

# Thèse de Doctorat

Jean-Baptiste DUPONT

*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** 21 Septembre 2015

**Thèse N°** :

## Pharmacologie moléculaire des vecteurs adéno-associés recombinants dans le muscle squelettique déficient en dystrophine

### JURY

Rapporteurs : **Isabelle RICHARD**, Directeur de Recherche, INSERM U951, CNRS UMR8587, Généthon  
**Vincent MOULY**, Directeur de Recherche, CNRS UMR7215, Institut de Myologie

Examineur : **George DICKSON**, Professor, School of Biological Sciences, Royal Holloway, University of London

Directeur de Thèse : **Philippe MOULLIER**, Directeur de Recherche, INSERM UMR 1089

Co-encadrant de Thèse : **Adrien LÉGER**, Post-doctorant, INSERM UMR 1089

*Alle Dinge sind Gift, und nichts ist ohne Gift;  
allein die Dosis macht, daß ein Ding kein Gift ist.*

Paracelsus

# Remerciements

Pour m'avoir co-encadré pendant plus de trois ans maintenant, pour l'influence qu'ils ont chacun eu sur la fin de mes études, et pour avoir façonné et remodelé ma façon de penser et de faire la science, je tenais particulièrement à remercier Philippe et Adrien. Merci de m'avoir permis de travailler dans des conditions optimales, de m'avoir encouragé et laissé l'autonomie nécessaire à ma formation. J'espère tirer parti le plus longtemps possible de vos enseignements.

Pour m'avoir accueilli au sein du laboratoire à la fin de ma Licence il y a (déjà) 5 ans, je tenais également à remercier Fabienne ainsi que toute l'équipe « Rétine ». En 2009, sept semaines leur avaient suffi pour me convaincre d'adopter l'AAV.

Pour avoir accepté de relire ce manuscrit et y avoir apporté leur expertise et leurs conseils, ainsi que pour avoir accepté d'évaluer la soutenance de cette thèse, je remercie pleinement les Dr. Isabelle Richard et Vincent Mouly.

I also genuinely thank Pr. George Dickson for traveling accross the sea and bringing his vision and discussions during this PhD defence.

Merci à Stéphanie Lorain et Richard Snyder d'avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse pendant ces trois années. Les conseils avisés qu'ils m'ont prodigué lors de nos reunions annuelles ont été d'une grande aide.

Dans les dernières heures de la rédaction de ce manuscrit, merci à Bod, Thibaut, Mia, Caro et Sandra pour leurs avis et conseils éclairés.

Une partie non négligeable des expériences présentées ci-après ont été réalisées avec l'appui de Benoît (et Romain, sur la fin), que je souhaitais aussi remercier pour leur implication dans ces différents projets, et pour avoir supporté avec moi les centaines de PCR quantitatives qui s'imposaient à mesure de leur réalisation. Merci aussi aux 2 autres membres de l'équipe, à savoir Émilie et Benjamin, pour leurs discussions en réunion d'équipe. Et à Magalie bien sûr, grâce à qui ce projet a commencé.

Un grand merci à l'ensemble de nos collaborateurs, notamment toute l'équipe de « généthonniers » (Alban, Laëtitia, Béatrice, Bernard, Christophe, Émilie, Laurence, et j'en passe), sans qui ces projets n'auraient concrètement pas pu être réalisés. Merci pour votre aide, votre professionnalisme, et pour avoir supporté nos facéties et élucubrations pendant ces années (l'équilibration du pH du NAC tous les 3 jours restera, je l'espère, un grand moment de vos carrières). Certains membres de l'UMR INRA 703, notamment Laurence, Thibaut et Mireille nous ont également apporté leur expertise histologique et microscopique à plusieurs occasions ; merci à vous pour ces échanges. Enfin, merci aux acteurs du réseau DMD/ $\mu$ Dys (Pr. Thomas Voit, Dr. Fulvio Mavilio et Pr. George Dickson) pour nous avoir permis d'utiliser des échantillons de chien GRMD.

Nous n'aurions pas pu en faire autant sans l'appui des plate-formes de la SFR François Bonamy et de leur personnel, en particulier la plate-forme MicroPiCell (Philippe Hulin et Myriam Robard), la plate-forme INGB (Pierre Lindenbaum), et, bien sûr...

...**NOTRE** CPV, pour ses merveilleux lots de vecteurs AAVr. Par la même occasion, merci à Dominique et à Christine pour leurs conseils pour vaincre les clonages récalcitrants ; et de manière plus générale, merci à tous les membres du labo pour les discussions enrichissantes que nous avons pu avoir ces 3 dernières années. Merci aussi à ceux avec qui on discute moins mais sans qui rien ne peut se faire, notamment Anita, Françoise et Manuella toujours indispensables, et les filles de la laverie pour avoir autoclavé sans relâche nos mortiers, pilons, spatules et autres dounces.

Pour continuer, merci aux experts de l'équipe RE2 pour n'avoir jamais rechigné à instruire, aider ou former le jeune Master / thésard que j'ai pu être, notamment Mickaël, Virginie, Caroline et Mia. Vous formez une belle équipe.

Et puis, bien sûr, il y a celles et ceux de l'openspace. Sans vous, il faut l'avouer, il aurait été bien plus déprimant de se lever ces 1300 et quelques matins. Certain(e)s d'entre vous seront peut-être déçu(e)s de ne pas avoir 150 pages dédiées à eux (elles) seul(e)s, mais c'est bien vous tous, avec vos qualités et vos défauts, qui avez rendu ces années agréables à vivre. Je souhaite à tout le monde de pouvoir un jour (OK, peut-être seulement un jour ^^) travailler avec des collègues comme vous. Au fil des mois vous êtes d'ailleurs devenus bien plus que cela.

Certains professeurs / chercheurs / médecins ont particulièrement marqué mon parcours, avant ou pendant ma thèse. Je tenais aussi à leur adresser mes remerciements pour avoir posé quelques jalons :

- tout d'abord Mme Pelletier, qui a passé la moitié de l'année de 3<sup>ème</sup> à nous parler des maladies génétiques. Sans elle j'aurais peut-être étudié l'astrophysique, la thermodynamique, voire même l'**immunologie** ;
- tous les enseignants de la prépa BCPST de l'EDEN. Merci à eux qui me corrigeaient mes sujets de concours ENS pendant leurs vacances ;
- Alex, chez qui j'ai pu effectuer mon premier « vrai » projet de recherche, et qui a renforcé ma volonté de travailler sur le muscle ;
- Sandra, pour m'avoir permis de découvrir le versant clinique des maladies neuromusculaires, de participer aux « CMD » et aux « staffs » du service de génétique médicale du CHU de Nantes, et de comprendre pourquoi j'avais choisi ce métier ;
- Tanguy, pour m'avoir fait découvrir l'enseignement dans le supérieur. Je me souviendrai longtemps des 3 x 2 h de psychophysio du Vendredi.

D'un point de vue plus personnel, merci à ