépatocytes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DESeq2)

Tableau S6 : liste des amorces et conditions de PCR/QPCR

Forelimb Treatment in a Large Cohort of Dystrophic Dogs Supports Delivery of a Recombinant AAV for Exon Skipping in Duchenne Patients

Caroline Le Guiner^{1,2}, Marie Montus², Laurent Servais³, Yan Cherel⁴, Virginie Francois¹, Jean-Laurent Thibaud^{5,6}, Claire Wary⁵, Béatrice Matot⁵, Thibaut Larcher⁴, Lydie Guigand⁴, Maeva Dutilleul⁴, Claire Domenger¹, Marine Allais¹, Maud Beuvin⁷, Amélie Moraux⁸, Johanne Le Duff¹, Marie Devaux¹, Nicolas Jaulin¹, Mickaël Guilbaud¹, Virginie Latournerie², Philippe Veron², Sylvie Boutin², Christian Leborgne², Diana Desgue², Jack-Yves Deschamps^{4,9}, Sophie Moullec⁹, Yves Fromes⁹, Adeline Vulin¹⁰, Richard H Smith¹¹, Nicolas Laroudie², Frédéric Barnay-Toutain², Christel Rivière², Stéphanie Bucher², Thanh-Hoa Le², Nicolas Delaunay², Mehdi Gasmi², Robert M Kotin¹¹, Gisèle Bonne^{7,12}, Oumeya Adjali¹, Carole Masurier², Jean-Yves Hogrel⁸, Pierre Carlier⁵, Philippe Moullier^{1,2,13} and Thomas Voit⁷

¹Atlantic Gene Therapies, INSERM UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France; ²Généthon, Evry, France; ³Institut de Myologie, Service of Clinical Trials and Databases, Paris, France; ⁴Atlantic Gene Therapies, INRA UMR 703, ONIRIS, Nantes, France; ⁵Institut de Myologie, Laboratoire RMN, AIM & CEA, Paris, France; ⁶UPR de Neurobiologie, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons Alfort, France; ⁷Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Pierre and Marie Curie Paris 6 UPMC-INSERM UMR 974, CNRS FRE 3617, Paris, France; ⁸Institut de Myologie, Neuromuscular Physiology and Evaluation Laboratory, Paris, France; ⁹Atlantic Gene Therapies, Centre de Boisbonne, ONIRIS, Nantes, France; ¹⁰Research Institute, Center for Gene Therapy, Nationwide Childrens Hospital, Columbus, Ohio, USA; ¹¹Laboratory of Molecular Virology and Gene Therapy, National Heart Lung and Blood Institute, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA; ¹²AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, U.F. Cardiogénétique et Myogénétique, Service de Biochimie Métabolique, Paris, France; ¹³Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida, Gainesville, Florida, USA

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe muscle-wasting disorder caused by mutations in the dystrophin gene, without curative treatment yet available. Our study provides, for the first time, the overall safety profile and therapeutic dose of a recombinant adeno-associated virus vector, serotype 8 (rAAV8) carrying a modified U7snRNA sequence promoting exon skipping to restore a functional in-frame dystrophin transcript, and injected by locoregional transvenous perfusion of the forelimb. Eighteen Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dogs were exposed to increasing doses of GMP-manufactured vector. Treatment was well tolerated in all, and no acute nor delayed adverse effect, including systemic and immune toxicity was detected. There was a dose relationship for the amount of exon skipping with up to 80% of myofibers expressing dystrophin at the highest dose. Similarly, histological, nuclear magnetic resonance pathological indices and strength improvement responded in a dose-dependent manner. The systematic comparison of effects using different independent methods, allowed to define a minimum threshold of dystrophin expressing fibers (>33% for structural measures and >40% for strength) under which there was no clear-cut therapeutic effect. Altogether, these results support the concept of a

phase 1/2 trial of locoregional delivery into upper limbs of nonambulatory DMD patients.

Received 28 February 2014; accepted 14 July 2014; advance online publication 9 September 2014. doi:10.1038/mt.2014.151

INTRODUCTION

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is the most frequent muscular dystrophy in childhood, affecting 1 in 3,500 to 5,000 male births. DMD is a progressive degenerative disease caused by mutations in the *dmd* gene encoding dystrophin located on the X chromosome. Dystrophin is required for the assembly of the dystrophin-glycoprotein complex, and provides a strong mechanical link between the cytoskeleton and the extracellular matrix. Absence of dystrophin results in myofiber degeneration and necrosis, progressive muscle weakness and fatigability, and finally premature death.¹ Several therapeutic approaches including antisense oligonucleotide (AO)-based exon skipping are currently investigated, but yet there is no curative treatment available for DMD.²

The majority of the DMD patients carry reading-frame altering mutations of the *dmd* gene resulting in loss of dystrophin expression. When a mutation maintains the reading frame and the most critical parts of the gene, a truncated but still functional dystrophin protein is expressed, leading to the less severe phenotype of Becker muscular dystrophy (BMD).³ The selective removal of exons (*i.e.*,

The first three authors contributed equally to this work as first authors and the last two authors contributed equally to this work as senior authors. Correspondence: T Voit, Institut de Myologie, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Université Pierre and Marie Curie Paris 6 UPMC-INSERM UMR 974, CNRS FRE 3617, Paris, France. E-mail: t.voit@institut-myologie.org or P Moullier, Atlantic Gene Therapies, INSERM UMR 1089, Université de Nantes, CHU de Nantes, Nantes, France. E-mail: moullier@ufi.edu

exon skipping) flanking an out-of frame DMD mutation can result in in-frame mRNA transcripts that may be translated into an internally deleted dystrophin protein with therapeutic activity.⁴ In theory, exon skipping could rescue more than 80% of DMD patients, including those with deletion mutations, nonsense mutations and duplications. Even if single and double exon skipping has essentially been efficiently used until now, 70% of the DMD patients could be cured by multiple skipping of exons 45 to 55 in the dystrophin messenger.⁵ Exon skipping can be achieved using chemically modified AOs or small nuclear RNAs (snRNAs). In both cases, sequences are designed to bind complementary sequences in the targeted mRNA, which will modify pre-mRNA splicing to correct the reading frame of a mutated transcript.⁴ If a relative efficacy of chemically modified AOs was obtained in DMD patients,^{6–8} a recent phase 3 clinical trial using AOs was unable to show a statistically significant clinical improvement in the treated patients compared to placebo.⁹ Moreover, as AOs have short biological half-lives, they must be regularly administered and severe adverse events were observed in some instances.^{7,8} An alternative approach is to clone AOs within a modified snRNA sequence, which allows a proper subcellular localization and facilitates AO inclusion into the spliceosome. The U7snRNA, a nonspliceosomal molecule that is normally involved in the processing of the 3' end of histone mRNAs, can be engineered and redirected to the spliceosome to deliver antisense sequences.¹⁰ Such snRNA can be packaged in recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors, allowing a long-lasting repair without the need for continuous administration.¹¹ The proof of principle of such a correction was obtained in the dystrophin-deficient *mdx* mouse and GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy) dog models, after injection of rAAV1 or rAAV6 vectors carrying a specific U7snRNA expression cassette into skeletal or cardiac muscles.^{12–16}

Here, we present the first study that provides the safety profile and the therapeutic index obtained in GRMD dogs and designed to translate the rAAV-U7-mediated exon skipping approach into the clinic for man. The GRMD dog is the most relevant DMD animal model due to the homology with the human disease.¹⁷ The dystrophic phenotype results from a point mutation in the acceptor splice site of intron 6 of the canine *dmd* gene, causing skipping of exon 7 during processing of the dystrophin messenger, disruption of the reading frame and premature termination of translation.¹⁸ Removing exons 6 through 8 restores a correct reading frame and rescues a dystrophin protein, missing 158 amino-acids in its N-terminal actin binding domain, but still functional.^{13,15,16} In the GRMD model, our therapeutic product was defined as a rAAV8 vector carrying a modified U7snRNA specific for the skipping of exons 6 to 8 of the dystrophin transcript (rAAV8-U7snRNA-E6/E8). For the transduction of large muscular territories, the mode of delivery was the one intended for our future application in human, *i.e.*, the locoregional transvenous perfusion of the forearm. Several studies have shown that rAAV-mediated transduction of an entire limb was achieved by one single locoregional transvenous perfusion during which the limb is transiently isolated from the general circulation by an atraumatic tourniquet.^{15,19–21} Recently, the safety profile of such a mode of delivery was further confirmed in neuromuscular disease patients receiving saline solution in the lower limb.²² Although, treating systemic diseases such as DMD will ultimately

require widespread muscle transduction including the heart and the diaphragm, we believe that until systemic administration of rAAV vector is comprehensively assessed in preclinical settings, the present locoregional delivery route to the forelimb(s) is an intermediate step indicated in nonambulatory DMD patients to maintain muscle strength and function in the forearm.

In the present study, rAAV8-U7snRNA vector was delivered to 18 juvenile GRMD dogs by locoregional transvenous injection into one forelimb. Increasing doses infused in various volumes and at different flow rates, were used (i) to define the therapeutic dose of rAAV8-U7snRNA-E6/E8, (ii) to set up the injection protocol, and (iii) to assess the safety profile of both the gene therapy vector and the mode of delivery, modeling precisely what is intended to be used in man.

RESULTS

Study design

Eighteen 3- to 4-month-old GRMD dogs were injected in one forelimb via locoregional transvenous infusion (Table 1), with increasing doses (from 5^E12 vg/kg to 5^E13 vg/kg) of a rAAV8-U7snRNA-E6/E8 vector. Three control GRMD dogs were also included and received the vehicle only. To set up our injection protocol on the basis of what was recently documented in patients with neuromuscular diseases,²² the total perfusion volume was either 40 or 20% of the limb volume. Animals of group 6 received the vector at a flow rate of 35 ml/minute compared to 7–20 ml/minute for all other groups. The quality control testing of the rAAV batches used in the study is provided in Supplementary Table S1.

All animals were followed for ~3.5 months postinjection before euthanasia, except for D5, D12, and D17, which had to be sacrificed between 2 and 2.5 months postinjection due to gastrointestinal disorders, frequently associated with the morbidity of this model and not related to our treatment. Indeed there was no evidence for vector toxicity at necropsy analysis and pathology examination of these three dogs.

Blood tests and clinical assessment show good safety profile of the vector upon locoregional delivery

Locoregional transvenous injection was eventless in all dogs. The venous pressure was monitored at the level of the catheter. Maximal pressures, reached few minutes after the beginning of vector delivery, were ~380 mm Hg, ~150 mm Hg, and ~280 mm Hg, when the volume of the perfusate and the flow rate were respectively 40% of the limb volume at 10–20 ml/minute, 20% of the limb volume at 10–20 ml/minute, and 20% of the limb volume at 35 ml/minute (Table 1).

Blood tests including electrolytes, kidney, and liver function parameters and complete hematology counts remained unchanged in the hours, days, and weeks after vector delivery. No adverse effect related to the injection and/or the product itself was noted on the clinical status of the dogs (data not shown). As a key component of the safety profile of both the delivery protocol and the gene therapy vector itself, the inflammatory cytokines interleukin IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-15, interferon- α , and tumor necrosis factor- α were measured in the plasma, from 6 hours until 2 weeks after injection and at sacrifice. We found no significant increase of any of them compared to the preinjection levels (data not shown).

Table 1 Characteristics of the different Golden Retriever Muscular Dystrophy dogs of this study

Group	Dog	Volume % limb	Type of injection and dose	Flow rate (ml/minute)	Injected rAAV batch	Maximal line pressure (mm Hg)	Segmental limb volume (ml)	Injected volume (ml)	Injected volume (ml/kg)
Control	C1	40 ^b	Buffer	19	N/A	382	/	110	12
Group 1	D1	40	rAAV8-U7-E6/E8 5 ^{E12} vg/kg	8	STR18	381	135	54	12
	D2	40		8	STR18	361	230	105	12
Group 2	D3	40 ^b	rAAV8-U7-E6/E8 1 ^{E13} vg/kg	10	STR18	354	/	110	12
	D4	40 ^b		7	STR18	353	/	81	12
	D5 ^a	40		12	A.10001	300	250	99	12
Group 3	D6	40 ^b	rAAV8-U7-E6/E8 5 ^{E13} vg/kg	20	STR16	500	/	140	12
	D7	40 ^b		20	A.10001.DEV	355	/	120	12
	D8	40 ^b		13	STR17	416	/	105	12
Control	C2	20	Buffer	10	N/A	108	325	65	6
	C3	20		10	N/A	146	280	57	6
Group 4	D9	20	rAAV8-U7-E6/E8 1 ^{E13} vg/kg	10	STR18	160	250	51	7
	D10	20		10	STR18	173	320	65	6.5
	D11	20		10	A.10001.DEV	124	340	69	6.5
	D12 ^a	20		10	A.10001	190	310	65	7
Group 5	D13	20	rAAV8-U7-E6/E8 5 ^{E13} vg/kg	10	A.10001.DEV	132	300	60	6
	D14	20		10	A.10002.STD	108	300	61	6
	D15	20		10	A.10001	190	310	63	6
Group 6	D16	20	rAAV8-U7-E6/E8 1 ^{E13} vg/kg	35	STR18	300	260	47	6
	D17 ^a	20		35	A.10002.DEV	300	240	42	6.5
	D18	20		35	A.10002.DEV	248	370	69	6

^aAnticipated sacrifice. ^bVolume % limb estimated (extrapolation from the injected volume) /, not determined.

Locoregional delivery leads to wide spread dose dependent transduction mostly below the tourniquet

Using a quantitative PCR (Q-PCR) specific for the transgene sequence, vector biodistribution was assessed at euthanasia in 13 muscles of each forelimb, as well as in several muscles at distance (total of 46 muscles) and in major organs (Supplementary Table S2). No Q-PCR signal was detected on whole blood at euthanasia (data not shown) confirming that vector genome detection was restricted to the tissue itself. The numbers of vg/dg (vector genome per diploid genome) in each of the rAAV-injected dogs were plotted on Figure 1a. As vector dose increased, the number of vg/dg proportionally increased with less than 1 copy, ~1 to ~3 copies and ~3 to ~15 copies per dg following the administration of respectively 5^{E12} vg/kg, 1^{E13} vg/kg, and 5^{E13} vg/kg of rAAV vector. The latter including groups 3 and 5, had significantly more vg/dg as compared to the lowest two doses administered, whatever the injection volume was ($P < 0.05$). Simultaneously, the coefficient of variation (CV), which reflects the heterogeneity of the values, decreased as the vector dose increased, while injected in a large volume (40% of the limb volume). In contrast, when the perfusate was reduced to 20% of the limb volume, the CVs were higher, indicating that reducing the injected volume resulted in a less homogeneous transduction pattern. Finally, when the flow rate was increased to 35 ml/minute, neither the number of vg/dg in the injected limb nor the CV were significantly improved.

Consistent with the fact that the locoregional transvenous administration procedure cannot entirely prevent leakage beyond the tourniquet, shedding of the vector was detected after injection (Supplementary Table S3). In the muscles just above the tourniquet as well as in muscles at distance, the vg/dg numbers were at least one log lower than in the injected forelimb. Liver and to a lesser extent lymph nodes and spleen exhibited near-equivalent levels of vg/dg numbers to the exposed transduced forelimb (Figure 1b).

Skipped dystrophin messenger is present in transduced muscles

Using a specific nested RT-PCR, dystrophin messenger RNA molecules were characterized from various muscles. Irrespective of the protocol used for the injection of 1^{E13} vg/kg or 5^{E13} vg/kg of rAAV8-U7snRNA-E6/E8 vector, RT-PCR showed skipped dystrophin messengers lacking exons 6, 7, and 8 (Figure 2b,c). RT-PCR product identity was confirmed by sequencing (data not shown). The 5^{E13} vg/kg vector dose resulted in fully skipped messenger, *i.e.*, no residual nonskipped dystrophin messenger detectable (Figure 2c), whereas the 1^{E13} vg/kg dose resulted in partial skipping of the dystrophin messenger (Figure 2b). Skipping was undetectable in animals receiving the lowest dose (Figure 2a). In the GRMD dogs injected with the highest dose of vector, partial exon skipping was also detected in some muscles of the contralateral forelimb, in the diaphragm and occasionally in the heart

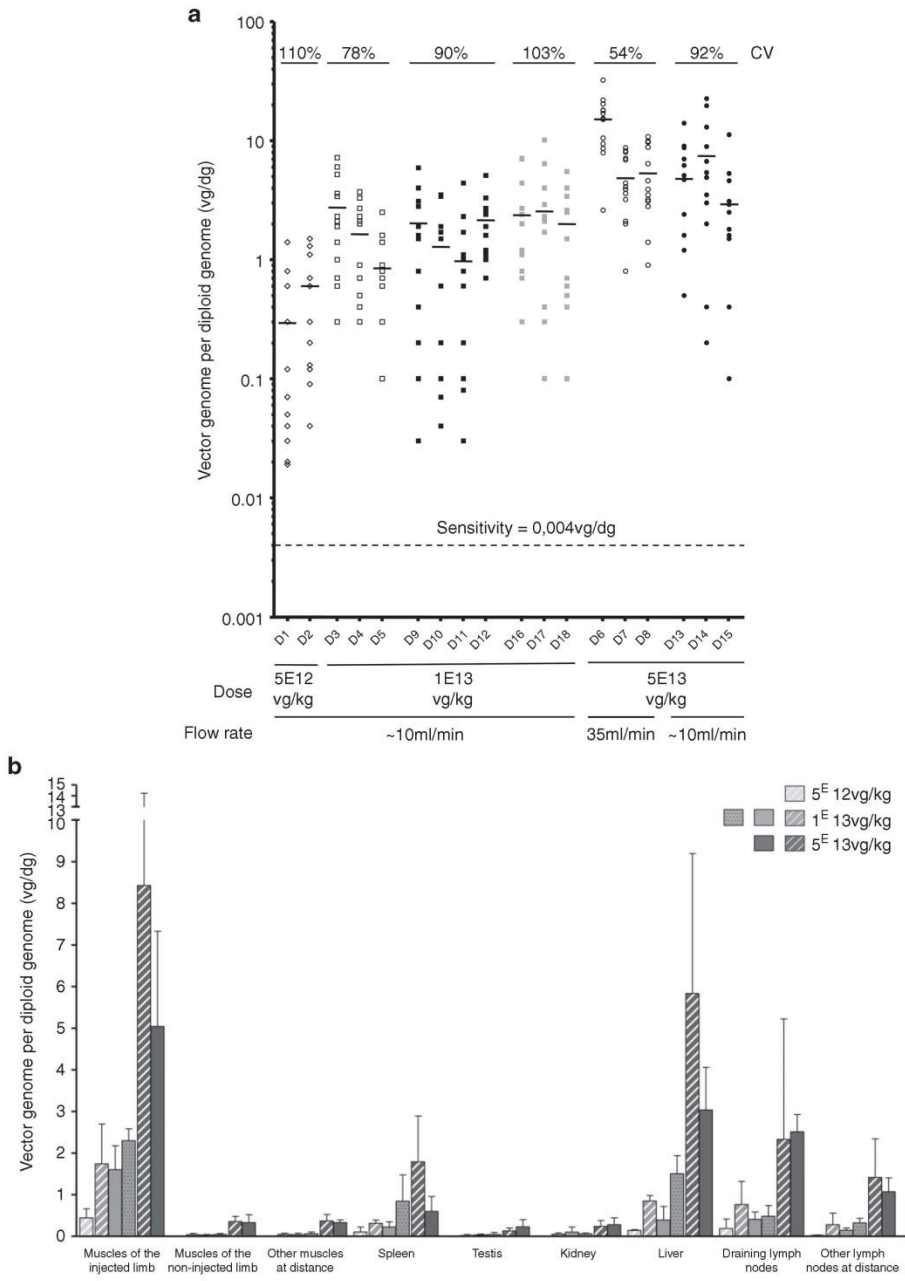


Figure 1 Vector biodistribution in the injected forelimb and at distance. **(a)** Vector copy number per diploid genome in each muscle of the injected forelimb of each rAAV-injected dog at euthanasia. A total of 13 muscles were analyzed in the injected limb. Each point represents the vector copy number per diploid genome in each muscle of the injected limb. Empty symbols were used for the groups of dogs injected with 40% of the limb volume (groups 1, 2, and 3), and full symbols were used for the groups of dogs injected with 20% of the limb volume (groups 4, 5, and 6). The small horizontal bars represent the mean of the values obtained for each dog. No signal was detected (<0.004 vg/dg) in the muscles of the control dogs. CV, coefficient of variation within the injected forelimbs. **(b)** Vector copy number per diploid genome in different tissues of the different groups of dogs at euthanasia. For each dog, the analysis was performed on 13 muscles of the injected forelimb, on 13 muscles of the noninjected forelimb, on 20 muscles at distance (muscles of hind limbs ($n = 2$), muscles of the body ($n = 15$), heart ($n = 2$) and diaphragm), on spleen ($n = 1$), on testis ($n = 2$), on kidney ($n = 1$), on liver ($n = 3$), on draining lymph nodes ($n = 2$), and on other lymph nodes at distance ($n = 5$). Each bar of the histogram represents the mean (with standard deviations) of the results obtained in the different dogs of a same group. Striped bars were used for the groups of dogs injected with 40% of the limb volume (groups 1, 2, and 3). Full bars were used for the groups of dogs injected with 20% of the limb volume and a flow rate of 10ml/minute (groups 4 and 5), and punctuated bars were used for the groups of dogs injected with 20% of the limb volume and a flow rate of 35ml/minute (group 6). No signal was detected (<0.004 vg/dg) in the tissues of the control dogs (data not shown).

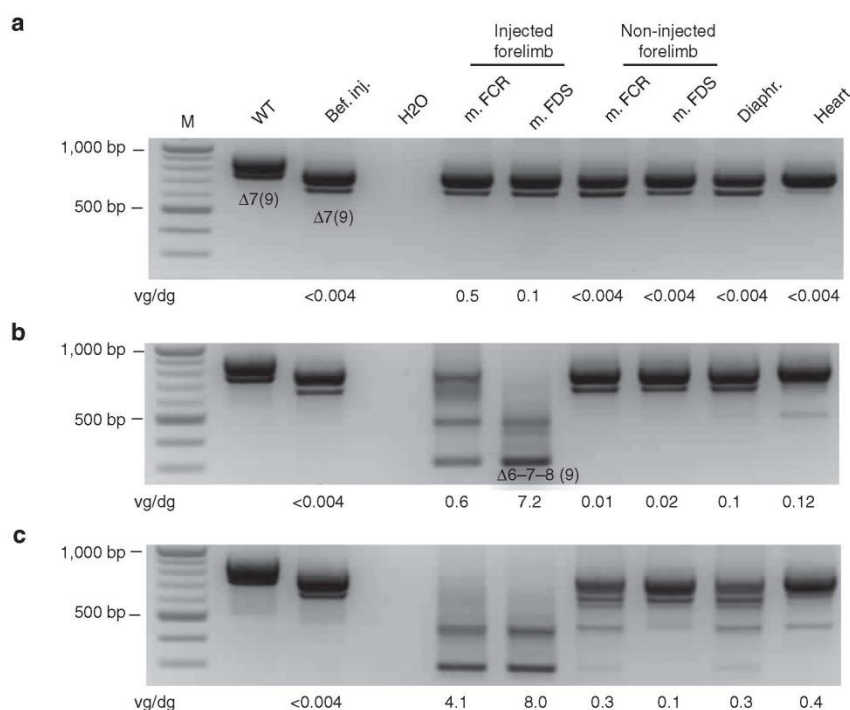


Figure 2 Dystrophin messenger analysis in muscles. Representative results are presented for one dog of each injected dose: (a) 5^E12 vg/kg: D1, (b) 1^E13 vg/kg: D3, and (c) 5^E13 vg/kg: D7. The dystrophin messenger was detected by nested RT-PCR from exon 3 to 10 in muscles sampled at euthanasia (m. FCR = muscle flexor carpi radialis; m. FDS = muscle flexor digitorum superficialis; diaphragm and heart). The PCR products (910 bp and 778 bp fragments) detected in healthy (WT) dog correspond to mRNA variants with or without the alternative exon 9.⁵⁰ The PCR products (791 bp and 659 bp fragments) detected in the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dogs before injection (bef. inj.) correspond to mRNA variants lacking either exon 7 or exons 7 and 9, respectively.¹⁸ After injection, the two new bands (436 bp and 304 bp fragments) detected in some muscles correspond to in-frame mRNAs lacking exons 6 to 8 and 6 to 9, respectively. The copy numbers of vector genome per diploid genome detected by Q-PCR on gDNA from the same tissue sample are indicated under each panel. No skipping was detected in the muscles of the control dogs.

(Figure 2c). Finally and although the nested RT-PCR approach is not quantitative, there was an obvious correlation between the skipping efficiency and the number of vg/dg found in each muscle.

Dystrophin is expressed at high levels in transduced muscles

The same muscle samples processed for vg/dg determination (Supplementary Table S2) were used to evaluate dystrophin expression. Figure 3a shows representative immunofluorescence images obtained in dogs injected with the different vector doses and Table 2 summarizes the results obtained by counting of the percentage of dystrophin positive fibers after immunoperoxidase staining. As vector dose rose, the percentage of dystrophin-positive fibers found in the perfused forelimb proportionally increased from 18% (group 1), 23, 35, and 36% (groups 4, 2, and 6) and 58 and 76% (groups 5 and 3). The high-dose groups (groups 3 and 5) had significantly higher percentages compared to the other groups ($P < 0.05$). Moreover, when the injection volume was reduced, a significant difference in levels of dystrophin-positive fibers was observed only between the two groups that had received this highest vector dose ($P < 0.05$). When GRMD dogs received the intermediate vector dose (1^E13 vg/kg) at a constant 20% limb volume, the increase of flow rate up to 35 ml/minute resulted in a significant increase in the percentage of dystrophin-positive fibers

($P < 0.05$). Consistent with the vg/dg findings described above, CVs were lower at the highest vector doses administered either in the 20 or 40% limb volume. Representative examples of the heterogeneity of dystrophin expression patterns within a same injected forelimb, correlated with the analysis of dystrophin messenger exon skipping in the same muscles, are given on Supplementary Figure S1. Finally, increasing the flow rate up to 35 ml/minute seemed to partially improve dystrophin-labeling homogeneity (Table 2). Beyond the tourniquet and at distant sites, significant levels of dystrophin-positive fibers were also found essentially in the animals that had received the highest vector dose. As shown on Supplementary Figure S2, the relationship between the percentage of dystrophin positive fibers and the number of vg/dg detected in each muscle of injected limbs, displayed a nice linear regression, 40% of positive fibers being detected with ≈ 1 vg/dg.

Of note, the majority of the dystrophin-positive fibers, showed a staining intensity, which was comparable to that observed in healthy muscle (Figure 3a). Along with the presence of dystrophin, components of the dystrophin-associated protein complex (*i.e.*, β -dystroglycan, β -sarcoglycan, and γ -sarcoglycan) were restored at the periphery of the muscle fibers and consistent with the dystrophin expression pattern, utrophin-staining signal was inversely proportional (data not shown). Each dog also had a western blot performed on total protein extracts from muscles of

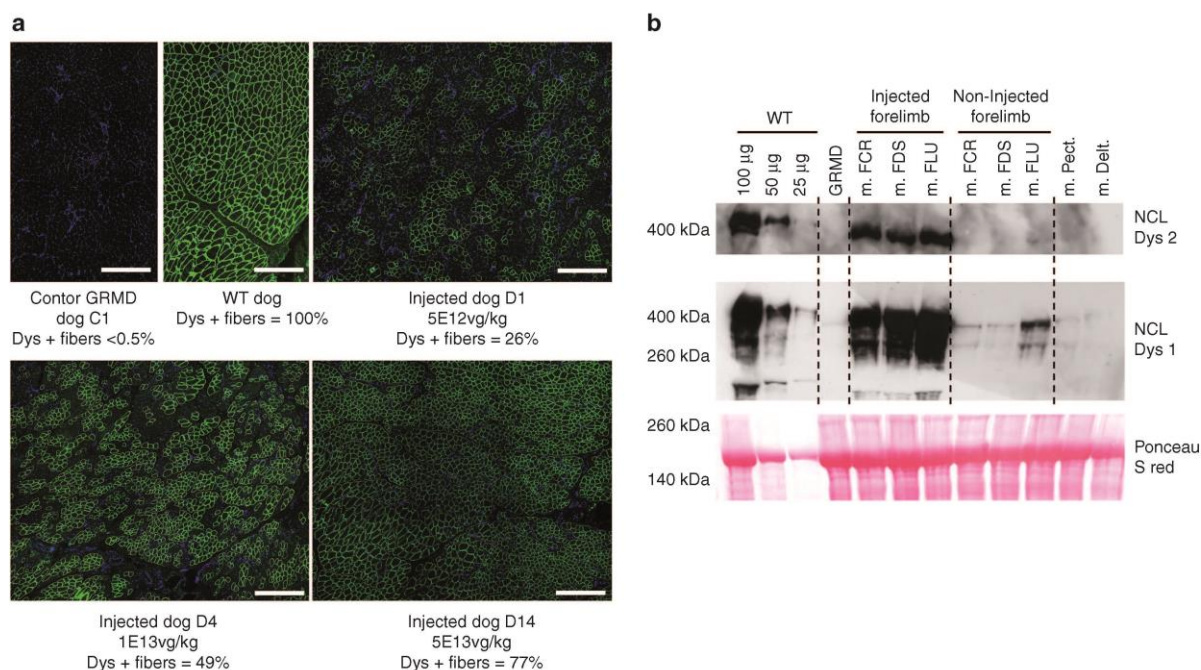


Figure 3 Analysis of dystrophin expression in muscles by immunostaining and western-blot analysis. **(a)** Dystrophin immunofluorescence (NCL-DYS2 monoclonal antibody) on transverse sections of muscle samples (muscle digitorum extensor communis) obtained at sacrifice from a healthy (WT) dog, a control Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog (C1) and of three GRMD dogs injected with different doses of rAAV (5E12 vg/kg; D1, 1E13 vg/kg; D4 and 5E13 vg/kg; D14). Scale bar = 500 µm. **(b)** Western-blot analysis of total proteins (100 µg) extracted from muscles of dog 15 (m. FCR = muscle flexor carpi radialis; m. FDS = muscle flexor digitorum superficialis; m. FLU = muscle flexor lateralis ulnaris; m. pectoralis and m. deltoideus). The blot was stained with NCL-DYS1 or NCL-DYS2 monoclonal antibodies (the two antibodies having different levels of sensitivity) to reveal the presence of the novel ~405 kDa dystrophin band. Muscle from a control GRMD dog was used as negative control. Muscle from a healthy (WT) dog was used as positive control, and revealed the presence of the 427 kDa normal dystrophin band. Different quantities (25–100 µg) of this protein extract were loaded, to allow a semiquantification of the signals obtained in the injected dog. A Ponceau S red staining was used to validate protein loadings.

the two forelimbs. These analyses confirmed the presence of the ~405 kDa corrected dystrophin band (a representative example is provided **Figure 3b**), the intensity of which was consistent with the transduction pattern.

Improvement of muscle pathology in the transduced territories

In DMD patients and GRMD dogs, muscular lesions result from the absence of dystrophin protein. “Phase I” lesions consist of hyalinization, hypertrophy, abnormal accumulation of calcium salts, necrosis, macrophage, and lymphocyte infiltration and subsequent regeneration of myofibers. “Phase II” lesions are fibrosis and general myofiber diameter heterogeneity. Beyond that stage, adiposis takes place essentially in DMD patients and to a lesser extent in GRMD dogs.^{23,24} Using morphometric analyses, we analyzed two anatomically opposed muscles within the perfused forelimb: the flexor carpi ulnaris muscle and the extensor carpi radialis muscle. In order to detect a possible relationship between gene transfer efficacy and the tissue pathology criteria, data were collected and analyzed after allotments of the muscles based on the percentage of dystrophin-positive fibers. At euthanasia, transduced muscles showed a decrease of myofiber regeneration, which was correlated with the percentage of dystrophin-positive fibers and was significant as soon as more than 33% of myofibers were

expressing dystrophin ($P < 0.05$) (**Figure 4a**). In addition, a significant decrease of endomysial and total fibrosis was observed in the muscles presenting more than 33% of dystrophin-positive fibers ($P < 0.05$) (**Figure 4b,c**). However, no statistical difference was noted regarding the accumulation of calcium salts, anysocytosis, macrophage infiltration, and T and B lymphocyte infiltration (data not shown). Altogether, these results indicated that “Phase I” and “Phase II” tissue lesions are decreased in successfully transduced muscles harboring at least 33% of dystrophin-positive fibers.

Improvement of NMR imaging and spectroscopy indices within the transduced muscle territories

Proton (^1H) NMR imaging and phosphorous (^{31}P) spectroscopy analysis of both forelimbs were performed just prior to euthanasia in 16 of our experimental dogs (5 of them being unable to support the anesthesia required for this exam). The most relevant NMR imaging indices relying on T2, T1, and proton density weighted image signal intensities (T2w, T1w, PD) were calculated on three different muscles. The T2w/PD and T2w/T1w ratios reflect the presence of edema, inflammation, necrosis, and cell damage. The T2w heterogeneity reflects tissue disorganization and abnormal Gadolinium uptake correlates with fibrosis, necrosis and cell damage.²⁵ In ^{31}P spectroscopy, signals were measured from the two extensor carpi radialis muscles. Selected ratios were

Table 2 Levels of dystrophin positives fibers found within the muscles after immunostaining analysis (NCL-DYS2 monodonal antibody)

Group	Type of injection	Dog	Injected forelimb				Noninjected forelimb	Other muscles at distance	Diaphragm
			Mean of Dys+ fibers	CV	Mean of Dys+ fibers for the group	CV for the group	Mean of Dys+ fibers	Mean of Dys+ fibers	Mean of Dys+ fibers
Control	40% of the limb	C1	<0.5%	N/A	<0.5%	N/A	<0.5%	<0.5%	<0.5%
Group 1	5 ¹² vg/kg 40% of the limb	D1	13%	128.5%	18%	35.4%	<0.5%	<0.5%	1%
		D2	22%	78.2%			<0.5%	<0.5%	<0.5%
Group 2	1 ¹³ vg/kg 40% of the limb	D3	47%	52.8%	35%	37.7%	<0.5%	1%	1%
		D4	36%	79.3%			<0.5%	<0.5%	6%
		D5	22%	82.5%			4%	10%	1%
Group 3	5 ¹³ vg/kg 40% of the limb	D6	84%	7.9%	76%	10.5%	12%	27%	26%
		D7	77%	20.7%			6%	21%	19%
		D8	68%	23.2%			11%	12%	9%
Control	20% of the limb	C2	<0.5%	N/A	<0.5%	N/A	<0.5%	<0.5%	<0.5%
		C3	<0.5%	N/A			<0.5%	<0.5%	<0.5%
Group 4	1 ¹³ vg/kg 20% of the limb	D9	35%	78.0%	23%	93.3%	<0.5%	<0.5%	<0.5%
		D10	28%	98.2%			<0.5%	<0.5%	<0.5%
		D11	14%	128.0%			<0.5%	<0.5%	<0.5%
		D12	17%	88.9%			<0.5%	8%	1%
Group 5	5 ¹³ vg/kg 20% of the limb	D13	47%	67.3%	58%	24.6%	2%	5%	9%
		D14	72%	26.1%			12%	23%	42%
		D15	55%	50.0%			4%	5%	20%
Group 6	1 ¹³ vg/kg 20% of the limb 35ml/min	D16	51%	51.7%	36%	48.1%	<0.5%	<0.5%	<0.5%
		D17	17%	87.1%			/	/	/
		D18	41%	51.1%			<0.5%	<0.5%	1%

CV, coefficient of variation; N/A, not applicable; /, not determined.

phosphodiesterases to adenosine triphosphate (PDE/ATP), which reflects membrane metabolism and phosphocreatine to ATP (PCr/ATP), which characterizes metabolically active muscle tissue. Both were combined as PDE/PCr, a single sensitive index for membrane metabolism analysis.²⁶ Except for group 1, the injected forelimb was systematically identified from simple visual examination of NMR images, for which muscle signals were less hyper intense on T2w images and more homogeneous within and between muscles (Figure 5a). Observation of PCr increase and PDE decrease in ³¹P NMR spectra (Figure 5b) also enabled recognition of the injected forelimb in all groups, except for group 1. As illustrated for the T2w/T1w NMR imaging index found in groups 4 and 5 compared to reference populations (Figure 5c) and for the NMR spectroscopic index PDE/PCr (Figure 5d), most indices showed an improvement in the injected forelimb as compared to the noninjected one. The high vector dose (groups 3 and 5) and the intermediate dose treated by the 40% volume injection protocol (group 2) decreased most indices to levels close to or within normal ranges of healthy dogs, while more scattered results were obtained in the animals with the lower volume of injection (groups 4 and 6). Finally, almost all NMR imaging indices remained within the pathological range in the animals of the low vector dose group (group 1). Moreover, consistent with the expression of dystrophin found in the contralateral forelimb of

some dogs, several indices were also diminished in the muscles of the contralateral limb in the high dose groups (data not shown). Altogether, our results indicated that NMR and spectroscopic parameters are successfully improved in the transduced muscles of animals of groups 2, 3, and 5, *i.e.*, harboring at least ~35% of dystrophin-positive fibers (see Table 2).

Improvement of muscle strength in the transduced muscle territories

The functional status of the two forelimbs was evaluated by measurement of the flexion and extension strengths of the wrist, using a custom-made torque measurement device. Three measurements were done along the protocol on each of the 21 experimental GRMD dogs: before injection, ~1.5 months postinjection, and ~3 months postinjection. For each time point, the maximal torque was expressed as a percentage of predicted values computed using a model based on control values with respect to the animal weight. The maximal torque was most of the time attained at a stimulation frequency of 133 Hz (data not shown). The relative slope over the three measurements was used as an indicator of strength change for each function and each forelimb. A relationship between gene transfer efficacy and functional improvement was shown by plotting the strength changes against the percentage of dystrophin-positive fibers measured in the stimulated muscles,

the allotments having been specifically adapted to this analysis. **Figure 6** shows that when the percentage of dystrophin-positive fibers was above 40%, a significant improvement of strength was detected ($P < 0.05$).

Lack of immune response toward dystrophin

Despite an obvious and sustained therapeutic effect of rAAV8-U7snRNA-E6/E8 vector over the study period, we searched for humoral and cellular immune reactions against the newly synthesized dystrophin protein. The detection of anti-dystrophin IgG was performed by western-blot analysis on sera obtained before injection, at 1, 2, and ~3.5 months postinjection. No anti-dystrophin IgG was detected in any of the 18 rAAV-injected GRMDs indicating that, within the limits of our assay sensitivity, no humoral response towards the therapeutic protein was developed (a representative example obtained from dog D10 is provided on **Supplementary Figure S3**). Using two different protocols of antigenic lymphocyte stimulation (see **Supplementary Materials and Methods**), T cell responses directed against the novel dystrophin protein were assessed by IFN- γ ELISPOT assay using PBMC collected at different time points postinjection and splenocytes collected at euthanasia. Again, none of the analyzed experimental GRMD dogs exhibited a detectable IFN- γ response (**Supplementary Table S4**). We also monitored the anti-AAV8 capsid immune reaction and obtained classical anti IgM and IgG responses (**Supplementary Figure S4a**). Simultaneously, all rAAV-injected dogs rapidly developed dose-dependent anti-AAV8 neutralizing factors (NAF) (**Supplementary Figure S4b**). Finally, no IFN- γ response to the AAV8 capsid was detected at any time point in any analyzed dog (**Supplementary Table S4**).

DISCUSSION

The present study intended to support a future clinical trial of rAAV8-U7snRNA-based gene therapy in nonambulant DMD patients by determining the safety profile and therapeutic index of the locoregional drug delivery approach, testing different doses, optimizing the injection protocol, evaluating the concomitant risks, and monitoring immunological responses both to the vector and the dystrophin produced. Dystrophin correction using a rAAV-U7snRNA vector was previously established in DMD mouse^{12,14} and dog^{13,15,16} models, after local injection in skeletal muscle or heart. Beyond this stage of proof of principle, we conducted a comprehensive and systematic translational investigation in a large cohort of GRMD dogs, a clinically relevant model of DMD, and using a GMP-compliant manufactured vector following methods suitable for human trials. All dogs were injected at the age of 3–4 months, an age when clinical signs and several histological lesions due to the absence of dystrophin protein are systematically found. “Phase I” lesions (hyalinization, hypertrophy, calcification, necrosis, and regeneration) are established and some “Phase II” lesions (endomysial fibrosis and myofiber diameter heterogeneity) are often detected.²³

The first major finding was that the mode of delivery and the gene therapy vector were both safe and therapeutic. The reassuring safety profile was consistent with the recent report of such procedure applied to neuromuscular disease patients receiving only saline solution in the lower limb.²²

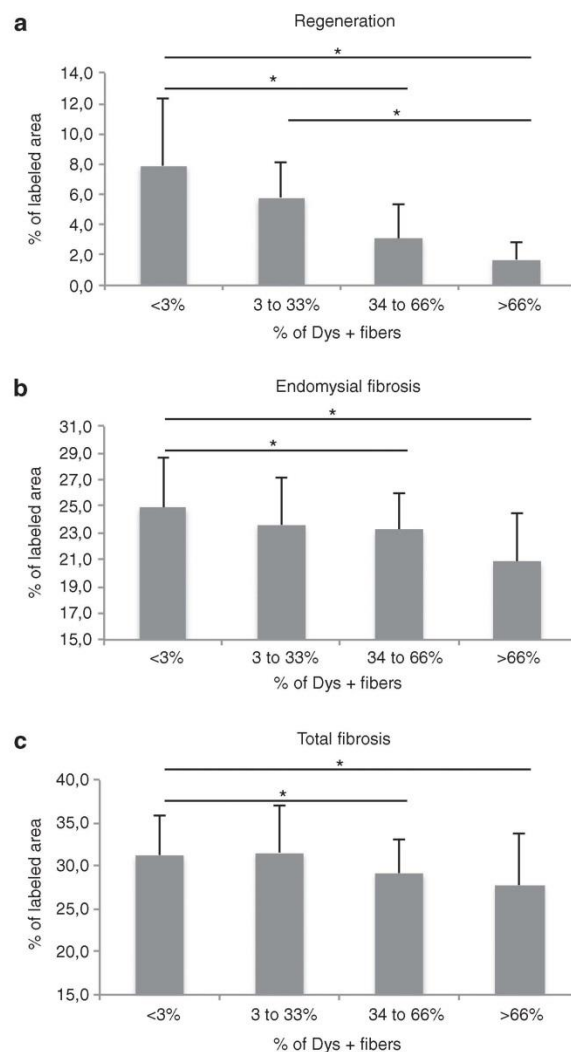


Figure 4 Improvement of pathological pattern in the dystrophin-expressing muscles. Two muscles per dog were analyzed (the flexor carpi ulnaris muscle and the extensor carpi radialis muscle) according to their percentage of Dys+ positive fibers: <3% ($n = 38$), between 3 and 33% ($n = 8$), between 34 and 66% ($n = 18$) and >66% ($n = 12$). * $P < 0.05$. **(a)** Evaluation of myofiber regeneration. Regeneration was quantified by immunohistochemical staining of myotubes using an antibody specific for developmental myosin heavy chain isoform and automatic measurement of the percentage of the labeled area. **(b)** Evaluation of endomysial fibrosis in the muscles. Endomysial fibrosis was quantified by immunohistochemical revelation of collagen I, and automatic measurement of the percentage of the labeled area after selection of regions of interest. **(c)** Evaluation of total fibrosis in the muscles. Total fibrosis was quantified by immunohistochemical revelation of collagen I, and automatic measurement of the percentage of the labeled area.

Moreover, gene transfer and therapeutic efficacy showed tight correlations between: (i) the injected dose, (ii) the copy number of transgene in target tissue, (iii) the detection of skipped dystrophin messenger, and (iv) the level of dystrophin protein expression which corresponded to graded responses in: (v) the improvement of the local pathological pattern, (vi) the quantified NMR and ³¹P spectroscopy parameters, and (vii) the strength of the limb. We

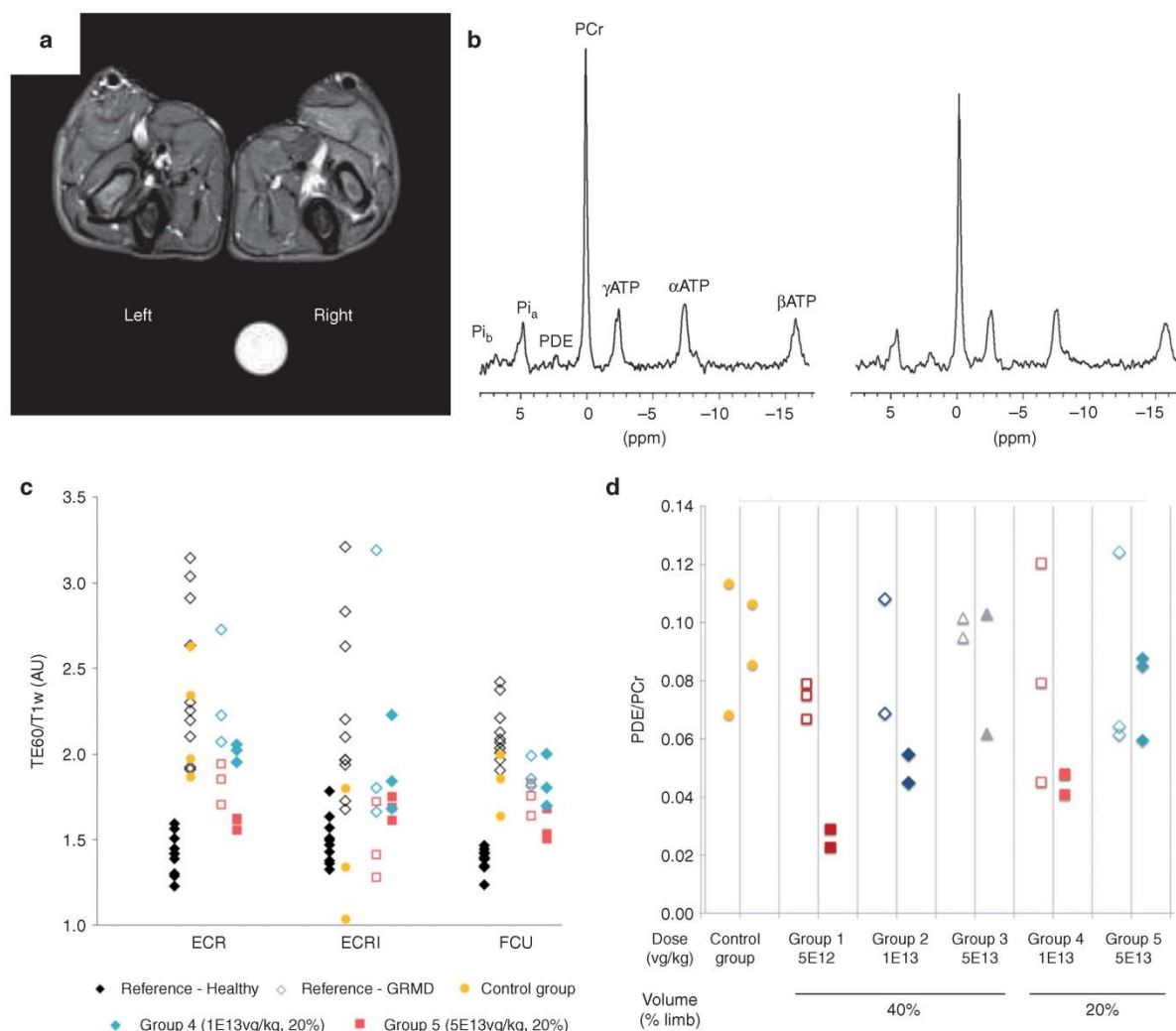


Figure 5 NMR imaging and spectroscopy analyses of muscles. **(a)** Representative example of transverse fat-saturated T2-weighted NMR image of the two forelimbs of one dog of group 3 (D8). The vector was injected in the left forelimb and imaging was performed 3 months after injection. Signal muscle intensities were decreased and more homogeneous in the injected forelimb (left) compared to the noninjected one (right). **(b)** Representative example of ^{31}P NMR spectra of the injected (left) and noninjected forelimb (right) of the same dog (D8). Phosphocreatine (PCr) was increased and phosphodiesterases (PDE) were decreased relative to ATP in the treated forelimb compared to the untreated forelimb. **(c)** NMR imaging T2w/T1w muscle signal ratios of dogs injected with a small volume (20% of the limb volume), obtained from three different muscles. ECR, extensor carpi radialis brevis; ECRI, extensor carpi radialis longus; FCU, flexor carpi ulnaris). The values of this index in the injected limbs (red closed symbols for high dose and blue closed symbols for intermediate dose) were decreased compared to the noninjected ones (open red and blue symbols) and controls (yellow symbols) or nontreated Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) reference population (white symbols), and they were closer to the normal dog indices (black symbols). **(d)** NMR spectroscopy PDE/PCr muscle signal ratios of the dogs injected with high (red symbols), intermediate (blue symbols) and low vector doses (grey symbols), with large volume (40% of the limb volume) or small volume (20% of the limb volume) as compared to GRMD controls.

showed robust expression of the dystrophin protein in all muscles of the injected limb with staining intensity similar to healthy control muscle. Such intense dystrophin expression was never observed when using chemically modified AOs for the correction of dystrophin messenger by exon skipping. Indeed, in clinical trials, a maximum of 15% of normal dystrophin levels were obtained after systemic injection of AOs.^{6–8} This difference in efficacy might be attributed to the difference of the reaction, which is intrinsically dependent on the nature of the skipped exon(s). But in dystrophic dogs injected with AOs designed for the skipping of exons

6 and 8 (as in our study), only 20–26% of normal dystrophin levels were found in the injected muscles even if doses several fold higher than in human trials were applied.^{27,28} We think that the permanent expression of the antisense explains the power of the rAAV-U7snRNA construct compared to AOs, which have a short half-life and must be regularly readministered.

Our study allowed the definition of thresholds of efficacy, at least within the GRMD context and with this specific exon-skipping reaction. Independent methods such as muscle morphology, NMR imaging and spectroscopy, and isometric muscle

testing, which all measured distinct events, demonstrated similar improvement with comparable thresholds of dystrophin expressing fibers (>33% for structural measures and >40% for strength). These data are in correlation with the fact that in BMD and X-linked dilated cardiomyopathy patients, dystrophin levels respectively above 40% or comprised between 29 and 57% of the normal levels are sufficient to avoid muscle weakness.^{29,30} In transgenic or AON-treated mdx mice, previous studies demonstrated that lower levels (~20–30%) of dystrophin expressing fibers can improve pathology and performance, and protect muscles from contraction-induced injury, but are insufficient to restore force production in skeletal muscles.^{31,32} The fact that our therapeutic index is higher in GRMD dogs could be explained by the less severe muscle pathology of mdx mice compared to those of GRMD dogs.³³

When injecting 40% of the limb volume, our therapeutic index was obtained after injection of 1×10^{13} vg/kg. However, buffer injection of >20% of the lower limb volume may result in transient elevation of muscle compartment pressures in neuromuscular disease patients,²² which in turn will likely be the upper safety boundary for locoregional rAAV delivery. The fact that GRMD dogs tolerated the injection of a larger volume than patients can be explained by the structural relationship of skin to underlying tissues, which differs considerably between human and dogs. And to compensate for the reduced perfusion volume, the actual therapeutic dose was 5×10^{13} vg/kg to reach at least 40% of dystrophin-positive fibers in GRMD dogs. Because the exon-skipping reaction is sequence specific, we cannot predict the actual translation of these results into the human context, in which other antisense sequences will be used to target different exonic mutations resulting in different corrected dystrophins in different patients.

The noticeable efficacy of the exon skipping reaction coupled with the rAAV8 approach was determined after ~3.5 months of follow-up. An open topic of debate is the therapeutic stability over time. If in the context of a healthy muscle, rAAV-mediated transgene expression is stable for many years after one single intramuscular injection both in large animal models^{20,34} and in a hemophilia B patient,¹¹ the expression stability in a pathological context such as in dystrophic muscles seems to be less evident.³⁵ Recent results in the mdx and dystrophin-utrophin dKO mice indicated that successful gene therapy of the dystrophic process itself is crucial for maintaining viral genome stability in transduced fibers.³⁶ Indeed, the DMD pathological context, if not arrested, may favor: (i) a progressive destruction of the myofibers with simultaneous elimination of the rAAV genomes; (ii) a high level of regeneration of the myofibers that could dilute the rAAV genomes, which predominantly persist as non integrated molecules in muscle cell nuclei³⁷; (iii) a refractory environment due to genomic instability of the muscle cells with widespread DNA double-strand breaks and activation of the DNA damage response pathway³⁸; and (iv) abnormal patterns of epigenetic regulations secondary to oxidative stress,³⁹ which could negatively impact on the level of expression of the therapeutic transgene. A recent study in which one GRMD dog was injected with a rAAV1-U7snRNA-E6/E8 vector and exceptionally followed for 5 years, showed a progressive decline in the number of dystrophin-positive fibers concomitant

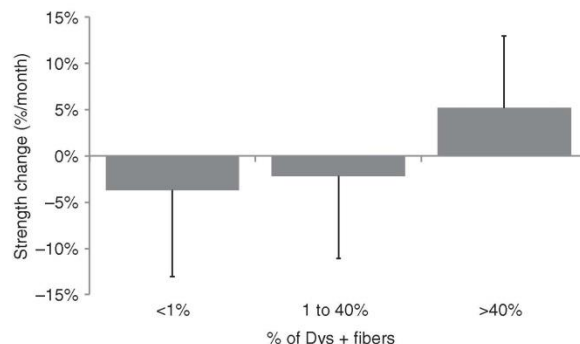


Figure 6 Relative strength changes over the protocol time in the tested forelimb, related to dystrophin expression in the stimulated muscles. The tested forelimbs were classified according to their level of dystrophin-positive fibers: less than 1% ($n = 30$), 1–40% ($n = 21$), and more than 40% ($n = 14$).

with the number of vg/dg in two injected muscles.¹⁵ This decline was drastic during the first year postinjection. In our study, even if the follow up was shorter, such transgene expression decline with time was not seen, *i.e.*, no significant (*t*-test) difference was seen in the levels of dystrophin-positive fibers and vg/dg both obtained from a total of 28 muscular biopsies done in the whole cohort of dogs ~1.5 months postinjection in the injected forelimb and in the same muscles sampled at ~3.5 months postinjection. Moreover, in three additional GRMD dogs injected with the therapeutic dose of our vector and followed up to 7 months postinjection, we found similar levels of dystrophin-positive fibers and of vg/dg to those obtained in the dogs injected under the same conditions but followed ~3.5 months (Le Guiner *et al.*, unpublished data). In the study by Vulin *et al.*,¹⁵ the fact that analyses were done on several iterative muscular biopsies could explain the difference with the present results, as iterative biopsies can promote muscle regeneration and the loss of vector genomes. The fact that the dog studied by Vulin *et al.*¹⁵ was injected at 5–6 months of age, when “Phase II” muscular lesions can be extended (especially fibrosis), could also explain this difference. Indeed, even in mice, it was recently shown that the therapeutic efficacy of an exon skipping treatment depends on severity of the disease at the time of the treatment started.⁴⁰ The fact that we have reached a reversion of “Phase I” but also “Phase II” muscular lesions in the large majority of our dogs also supports, as in the mouse models,³⁶ the scenario by which reaching a therapeutic threshold with a substantial reversion of the muscular pathological pattern is a corner stone to obtain long-term rAAV genome stability in a dystrophic muscle.

The third major observation consistent with the stability of transgene expression is the lack of humoral and cellular immunity against the newly expressed dystrophin despite the occurrence of an immune response against the AAV8 capsid. Even if the rAAV vector was detectable in the periphery in GRMD dogs, systemic markers of inflammation were not detected regardless of the vector dose. Several favorable factors can explain this important observation made in fully immunocompetent dogs: (i) unlike the intramuscular injection, the locoregional transvenous injection is associated with a lack of immunotoxicity^{41,42}; (ii) exon skipping therapy as opposed to dystrophin expression from a cDNA has the unique privilege

to avoid expression of the dystrophin in antigen presenting cells and thus preserves the endogenous regulation of the messenger in the relevant cell targets; and (iii) the presence of natural dystrophin “revertant fibers” in GRMD dogs (as in the majority of DMD patients)⁴³ is potentially a powerful tolerogenic factor. However, the latter remains a matter of debate since anti-dystrophin immunity was reported in some Duchenne patients.^{44,45} Although liver was found transduced in our GRMD dogs, a tolerogenic mechanism was excluded since there was no evidence for dystrophin messenger skipping in this organ (Domenger *et al.*, unpublished data).

In conclusion, our data support the overall safety and therapeutic efficacy in GRMD dogs of locoregional intravenous injection of a rAAV8-U7snRNA at a dose of 5×10^{13} vg/kg to reach at least 40% of dystrophin-positive fibers, paving the way for a human trial of the upper limb of nonambulatory DMD patients.

MATERIALS AND METHODS

Vector design and production. Our vector contained two modified murine U7snRNA expression cassettes with antisense sequences targeting exon splicing enhancers (ESE) in exons 6 and 8 of the canine dystrophin mRNA, each being under the control of the natural murine U7snRNA promoter. These two cassettes were previously cloned in tandem into an AAV2 vector backbone.¹⁵ Seven pseudotyped rAAV2/8-U7snRNA-E6/E8 vector batches were produced using the Sf9/Baculovirus expression vector system,⁴⁶ adapted here for rAAV8. Briefly, Sf9 cells were grown in 50-l disposable bioreactors (Sartorius, Aubagne, France) in serum-free insect cell medium (SF-900 II SFM medium, Life Technologies, Saint-Aubin, France) at 27 °C. When the cell concentration reached one million per milliliters, cells were transduced with Rep2-Cap8 and ITR-U7snRNA-E6/E8 Baculoviruses. Cells were grown and finally disrupted by chemical lysis to release vectors into the supernatant. The lysate was then clarified on a 0.45 µm glass fiber frontal filter (Pall, Saint-Germain-en-Laye, France) prior purification on an immunoaffinity chromatography column (AVB Sepharose HP, GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France). Finally, the vector was concentrated, formulated in Ringer-Lactate solution (Baxter, Maurepas, France), and sterile filtered and aliquoted by 2 ml prior freezing at -70 °C. Several quality controls tests were performed on each batch of vector (Supplementary Table S1). The stability of our vector at -70 °C was demonstrated over a period of 30 months, sufficient to cover the duration of our study.

Animals and vector delivery protocol. Twenty-one affected GRMD male dogs were used in this study. They were obtained from the Centre d'Élevage du Domaine des Souches (Mezilles, France) or from the Boisbonne Center for Gene Therapy (ONIRIS, Atlantic Gene Therapies, Nantes, France), two breeding centers of the same colony. They were handled and housed in the Boisbonne Center for Gene Therapy. The Institutional Animal Care and Use Committee of the Région des Pays de la Loire (University of Angers, France) approved the protocol. AAV8 seronegative animals were injected at the age of 3–4 months. The protocol was performed without any immunosuppressive regimen.

For locoregional transvenous injection, anesthesia was induced with ketamine (Imalgene 1000, Merial, Toulouse, France) in combination with diazepam (Valium, Roche, Boulogne-Billancourt, France) and was maintained using an inhalational mixture of isoflurane (Vetflurane, Virbac, Magny-en-Vexin, France) and oxygen. Analgesia was performed with morphine. A preinjection muscular biopsy was performed surgically in a biceps femoris muscle. After measurement of the limb segmental volume by water immersion, anesthetized dogs underwent cannulation of the cephalic vein with a 20-gauge catheter (B-Braun, Boulogne-Billancourt, France). Then, the forelimb was exsanguinated by applying an Esmarch bandage (Microtek Medical, Zutphen, Netherlands) and a pneumatic tourniquet (Dessillon-Dutrillaux, Castelculier, France)

was placed above the elbow of the animal and inflated to 310 mm Hg to prevent any circulation in the limb. After removal of the Esmarch bandage, the perfusate (Ringer-Lactate solution alone, Aguetant, Lyon, France, or rAAV diluted in Ringer-Lactate solution) was injected. For the dogs injected with a volume corresponding to 40% of the limb volume, a final volume of 12 ml of perfusate per kg of body weight was injected using an infusion bag inflated to 300 mm Hg (Smiths Medical France, Rungis, France). For the dogs injected with a volume corresponding to 20% of the limb volume, a final volume of 6–7 ml of perfusate per kg of body weight was injected using a volumetric pump (Fresenius Vial, Brezins, France), at a fixed flow rate of 10 ml/minute or 35 ml/minute. All along the procedure, the venous pressure at the level of the catheter was monitored. After injection, the tourniquet was left in place for 15 minutes and then released. The total duration of ischemia was about 30–40 minutes. To limit discomfort of the animal due to preinjection surgical biopsy, meloxicam (Metacam, Boehringer-Ingelheim, Paris, France) was administered on the day of injection and for the following 2 days.

Euthanasia was performed by intravenous injection of pentobarbital sodium (Dolethal, Vetoquinol, Paris, France).

Vector biodistribution and vector shedding analysis. All samples were obtained in conditions to minimize cross contamination and avoid Q-PCR inhibition, as previously described.⁴⁷ Extraction of genomic DNA (gDNA) from tissues was done using the Gentra Puregene kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and TissueLyser II (Qiagen). Extraction of rAAV DNA from fluids was done using the Qiaamp Viral RNA mini-kit (Qiagen). rAAV was extracted from 140 µl of serum. This extraction protocol was validated by spiking different doses of vector stock in the fluids, prior to the extraction. The final recovery of vector genomes was of 70% in urine and 10% in serum. Q-PCR analyses were conducted on a StepOne Plus (Life Technologies) using 50 ng of gDNA or 10 µl of fluid-extracts, in duplicates. All reactions were performed in a final volume of 25 µl containing template DNA, Premix Ex taq (Ozyme, Saint-Quentin-en Yvelines, France), 0.4 µl of ROX reference dye (Ozyme), 0.2 µmol/l of each primer (Life Technologies), and 0.1 µmol/l of Taqman probe (Life Technologies). Vector copy numbers were determined using primers and probe designed to specifically amplify the region between the two U7 snRNA expression cassettes (forward: 5'-CAGCCAATCACAGCTCCTATGTT-3'; reverse: 5'-GCTTTGATCCTTCTCTGGTTTCC-3'; probe: 5'-FAM-CCA TGCTCTAGCCACATACGCGTTTCC-TAMRA-3'). Endogenous gDNA copy numbers were determined using primers and probe designed to amplify the canine β-glucuronidase gene (forward: 5'-ACGCTG ATTGCTCACACCAA-3'; reverse: 5'-CCCCAGGTCTGCTTCATAGTT G-3'; probe: 5'-FAM-CCCGGCCCGTGACCTTTGTGA-TAMRA-3'). For each sample, C_t values were compared with those obtained with different dilutions of linearized standard plasmids (containing either the U7 snRNA expression cassettes or the canine β-glucuronidase gene). The absence of Q-PCR inhibition in the presence of gDNA was checked by analyzing 50 ng of gDNA extracted from tissues samples or 10 µl of fluid extract from a control animal, spiked with different dilutions of standard plasmid. Results were expressed in vector genome per diploid genome (vg/dg). The sensitivity of our test was 0.004 vg/dg. For fluids, only the transgene specific Q-PCR was performed and results were expressed in vector genome (vg) per ml of fluid extracted. The sensitivity was 50 vg in 10 µl of fluid extract. Statistical analyses were performed using a Fischer's least significant difference test after two-way analysis of variance (ANOVA).

Dystrophin messenger rescue analysis. Total RNA was extracted from muscles with TRIzol reagent (Life Technologies) and treated with RNase-free DNase I from the TURBO DNA-free kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Five hundred nanograms of this RNA were reverse transcribed using random primers (Life Technologies) and M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies). Detection of the canine dystrophin messenger was done using a nested PCR from exon 3

to 10, using GoTaq DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France) and primers (Life Technologies) and amplification conditions previously described.¹⁵ Final PCR products were migrated on an agarose gel and revealed with ethidium bromide staining.

Immunohistochemistry analysis. Muscles samples were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -80°C until processing. Serial frozen transverse sections $12\ \mu\text{m}$ were cut using a cryostat (Leica Microsystems, Nanterre, France). Transversal cryosections were incubated in blocking buffer (phosphate-buffered saline (PBS)/5% goat serum) for 1 hour at room temperature, and then incubated overnight at room temperature in PBS with mouse monoclonal anti-dystrophin antibody (Novocastra NCL-DYS2, 1:50, Menarini, Rungis, France). The sections were then incubated for 1 hour at room temperature with Alexa fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG (1:400, Life Technologies), then with the fluorescent DNA-dye DRAQ5 (1:1,000, Biostatus, Leicestershire, UK) for 15 minutes at room temperature, and finally washed with PBS before mounting. Immunofluorescence labeling was observed with an epifluorescence microscope (Nikon, Champigny sur Marne, France).

For histomorphometrical counting of the percentage of dystrophin-positive fibers, a goat anti-mouse biotinylated IgG (1:300, Dako, Les Ullis, France) was used as secondary antibody, diluted in PBS with 5% dog serum. The sections were then incubated 1 hour at room temperature with streptavidin/HRP (1:300, Dako), and revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB, Dako). Statistical analyses were performed using a Fischer's least significant difference test after two-way ANOVA.

Western-blot analysis. For each muscle sample, total proteins were extracted from twenty $10\ \mu\text{m}$ -thick slices using $100\ \mu\text{l}$ of extraction buffer containing 75 mmol/l Tris-HCl, pH 6.8, 15% SDS, 20% glycerol, and protease inhibitors (cOmplete, Mini, ethylenediaminetetraacetic acid-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche). Hundred micrograms of protein extracts were loaded on a 7–4% SDS-PAGE, migrated at 100V overnight at 4°C and transfer in methanol buffer at 1A during 6 hours at 4°C on a nitrocellulose membrane (Millipore, Molsheim, France). Coomassie blue staining of the gel evaluated the efficiency of the transfer. After Red Ponceau staining (Sigma-Aldrich, Lyon, France), membranes were blocked in 5% skim milk in Tris-buffered saline buffer and hybridized with two mouse anti-dystrophin antibodies (1:150, Novocastra, NCL-DYS1 and 1:100, NCL-DYS2, Menarini) and with a secondary anti-mouse IgG HRP-conjugated antibody (1:1,000, Dako). Immunoblots were visualized by Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) on ECL-Hyperfilm (GE Healthcare, Velizy-Villacoublay, France).

Histomorphological analysis. Regeneration was evaluated after immunohistochemical revelation of myofibers with an antibody specific of a developmental myosin heavy chain isoform (1:20, Novocastra, NCL-MHCd, Menarini). The percentages of labeled areas were measured after manual threshold on all muscle cross-sections (reproducibility coefficient: 17%). Total and endomysial fibrosis were evaluated after immunohistochemical revelation of collagen I (1:500, MP biomedical, Illkirch, France). The endomysial areas were selected by the operator, the threshold level was selected and an automatic measurement of the percentage of the labeled area was done. Twenty fields were randomly chosen to finally evaluate the level of endomysial fibrosis in each muscle (reproducibility coefficients: 1% with $\times 10$ magnification for total fibrosis and 7% with $\times 20$ magnification for endomysial fibrosis). All measurements were automatically performed using Nikon's NIS-Elements software (Nikon, Champigny sur Marne, France). Statistical analyses were performed using a Fischer's least significant difference test after two-way analysis of variance.

NMR imaging and spectroscopy analysis. This assessment was done in a blinded fashion, i.e., the operator was not aware of the injected versus the noninjected forelimb. NMR imaging was performed at 3 tesla in a Siemens Magnetom Trio TIM imager/spectrometer (Siemens, Saint-Denis, France) in the injected forelimb and in the noninjected contralateral forelimb, as

previously described.⁴⁸ Ten significant quantitative indices were calculated from the ^1H NMR signal of three different muscles (extensor carpi radialis brevis, extensor carpi radialis longus, and flexor carpi ulnaris). The most relevant NMR imaging indices relying on T2, T1, and proton density weighted image signal intensities (T2w, T1w, PD), i.e., the T2w/PD and T2w/T1w ratios, the T2w heterogeneity and the maximum relative enhancement after intravenous bolus injection of Gadolinium chelate were analyzed. All indices from the muscles of the injected forelimb were compared to those of the noninjected forelimb, and to reference data collected during a previous NMR study of disease progression in a group of untreated GRMD and healthy dogs.⁴⁸ The ^{31}P spectroscopy was realized at 4 tesla in a 46-cm free bore magnet (Magnex Scientific, Oxford, UK) interfaced to a Bruker Biospec spectrometer (Bruker Medical GmbH, Vienna, Austria), with a 2 cm diameter coil collecting signal from the two extensor carpi radialis muscle, also as previously described.²⁶ Signals were measured from the two extensor carpi radialis muscles. Phosphocreatine (PCr), the β -phosphate of ATP, phospho-mono and -diesters (PDE, PME), and two resonances of inorganic phosphate were measured on ^{31}P spectra, from which 7 ratios and the pH values for both Pi resonances were calculated.²⁶

Functional assessment. This assessment was done in a blinded fashion, i.e., the operator was not aware of the injected versus the noninjected forelimb. The flexion and extension strengths of the wrist of the forelimbs were measured using a specific torque measurement device built around interchangeable torque meters with a nominal scale of either 2 or 20 Nm (Scaine, Annemasse, France). During the experiments, the dogs were anaesthetized using Propofol (Rapinovel, Schering-Plough, MSD, Courbevoie, France) to limit peripheral muscle relaxation.⁴⁹ The stimulation of carpal flexors and extensors was performed by direct nerve stimulation using two thin insulated needles (28G, TECA, Viasys Healthcare, Conshohocken, Pennsylvania). The flexion and extension torques were measured during the stimulation of either the median and ulnar common nerve branches or the radial nerve. Stimulation trains were generated during 500 ms at supramaximal intensity and various stimulation frequencies (5, 10, 20, 25, 50, 100, 133, and 200 Hz). Stimuli were biphasic with a total duration of 1 ms. Thirty-second rest periods were respected between contractions. For each muscle function (flexion and extension) and each side (injected and control), the value retained to characterize the maximal strength of the dogs was the maximal torque detected over all the elicited tetanic contractions.

Three measurement sessions were performed all along the protocol. The maximal torque was expressed as a percentage of predicted values computed using a model based on control values with respect to the animal weight. The relative slope over the three visits was used as an indicator of strength change for each function and each side. The strength changes were then analyzed with respect to the dystrophin expression measured in the main wrist flexor (averaged over flexor carpi radialis and flexor carpi ulnaris) and extensor (extensor carpi radialis) muscles. Dystrophin expression was classified into three groups: less than 1%, between 1 and 40% and over 40% of dystrophin positive fibers. The effect of dystrophin expression on strength changes was then tested using a nonparametric Kruskal–Wallis test.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Materials and Methods: Follow up of the immune responses.

Supplementary References.

Figure S1. Heterogeneity of dystrophin expression pattern between different muscles within a same injected forelimb.

Figure S2. Relationship between the percentage of dystrophin positive fibers and the number vg/dg.

Figure S3. Detection of anti-dystrophin IgG antibodies by Western-Blot in injected dog sera.

Figure S4. Titers of anti-AAV8 IgG, IgM and NAF in the sera of the injected dogs.

Table S1. Characteristics of the different rAAV8-U7nRNA-E6/E8 vector batches used in this study.

Table S2. Muscles and organs sampled in each dog at euthanasia.

Table S3. Vector shedding in urine and serum of the injected dogs.

Table S4. AAV8 capsid and dystrophin specific IFN- γ secretion data from PBMC and splenocytes of dogs.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all the personnel of the Boissonne Center for Gene Therapy (ONIRIS, Atlantic Gene Therapies, Nantes, France) for the handling and care of the GRMD dog colony. We also thank Peggy Adin-Chabon, Nathalie Lambert, Caroline Burie, Jonathan Lecaille, Julien Blin (Genethon, Evry, France), and Laurence Dubreil (Atlantic Gene Therapies, INRA UMR 703, Nantes, France) for their technical assistance. We thank Karl Rouger (Atlantic Gene Therapies, INRA UMR 703, Nantes, France) for providing GRMD myoblasts used for testing the *in vitro* functionality of our vectors. We thank Stéphane Blot (Veterinary School of Maisons-Alfort, France) for providing anti-dystrophin IgG positive canine sera from immunized GRMD dogs. And we finally thank Fulvio Mavilio (Genethon, Evry, France) for his critical reading of this manuscript. This project was supported by AFM-Téléthon (Association Française contre les Myopathies) and by ADNA (Advanced Diagnostics for New Therapeutic Approaches), a program dedicated to personalized medicine, coordinated by Institut Mérieux and supported by research and innovation aid from the French public agency, Bpifrance.

REFERENCES

- Moser, H (1984). Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet* **66**: 17–40.
- Rodino-Klapac, LR, Mendell, JR and Sahenk, Z (2013). Update on the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Curr Neurol Neurosci Rep* **13**: 332.
- Muntoni, F, Torelli, S and Ferlini, A (2003). Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol* **2**: 731–740.
- Aartsma-Rus, A (2012). Overview on DMD exon skipping. *Methods Mol Biol* **867**: 97–116.
- Echigoya, Y and Yokota, T (2014). Skipping multiple exons of dystrophin transcripts using cocktail antisense oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther* **24**: 57–68.
- Cirak, S, Arechavala-Gomez, V, Guglieri, M, Feng, L, Torelli, S, Anthony, K *et al.* (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet* **378**: 595–605.
- Goemans, NM, Tulinus, M, van den Akker, JT, Burn, BE, Ekhart, PF, Heuvelmans, N *et al.* (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* **364**: 1513–1522.
- Mendell, JR, Rodino-Klapac, LR, Sahenk, Z, Roush, K, Bird, L, Lowes, LP *et al.*; Eteplirsen Study Group. (2013). Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol* **74**: 637–647.
- Goemans, N (2013). Dispersen Efficacy and Safety in Duchenne Muscular Dystrophy: Results of a Phase III, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial (Study DMD114044). *World Muscle Society Congress: Late breaking news*.
- Gorman, L, Suter, D, Emerick, V, Schimperi, D and Kole, R (1998). Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 4929–4934.
- Jiang, H, Pierce, GF, Ozelo, MC, de Paula, EV, Vargas, JA, Smith, P *et al.* (2006). Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther* **14**: 452–455.
- Goyenvalle, A, Vulin, A, Fougereuse, F, Leturcq, F, Kaplan, JC, Garcia, L *et al.* (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**: 1796–1799.
- Bish, LT, Sleeper, MM, Forbes, SC, Wang, B, Reynolds, C, Singletary, GE *et al.* (2012). Long-term restoration of cardiac dystrophin expression in golden retriever muscular dystrophy following rAAV6-mediated exon skipping. *Mol Ther* **20**: 580–589.
- Goyenvalle, A, Babbs, A, Wright, J, Wilkins, V, Powell, D, Garcia, L *et al.* (2012). Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7 snRNA-mediated exon skipping. *Hum Mol Genet* **21**: 2559–2571.
- Vulin, A, Barthélémy, I, Goyenvalle, A, Thibaud, JL, Beley, C, Griffith, G *et al.* (2012). Muscle function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. *Mol Ther* **20**: 2120–2133.
- Barbash, IM, Cecchini, S, Faranesh, AZ, Virag, T, Li, L, Yang, Y *et al.* (2013). MRI roadmap-guided transcatheter delivery of exon-skipping recombinant adeno-associated virus restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther* **20**: 274–282.
- Komegay, JN, Bogan, JR, Bogan, DJ, Childers, MK, Li, J, Nghiem, P *et al.* (2012). Canine models of Duchenne muscular dystrophy and their use in therapeutic strategies. *Mamm Genome* **23**: 85–108.
- Sharp, NJ, Komegay, JN, Van Camp, SD, Herbstreith, MH, Secore, SL, Kettle, S *et al.* (1992). An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* **13**: 115–121.
- Su, LT, Gopal, K, Wang, Z, Yin, X, Nelson, A, Kozjak, BW *et al.* (2005). Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation* **112**: 1780–1788.
- Toromanoff, A, Chérel, Y, Guilbaud, M, Penaud-Budloo, M, Snyder, RO, Haskins, ME *et al.* (2008). Safety and efficacy of regional intravenous (i.v.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther* **16**: 1291–1299.
- Arruda, VR, Stedman, HH, Haurigot, V, Buchlis, G, Baila, S, Favaro, P *et al.* (2010). Peripheral transvenular delivery of adeno-associated viral vectors to skeletal muscle as a novel therapy for hemophilia B. *Blood* **115**: 4678–4688.
- Fan, Z, Kods, K, Valley, R, Howard, JF, Chopra, M, An, H *et al.* (2012). Safety and feasibility of high-pressure transvenous limb perfusion with 0.9% saline in human muscular dystrophy. *Mol Ther* **20**: 456–461.
- Nguyen, F, Chérel, Y, Guigand, L, Goubault-Leroux, I and Wyers, M (2002). Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *J Comp Pathol* **126**: 100–108.
- Dubowitz, V and Sewry, C (2007). Duchenne and Becker muscular dystrophy. In: *Muscle Biopsy: A Practical Approach*, 3rd edn. Elsevier: Philadelphia. pp. 297–304.
- Thibaud, JL, Monnet, A, Bertoldi, D, Barthélémy, I, Blot, S and Carlier, PG (2007). Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. *Neuromuscul Disord* **17**: 575–584.
- Wary, C, Naulet, T, Thibaud, JL, Monnet, A, Blot, S and Carlier, PG (2012). Splitting of Pi and other ^{31}P NMR anomalies of skeletal muscle metabolites in canine muscular dystrophy. *NMR Biomed* **25**: 1160–1169.
- Yokota, T, Lu, QL, Partridge, T, Kobayashi, M, Nakamura, A, Takeda, S *et al.* (2009). Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann Neurol* **65**: 667–676.
- Yokota, T, Nakamura, A, Nagata, T, Saito, T, Kobayashi, M, Aoki, Y *et al.* (2012). Extensive and prolonged restoration of dystrophin expression with vivo-morpholino-mediated multiple exon skipping in dystrophic dogs. *Nucleic Acid Ther* **22**: 306–315.
- Neri, M, Torelli, S, Brown, S, Ugo, I, Sabatelli, P, Merlini, L *et al.* (2007). Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromuscul Disord* **17**: 913–918.
- Anthony, K, Cirak, S, Torelli, S, Tasca, G, Feng, L, Arechavala-Gomez, V *et al.* (2011). Dystrophin quantification and clinical correlations in Becker muscular dystrophy: implications for clinical trials. *Brain* **134**(Pt 12): 3547–3559.
- Sharp, PS, Bye-a-Jee, H and Wells, DJ (2011). Physiological characterization of muscle strength with variable levels of dystrophin restoration in mdx mice following local antisense therapy. *Mol Ther* **19**: 165–171.
- van Putten, M, Hulsker, M, Nadarajah, VD, van Heiningen, SH, van Huizen, E, van Ierssen, M *et al.* (2012). The effects of low levels of dystrophin on mouse muscle function and pathology. *PLoS ONE* **7**: e31937.
- Banks, GB and Chamberlain, JS (2008). The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies. *Curr Top Dev Biol* **84**: 431–453.
- Niemeyer, GP, Herzog, RW, Mount, J, Arruda, VR, Tillson, DM, Hathcock, J *et al.* (2009). Long-term correction of inhibitor-prone hemophilia B dogs treated with liver-directed AAV2-mediated factor IX gene therapy. *Blood* **113**: 797–806.
- Bartoli, M, Poupiot, J, Goyenvalle, A, Perez, N, Garcia, L, Danos, O *et al.* (2006). Noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer in animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther* **13**: 20–28.
- Le Hir, M, Goyenvalle, A, Peccate, C, Précigout, G, Davies, KE, Voit, T *et al.* (2013). AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. *Mol Ther* **21**: 1551–1558.
- Nowrouzi, A, Penaud-Budloo, M, Kaepfel, C, Appelt, U, Le Guiner, C, Moullier, P *et al.* (2012). Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver. *Mol Ther* **20**: 1177–1186.
- Schmidt, WM, Uddin, MH, Dysek, S, Moser-Thier, K, Pirker, C, Höger, H *et al.* (2011). DNA damage, somatic aneuploidy, and malignant sarcoma susceptibility in muscular dystrophies. *PLoS Genet* **7**: e1002042.
- Colussi, C, Gurtner, A, Rosati, J, Illi, B, Ragone, G, Piaggio, G *et al.* (2009). Nitric oxide deficiency determines global chromatin changes in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J* **23**: 2131–2141.
- Wu, B, Cloer, C, Lu, P, Milazi, S, Shaban, M, Shah, SN *et al.* (2014). Exon skipping restores dystrophin expression, but fails to prevent disease progression in later stage dystrophic dko mice. *Gene Ther*. doi: 10.1038/gt.2014.53 [Epub ahead of print].
- Toromanoff, A, Adjali, O, Larcher, T, Hill, M, Guigand, L, Chenuaud, P *et al.* (2010). Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol Ther* **18**: 151–160.
- Haurigot, V, Mingozzi, F, Buchlis, G, Hui, DJ, Chen, Y, Basner-Tschakarjan, E *et al.* (2010). Safety of AAV factor IX peripheral transvenular gene delivery to muscle in hemophilia B dogs. *Mol Ther* **18**: 1318–1329.
- Sherratt, TG, Vulliamy, T, Dubowitz, V, Sewry, CA and Strong, PN (1993). Exon skipping and translation in patients with frameshift deletions in the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* **53**: 1007–1015.
- Mendell, JR, Campbell, K, Rodino-Klapac, L, Sahenk, Z, Shilling, C, Lewis, S *et al.* (2010). Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* **363**: 1429–1437.
- Flanigan, KM, Campbell, K, Viollet, L, Wang, W, Gomez, AM, Walker, CM *et al.* (2013). Anti-dystrophin T cell responses in Duchenne muscular dystrophy: prevalence and a glucocorticoid treatment effect. *Hum Gene Ther* **24**: 797–806.
- Smith, RH, Levy, JR and Kotin, RM (2009). A simplified baculovirus-AAV expression vector system coupled with one-step affinity purification yields high-titer rAAV stocks from insect cells. *Mol Ther* **17**: 1888–1896.
- Le Guiner, C, Moullier, P and Arruda, VR (2011). Biodistribution and shedding of AAV vectors. *Methods Mol Biol* **807**: 339–359.
- Thibaud, JL, Azzabou, N, Barthélémy, I, Fleury, S, Cabrol, L, Blot, S *et al.* (2012). Comprehensive longitudinal characterization of canine muscular dystrophy by serial NMR imaging of GRMD dogs. *Neuromuscul Disord* **22** (suppl. 2): S85–S99.
- Dueck, MH, Oberthuer, A, Wedekind, C, Paul, M and Boerner, U (2003). Propofol impairs the central but not the peripheral part of the motor system. *Anesth Analg* **96**: 449–55, table of contents.
- Reiss, J and Rininsland, F (1994). An explanation for the constitutive exon 9 cassette splicing of the DMD gene. *Hum Mol Genet* **3**: 295–298.

Tableau S1 : Liste des 39 gènes candidats off-targets du U7snRNA-Jr53, d'après les prédictions in silico de miRanda.

Names	Full name / Description		Skeletal muscle expression	Liver expression
ABL2	c-abl oncogene 2, non-receptor tyrosine kinase	prot coding	yes	no
ARSB	arylsulfatase B	prot coding	/	/
CCDC147	coiled-coil domain containing 147	prot coding	/	/
CCNE2	cyclin E2	prot coding	no	no
CERKL	ceramide kinase-like	prot coding	yes	no
DMD	dystrophin	prot coding	yes	yes
DMGDH	Dimethylglycine dehydrogenase, mitochondrial precursor	prot coding	no	yes +++
DST	dystonin	prot coding	yes +++	yes
FLJ31813	FAM21B pseudogene	pseudogene	/	/
HOXA4	homeobox A4	prot coding	yes	no
HSPBAP1	HSPB (heat shock 27kDa) associated protein 1	prot coding	yes	no
JAZF1-AS1	JAZF1 antisense RNA 1	ncRNA	no	no
KIAA0125	KIAA0125	ncRNA	/	/
LINC00330	long intergenic non-protein coding RNA 330	ncRNA	/	/
LOC100130899	uncharacterized LOC100130899	ncRNA	/	/
LOC100134868	uncharacterized LOC100134868	ncRNA	/	/
LOC100996669	uncharacterized LOC100996669	ncRNA	/	/
LOC100996695	uncharacterized LOC100996695	ncRNA	/	/
MESTIT1	MEST intronic transcript 1, antisense RNA	ncRNA	/	/
MYLK3	myosin light chain kinase 3	prot coding	yes +++	no
NDUFB10	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10, 22kDa	prot coding	yes	yes
NRP1	Neuropilin-1 precursor (Vascular endothelial cell growth factor 165 receptor)	prot coding	yes	yes
NUTM2A-AS1	NUTM2A antisense RNA 1	ncRNA	/	/
PALM2	paralemmin 2	prot coding	yes	yes
PDE4DIP	Myomegalin (Phosphodiesterase 4D-interacting protein) (Cardiomyopathy- associated protein 2)	ncRNA	yes +++	yes
PDZD2	PDZ domain containing 2	prot coding	no	no
RNF41	ring finger protein 41, E3 ubiquitin protein ligase	prot coding		
SLC38A6	solute carrier family 38, member 6	prot coding	no	no
SLC5A4	solute carrier family 5 (glucose activated ion channel), member 4	prot coding	/	/
SNTB2	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 2)	prot coding	yes	yes
STEAP3	STEAP family member 3, metalloredutase	prot coding	no	no
STX7	syntaxin 7	prot coding	yes	yes
TCOF1	Treacher Collins-Franceschetti syndrome 1	prot coding	yes	no
TFDP2	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	prot coding	yes	yes
TOP1	topoisomerase (DNA) I	prot coding	yes	yes
TOP1P1	topoisomerase (DNA) I pseudogene 1	pseudogene	/	/
VENTX	VENT homeobox	prot coding	/	/
ZNF592	zinc finger protein 592	prot coding	yes +	yes
ZNF717	zinc finger protein 717	prot coding	/	/

Tableau S2 : Liste des jonctions différentiellement utilisées dans les myotubes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DEXseq). FC : fold change ; padj : pvalue ajustée pour tests multiples.

names	U7-Jr53 motif	junction coordinates	strand	junction mean expression	junction usage (NT)	junction usage (U7)	log2 (FC) (U7 vs NT)	FC	padj	miRanda results for U7-Jr53 motif					Blast results for U7-Jr53 motif				
										hit score	hit energy (kcal/mol)	hit length (pb)	hit identity (%)	hit similarity (%)	hit score	hit length (pb)	hit identity (%)	gap	mismatch
PALLD		chr4: 168497195-168668189	+	3,4	4,97	0,03	-7,56	-188,7	0,001										
KDM5A		chr12: 308006-309519	-	4,1	0,04	5,09	7,12	138,9	0,041										
PDSS2		chr6: 107334333-107459367	-	2,8	0,04	4,28	6,75	107,5	0,044										
ISPD		chr7: 16301467-16376091	-	2,5	4,10	0,04	-6,66	-101,1	0,036										
TRIB1		chr8: 125433769-125436005	+	2,1	0,09	4,21	5,63	49,4	0,034										
DMD	*/	chrX: 31658145-31729630	-	12,9	1,41	9,34	2,73	6,6	0,000	290	-83,51	37	100	100	79,8	40	100	0	0
WHAMM		chr15: 82831080-82833228	+	9,0	3,24	6,78	1,07	2,1	0,036										
COL25A1		chr4: 108860972-108863318	-	22,4	10,29	6,37	-0,69	-1,6	0,036										
TMEM161B		chr5: 88207181-88220562	-	37,7	12,32	9,01	-0,45	-1,4	0,044										
NUP188	*	chr9: 128998624-128999171	+	50,7	14,21	10,77	-0,40	-1,3	0,036						14,4	7	100	0	0
MLLT3		chr9: 20365745-20382380	-	72,6	12,96	16,44	0,34	1,3	0,027										
TMEM159		chr16: 21161279-21170436	+	56,4	14,91	11,84	-0,33	-1,3	0,006										
NCAM1		chr11: 113214512-113231644	+	547,4	35,28	38,85	0,14	1,1	0,015										
MYH8		chr17: 10399670-10400389	-	2304,6	61,21	63,51	0,05	1,0	0,003										
NEB		chr2: 151630820-151631142	-	3203,8	69,68	67,67	-0,04	-1,0	0,036										
MYH3		chr17: 10650402-10651511	-	10826,4	94,72	92,33	-0,04	-1,0	0,029										
MYH3		chr17: 10649686-10650373	-	10111,5	93,19	90,91	-0,04	-1,0	0,017										
TTN		chr2: 178681172-178681375	-	1341,7	NA	NA	NA	NA	0,000										
TTN	*/	chr2: 178576832-178576922	-	8358,0	NA	NA	NA	NA	0,000	167	-23,94	39	53,85	69,23	20,3	10	100	0	0
TTN	*	chr2: 178640111-178640540	-	4685,3	NA	NA	NA	NA	0,000	177	-28,77	40	65	70					
TTN		chr2: 178681451-178681660	-	1631,2	NA	NA	NA	NA	0,000										
TTN		chr2: 178681739-178682696	-	2194,0	NA	NA	NA	NA	0,000										
TTN		chr2: 178694009-178695347	-	588,7	NA	NA	NA	NA	0,018										
TTN		chr2: 178752272-178753123	-	57,9	NA	NA	NA	NA	0,000										

Tableau S3 : Liste des jonctions différentiellement utilisées dans les hépatocytes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DEXseq). FC : fold change ; padj : pvalue ajustée pour tests multiples.

names	U7-Jr53 motif	junction coordinates	strand	junction mean expression	junction usage (NT)	junction usage (U7)	log2 (FC) (U7 vs NT)	FC	padj	miRanda results for U7-Jr53 motif					Blast results for U7-Jr53 motif				
										hit score	hit energy (kcal/mol)	hit length (pb)	hit identity (%)	hit similarity (%)	hit score	hit length (pb)	hit identity (%)	gap	mismatch
MDM2		chr12: 68808492-68809207	+	136,8	24,96	16,90	-0,56	-1,48	0,000										
ZHX2	*	chr8: 122954029-122973241	+	37,4	12,32	8,71	-0,50	-1,42	0,001	181	-40,16	39	69,23	74,36					
INTS1		chr7: 1503192-1503902	-	41,7	13,19	9,50	-0,47	-1,39	0,032										
MINK1		chr17: 4887791-4889646	+	39,2	13,20	9,53	-0,47	-1,39	0,014										
EIF2AK4		chr15: 39976845-39978077	+	33,8	12,31	8,98	-0,46	-1,37	0,043										
ITGB4		chr17: 75757311-75757415	+	50,0	15,36	11,21	-0,45	-1,37	0,023										
UBA3		chr3: 69080154-69080333	-	36,5	12,70	9,30	-0,45	-1,37	0,035										
NOLC1		chr10: 102159569-102159895	+	39,4	12,78	9,54	-0,42	-1,34	0,042										
TJP1		chr15: 29718119-29718265	-	66,4	16,48	12,90	-0,35	-1,28	0,043										
SEC16A		chr9: 136447681-136447852	-	65,7	16,15	12,74	-0,34	-1,27	0,048										
TBCEL		chr11: 121058472-121059968	+	54,7	14,83	11,80	-0,33	-1,26	0,043										
HNRNPA2B1		chr7: 26193695-26195846	-	163,0	23,95	19,50	-0,30	-1,23	0,003										
LRP5	*	chr11: 68439917-68446435	+	91,7	18,65	15,58	-0,26	-1,20	0,048						12,4	6	100	0	0
EIF2AK4		chr15: 40032238-40032756	+	141,7	18,61	21,96	0,24	1,18	0,021										
MYO7A		chr11: 77213980-77214606	+	130,5	18,53	21,53	0,22	1,16	0,048										
MYO18A		chr17: 29097351-29097787	-	138,1	22,32	19,20	-0,22	-1,16	0,039										
EIF3A		chr10: 119051322-119056739	-	244,3	28,48	24,77	-0,20	-1,15	0,025										
HNRNPA2B1		chr7: 26193374-26193574	-	192,4	25,39	22,09	-0,20	-1,15	0,003										
CDK5RAP3		chr17: 47974032-47974399	+	237,2	24,68	28,33	0,20	1,15	0,001										
EIF2AK4		chr15: 40008196-40009613	+	176,2	21,16	24,06	0,19	1,14	0,045										
WNK1		chr12: 754325-813641	+	207,4	26,40	23,46	-0,17	-1,13	0,039										
DDB1	*	chr11: 61321698-61322295	-	237,8	28,06	24,95	-0,17	-1,12	0,019	166	-29,55	42	54,76	71,43					
UGDH		chr4: 39521520-39527282	-	251,1	27,98	25,13	-0,16	-1,11	0,022										
TRIP12		chr2: 229778588-229778875	-	264,1	26,15	29,09	0,15	1,11	0,022										
HNRNPA2B1		chr7: 26196482-26196556	-	338,3	31,95	28,90	-0,15	-1,11	0,048										
DYNC1H1		chr14: 102010953-102011874	+	371,2	33,76	30,75	-0,14	-1,10	0,014										
MDM2		chr12: 68809087-68809207	+	640,9	35,16	38,55	0,13	1,10	0,000										
SREBF2		chr22: 41893286-41894819	+	425,8	32,75	35,43	0,11	1,08	0,041										
IGF2R		chr6: 160064532-160064803	+	457,5	33,49	36,15	0,11	1,08	0,025										
ABCC3		chr17: 50687731-50691091	+	743,9	41,53	43,61	0,07	1,05	0,043										
F12		chr5: 177404915-177405053	-	506,8	36,86	35,15	-0,07	-1,05	0,014										
PABPC1		chr8: 100704391-100704925	-	1228,3	49,72	51,88	0,06	1,04	0,006										
CTS2	*	chr20: 58995760-58996638	-	750,2	43,21	41,47	-0,06	-1,04	0,022						20,3	10	100	0	0
CALR		chr19: 12943630-12943712	+	2552,2	65,28	63,54	-0,04	-1,03	0,000										
FN1		chr2: 215361627-215361968	-	5486,3	77,82	79,91	0,04	1,03	0,000										
LDHA		chr11: 18405573-18407116	+	2153,5	60,48	61,43	0,02	1,02	0,039										

Tableau S4 : Liste des gènes différentiellement exprimés dans les myotubes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DESeq2). FC : fold change ; padj : pvalue ajustée pour tests multiples.

gene name	U7-Jr53 motif	gene type	gene mean expression	log2 (FC) (U7 vs NT)	FC	padj	miRanda results for U7-Jr53 motif				
							hit score	hit energy (kcal/mol)	hit length (pb)	hit identity (%)	hit similarity (%)
HIST1H3B		protein_coding	51,2	-1,52	-2,88	0,000					
NDRG4		protein_coding	678,9	-1,38	-2,6	0,000					
AC006262.5	*	lincRNA	33,5	-1,26	-2,4	0,000	166	-30,2	38	65,8	73,7
TNFRSF10C		protein_coding	117,2	1,20	2,29	0,000					
WDR63		protein_coding	211,9	1,18	2,27	0,000					
LINC00475	*	lincRNA	252,1	1,17	2,25	0,000	169	-32,1	35	65,7	77,1
MASP1	*	protein_coding	90,2	1,17	2,25	0,000	164	-25,5	42	54,8	64,3
							161	-29,6	40	57,5	67,5
RRM2		protein_coding	66,9	-1,14	-2,21	0,001					
PVRL4		protein_coding	38,9	1,12	2,18	0,001					
TOP2A	*	protein_coding	339,7	-1,09	-2,13	0,001	175	-33,0	39	69,2	69,2
DLGAP5	*	protein_coding	40,6	-1,07	-2,09	0,001	165	-23,5	45	60,0	64,4
HSPA4L		protein_coding	2081,8	1,04	2,06	0,000					
PBK		protein_coding	37,6	-1,02	-2,02	0,002					
BIRC5	*	protein_coding	60,1	-1,01	-2,02	0,005	173	-27,0	38	50,0	73,7
NUSAP1		protein_coding	105,3	-1,01	-2,02	0,005					
NCAPG	*	protein_coding	77,8	-1,01	-2,02	0,005	167	-33,2	36	58,3	80,6
NHLH2		protein_coding	147,9	1,01	2,01	0,005					
MKI67	*	protein_coding	114,8	-0,99	-1,99	0,004	167	-26,5	37	67,6	67,6
							168	-26,0	35	60,0	77,1
KIF20A	*	protein_coding	49,8	-0,97	-1,96	0,004	162	-30,8	24	70,8	79,2
FDXR		protein_coding	507,4	0,97	1,96	0,000					
MYL10		protein_coding	79,3	-0,96	-1,95	0,004					
HIST1H2AH		protein_coding	37,7	-0,96	-1,94	0,010					
DEPDC1		protein_coding	61,9	-0,96	-1,94	0,005					
TYMS		protein_coding	246,6	0,95	1,93	0,006					
GNAZ		protein_coding	265,5	-0,94	-1,92	0,000					
PTCHD4		protein_coding	1549,9	0,94	1,92	0,000					
TMEM72		protein_coding	146,3	-0,94	-1,92	0,011					
HIST1H3C		protein_coding	27,1	-0,94	-1,91	0,006					
BUB1	*	protein_coding	73,4	-0,92	-1,9	0,014	168	-25,6	41	63,4	73,2
ESCO2	*	protein_coding	33,7	-0,92	-1,9	0,012	186	-24,2	37	64,9	73,0
CDKN1A	*	protein_coding	28200,7	0,92	1,89	0,005	169	-26,2	38	55,3	73,7
ASPM		protein_coding	179,9	-0,92	-1,89	0,017					
SPATA18	*	protein_coding	1582,3	0,92	1,89	0,008	180	-21,4	35	60,0	68,6
CYFIP2		protein_coding	519,8	0,90	1,87	0,005					
LYNX1		protein_coding	352,8	0,90	1,87	0,006					
AMPH	*	protein_coding	45,1	-0,90	-1,86	0,023	163	-30,3	41	58,5	70,7

HIST1H2AI		protein_coding	29,7	-0,90	-1,86	0,023					
IQGAP3		protein_coding	37,8	-0,90	-1,86	0,019					
MDM2	*	protein_coding	16977,1	0,89	1,85	0,000	171	-19,5	34	58,8	73,5
EPS8L2		protein_coding	358,7	0,88	1,84	0,008					
PTP4A3		protein_coding	265,5	-0,88	-1,84	0,012					
KIF4A	*	protein_coding	33,6	-0,87	-1,83	0,027	169	-27,9	38	55,3	71,1
PIFO		protein_coding	72,1	0,87	1,83	0,011					
ATP2A1		protein_coding	6676,8	-0,87	-1,82	0,002					
DTL		protein_coding	62,3	-0,86	-1,82	0,032					
HIST1H3G	*	protein_coding	12,4	-0,86	-1,81	0,011	166	-25,6	36	61,1	77,8
ABCA12	*	protein_coding	40,2	0,86	1,81	0,025	160	-26,2	37	62,2	70,3
ARHGEF37		protein_coding	1514,2	-0,85	-1,81	0,037					
GDF15		protein_coding	545,4	0,85	1,8	0,023					
MCM10	*	protein_coding	22,4	-0,85	-1,8	0,030	167	-18,6	36	50,0	72,2
A2M		protein_coding	4139,8	-0,85	-1,8	0,034					
HIST1H2BI		protein_coding	27,4	-0,84	-1,79	0,039					
TUBA8		protein_coding	34,8	-0,84	-1,79	0,037					
ABCA4	*	protein_coding	180,6	-0,83	-1,78	0,032	170	-42,4	38	68,4	76,3
PLIN4		protein_coding	206,5	-0,83	-1,78	0,024					
HJURP		protein_coding	33,7	-0,83	-1,78	0,026					
CLSPN	*	protein_coding	68,9	-0,82	-1,76	0,032	168	-29,1	34	64,7	67,7
IGFBP5	*	protein_coding	5452,7	-0,81	-1,76	0,032	173	-36,9	31	74,2	80,7
CKAP2L		protein_coding	20,8	-0,80	-1,74	0,024					
DDB2		protein_coding	1659,0	0,79	1,73	0,004					
MT-ND3		protein_coding	2777,1	0,79	1,73	0,045					
DDIT4L	*	protein_coding	490,8	-0,78	-1,72	0,047	163	-19,9	37	54,1	64,9
RRM2B		protein_coding	7092,8	0,78	1,72	0,011					
BLM	*	protein_coding	72,9	-0,77	-1,71	0,043	173	-33,9	27	81,5	85,2
RP3-510D11.2		lincRNA	101,7	0,77	1,7	0,023					
FAM111B	*	protein_coding	21,8	-0,76	-1,7	0,018	167	-22,9	39	59,0	71,8
HR		protein_coding	1767,5	-0,74	-1,67	0,026					
TIGAR		protein_coding	1213,2	0,73	1,66	0,024					
PPM1D	*	protein_coding	924,4	0,72	1,65	0,000	171	-29,5	37	56,8	81,1
OSBPL3	*	protein_coding	3778,4	0,71	1,64	0,005	170	-22,4	31	58,1	74,2
PARPB	*	protein_coding	204,4	-0,68	-1,6	0,011	161	-19,5	37	56,8	70,3
FST		protein_coding	1607,8	0,67	1,59	0,044					
BAX		protein_coding	972,6	0,66	1,59	0,023					
TAF3		protein_coding	395,8	0,63	1,55	0,035					
ZMAT3	*	protein_coding	17807,5	0,60	1,52	0,005	177	-27,0	35	68,6	77,1
BCL2L1	*	protein_coding	1761,4	0,57	1,48	0,044	166	-35,3	41	58,5	80,5
XPC		protein_coding	2173,9	0,55	1,47	0,010					
HSP90AA1		protein_coding	17111,7	0,53	1,44	0,019					
CDC42EP3		protein_coding	10437,8	0,43	1,34	0,024					
CAT		protein_coding	2412,4	-0,41	-1,33	0,034					

Tableau S5: Liste des gènes différentiellement exprimés dans les hépatocytes primaires humains transduits avec un AAV-U7snRNA-Jr53 (résultats DESeq2). FC : fold change ; padj : pvalue ajustée pour tests multiples.

gene name	U7-Jr53 motif	gene type	gene mean expression	log2 (FC) (U7 vs NT)	FC	padj	miRanda results for U7-Jr53 motif				
							hit score	hit energy (kcal/mol)	hit length (pb)	hit identity (%)	hit similarity (%)
MT1X		protein_coding	878,8	-1,43	-2,69	0,000					
MT1G		protein_coding	1101,5	-1,27	-2,42	0,000					
CYGB		protein_coding	428,7	1,23	2,34	0,000					
MDM2	*	protein_coding	34567,4	1,16	2,24	0,000	171	-19,5	34	58,8	73,5
GDNF		protein_coding	550,9	1,04	2,06	0,000					
PTCHD4		protein_coding	84,2	1,03	2,04	0,000					
MT1F		protein_coding	353,6	-0,93	-1,90	0,000					
EDA2R		protein_coding	384,0	0,86	1,82	0,000					
ACER2		protein_coding	290,0	0,83	1,78	0,000					
CDKN1A	*	protein_coding	13883,4	0,82	1,77	0,000	169	-26,2	38	55,3	73,7
DDB2		protein_coding	3028,7	0,82	1,77	0,000					
ASTN2	*	protein_coding	395,8	0,82	1,76	0,000	164	-23,4	42	50,0	69,1
POLH	*	protein_coding	1304,6	0,78	1,71	0,000	174	-32,8	37	59,5	78,4
	*						161	-28,8	38	65,8	68,4
	*						160	-39,0	40	55,0	72,5
MT1M		protein_coding	321,2	-0,77	-1,71	0,000					
TYMS		protein_coding	833,4	0,73	1,66	0,001					
MT1E		protein_coding	2605,6	-0,73	-1,66	0,001					
MT-ND3		protein_coding	2936,0	-0,73	-1,66	0,001					
TRIM22	*	protein_coding	4553,1	0,72	1,64	0,000	177	-29,4	37	62,2	70,3
							160	-31,5	40	60,0	72,5
							166	-23,1	39	56,4	69,2
TIGAR		protein_coding	576,9	0,70	1,62	0,001					
HR		protein_coding	174,3	-0,69	-1,61	0,002					
RRM2B		protein_coding	6586,6	0,68	1,60	0,005					
HES2		protein_coding	670,2	0,67	1,59	0,008					
LINC01021		lincRNA	669,7	0,67	1,59	0,008					
PLK2		protein_coding	12109,4	0,63	1,55	0,009					
HSPA4L		protein_coding	3237,7	0,57	1,49	0,000					
PPM1D	*	protein_coding	733,3	0,57	1,48	0,001	171	-29,5	37	56,8	81,1
CSTB		protein_coding	2337,1	-0,53	-1,45	0,046					
MT1H		protein_coding	527,6	-0,47	-1,38	0,023					
CCDC90B	*	protein_coding	1389,5	0,45	1,36	0,020	176	-26,8	34	55,9	76,5
PCNP		protein_coding	3905,8	0,36	1,28	0,000					

Tableau S6 : Séquences des amorces et des sondes, et conditions des RT-PCR, QPCR et RT-QPCR

Réaction	Transgène	Amorces/Sondes (5'-3')		Chimie	Conditions	Normalisation
QPCR	Dtex53	Forward	TGGCTCGCTACAGACGCAC	Taqman	non communiqué par Génosafe	Albumine (primate)
		Reverse Sonde	GAAGTCAGAAAACCTGCTCCAAAA TGGCCTGTCTCTGTT			
	Albumine primate	For Rev Sonde	non communiqué par Génosafe	Taqman	non communiqué par Génosafe	/
RT-QPCR	U7-E6	For Rev	CCTGTGGATAATTACGAGTTG AGGGGTTTTCCGACCGAAGT	Sybr green	95°C 20s (95°C 3s; 60°C 30s) x40 + courbe de fusion	RPL32
	U7-E8	For Rev	ACTTGTTGAGGCCAAAACCTGG AGGGGTTTTCCGACCGAAGT	Sybr green	95°C 20s (95°C 3s; 60°C 30s) x40 + courbe de fusion	RPL32
	RPL32	For Rev	TGGTTACAGGAGCAACAAGAA GCACATCAGCAGCACTTCA	Sybr green	95°C 20s (95°C 3s; 62°C 30s)x40 + courbe de fusion	/
	U7-Dtex53	For Rev Sonde	CCTGTCCTCTGTTGCCTCC AGGGGTTTTCCGACCGAAGT TTCTGAATTTTTGGAGCAGGTTTTTC	Taqman	95°C 20s (95°C 3s ; 64°C 30s) x45	HPRT
	HPRT	For Rev Sonde	GCTTTCCTTGGTCAGGCAGTA TGGAGTCCTTTTACCAGCA AATCCAAAGATGGTCAAGGTCGCAA	Taqman	95°C 20s (95°C 3s ; 62°C 30s) x40	/
	U7-Jr53	For Rev Sonde	TCA ACT GTT GCC TCC GGT TC GGT TTT CCG ACC GAA GTC AG TCT TGT ACA ATT TTT GGA GCA GGT T	Taqman	95°C 10 min (95°C 15s ; 62°C 1min) x45	POLR-2L
	U7 WT humain	For Rev Sonde	CAGTGTTACAGCTCTTTTAG AGCAAATACCGGAAAGCC ATTTGTCTAGTAGGCTTTCTGGCT	Taqman	95°C 20s (95°C 3s ; 62°C 30S) x40	POLR-2L
	POLR-2L	For Rev Sonde	CCTGGAGAAGTGACCACGCT AATTCGGGGCAGGACGCTCAG CACCCACCGCTGTGCTGACCAT	Taqman	95°C 20s (95°C 3s ; 62°C 30s) x40	/
	U7-Scramble	For Rev Sonde	GGTGTATTGCATGATATGTAAT AGGGGTTTTCCGACCGAAGT TTGGAGCAGGTTTTCTGACTT	Taqman	95°C 10min (95°C 15s ; 58°C 1min) x50	POLR-2L
	Cytochrome B	For Rev Sonde	GCCTATATTACGGATCATTCTCTACT GCCTATGAAGGCTGTTGCTATAGT CCTGAAACATCGGCATTATCCTCCTGCT	Taqman	95°C 20s (95°C 1s ; 60°C 20s) x40	/
	Albumine humaine	For Rev Sonde	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT ACTCATGGGAGCTGCTGGTTC CCTGTGATGCCACACAAATCTCTCC	Taqman	95°C 20s (95°C 1s ; 65°C 20s) x40	/
	DMGDH	For Rev	AGAAGAACGGTTTGTCTGGGA AGCATACACTCGACCCTTGGG	Sybr green	95°C 20s (95°C 3s; 62°C 45s) x40 + courbe de fusion	POLR-2L

	SNTB2	For Rev	GAACAGCACCAAGGACAGGA GATCCCGATGTGTCTCCACC	Sybr green		POLR-2L
	NDUFB10	For Rev	GGACAAGGATGTGTACCCTG CCACTGCATTTCGGCTTCAT	Sybr green		POLR-2L
RT-PCR nichée	<i>dmd</i> canin	For ext	GGAAGCAGCACATAGAGAAC		94°C 5 min ; (94°C 30s; 58°C 1 min; 72°C 2 min) x30 ; 72°C 7 min	
		Rev ext	TCACTTCTTCGACATCATTAG		94°C 5 min ; (94°C 30s; 58°C 30s; 72°C 1min) x25 ; 72°C 5 min	
	<i>dmd</i> humain ou primate	For int	GAGACGCCTCCTAGACCTT		95°C 5 min ; (95°C 1min; 50°C 1 min; 72°C 1 min) x25 ; 72°C 5 min	
		Rev int	CTTCCAAAGCTGTTTGATAAC		95°C 5 min ; (95°C 1min; 50°C 1 min; 72°C 1 min) x30 ; 72°C 5 min	
	PDE4DIP	For ext	GTTACTCTGGTGACACAACC		95°C 5 min ; (95°C 1min; 60°C 1 min; 72°C 1 min) x25 ; 72°C 5 min	
		Rev ext	ATGTGGACTTTTCTGGTATC		95°C 5 min ; (95°C 1min; 60°C 1 min; 72°C 1 min) x30 ; 72°C 5 min	
	DST	For int	ACTAGAAATGCCATCTTCCT		95°C 5 min ; (95°C 1min; 58°C 1 min; 72°C 1 min) x25 ; 72°C 5 min	
		Rev int	CAAGTCATTTGCCACATCTA		95°C 5 min ; (95°C 1min; 58°C 1 min; 72°C 1 min) x30 ; 72°C 5 min	
	TOP1	For ext	GCAGAGAAGTTGGTGCAAGC		95°C 5 min ; (95°C 1min; 60°C 1 min; 72°C 1 min) x25 ; 72°C 5 min	
		Rev ext	GTGACTATGGTGTGCAGCCT		95°C 5 min ; (95°C 1min; 60°C 1 min; 72°C 1 min) x30 ; 72°C 5 min	
		For int	TGGCTGTGCAGGAAGAAGAG		95°C 5 min ; (95°C 1min; 58°C 1 min; 72°C 1 min) x25 ; 72°C 5 min	
		Rev int	GACTGCGTAACACCTGAGC		95°C 5 min ; (95°C 1min; 58°C 1 min; 72°C 1 min) x30 ; 72°C 5 min	
RT-PCR	MyoD	for	AGGCTGGAAGAGGAGGAGA		94°C 5 min 94°C 30s 58°C 30s 72°C 45s 72°C 7 min x30	
		rev	CAACATTTGACAACCACTCCA			
	MYHC3	for	AAGGCTGGAACCTCCCTT			
		rev	CCTTGATTGCTGTTGTACAA			
	myogénine	for	GCAGCCCAGGATGATCTTT			
		rev	AACTCATAGTCTTCATCAGCC			
	CYP2C9	for	ATAACCGTGCCAATCGAGCT			
		rev	TTCTCCCCTGGGTTTTGTT			
RT-PCR	CYP3A4	for	CCAGAGCTGAACCTTGAGGG			
		rev	ACCTGCTACATTTGGGACCG			
	Albumine	for	GAAGTGTTTCGGCATAGCTGC			
		rev	GGTTTTACGATCAGTCAGCA			
	Aldolase B	for	TCACGGCTGACCCTACAGAT			
		rev	GCTCTGGTCCCTGCTTTAC			
		for	AATGGACATGAACAACCTCA			

Thèse de Doctorat

Claire DOMENGER

Caractérisation du profil d'expression et des potentielles cibles off-targets d'un U7snRNA optimisé pour le traitement par saut d'exon de la Dystrophie Musculaire de Duchenne

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique neuromusculaire sévère caractérisée par une dégénérescence progressive des muscles. Elle est due à des mutations sur le gène *dmd* codant la dystrophine, une protéine du cytosquelette.

De nombreuses stratégies de thérapie génique ont récemment émergé pour identifier un traitement correctif de la DMD. Parmi elles, le saut d'exon permet la restauration du cadre de lecture de l'ARN *dmd* et ainsi l'expression d'une dystrophine fonctionnelle. Le saut d'exon peut être obtenu en utilisant de petits ARN nucléaires U7snRNA portant une séquence antisens thérapeutique. Une fois encapsidé dans des vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAV), le U7 permet une correction de l'ARN *dmd* stable dans le temps.

Nous avons montré la capacité d'un vecteur AAV8-U7 à transduire le tissu musculaire et restaurer l'expression de dystrophine chez des chiens GRMD. Ces résultats ouvrent la voie à un essai clinique de phase I/II chez des patients DMD traitables par le saut de l'exon 53.

Dans le cadre du développement de ce produit clinique, nous avons caractérisé le profil d'expression du transgène U7 dans des contextes musculaire et hépatique (le foie étant un organe non ciblé mais bien transduit *in vivo* par l'AAV8). Enfin, nous avons analysé les potentiels effets off-targets spécifiques du produit clinique U7 en identifiant les transcrits cibles de sa séquence antisens. Cette étude a été réalisée *in vitro* sur des cellules humaines via une approche combinée de RNA Sequencing et d'analyses *in silico*. Les résultats de cette étude seront clé pour documenter la biosécurité du produit thérapeutique avant l'essai clinique prévu en 2016.

Mots clés : Dystrophie musculaire de Duchenne, U7snRNA, saut d'exon, off-target, essai clinique

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe neuromuscular disorder characterized by progressive degeneration of whole muscle tissues. It is caused by mutations in the *dmd* gene encoding the dystrophin, a cytoskeleton protein.

Many gene-based therapeutic strategies have recently emerged to identify a corrective treatment for DMD. Among them, exon skipping allows the restoration of the reading frame of the *dmd* messenger and then the production of a functional dystrophin protein. Exon skipping can be achieved using modified small nuclear RNA, U7snRNA, in which a therapeutic antisense sequence is inserted. Such U7snRNA can be packaged in vectors derived from adeno-associated virus (AAV), allowing a long-lasting repair of the *dmd* messenger.

We recently published the high ability of an AAV8-U7 vector to transduce skeletal muscles and to restore the expression of dystrophin in GRMD dogs. These results pave the way for a phase I/II clinical trial in DMD patients treatable by skipping of the exon 53 of the *dmd* messenger.

As part of the development of this therapeutic product, we characterized the expression profile of the U7 transgene in muscle and liver contexts (the liver being a non-targeted organ but well transduced by AAV8 *in vivo*). Then, we analyzed the potential off-target effects specific of the clinical U7 transgene by identifying the transcripts targeted by its antisense sequence. This study was performed *in vitro* on human cells models via a combined approach of RNA Sequencing and *in silico* analysis. The results of this study will be of particular importance to document the biosafety of this therapeutic product, before the beginning of the clinical trial, planned in 2016

Key words : Duchenne muscular dystrophy, U7snRNA, exon skipping, off-target, clinical trial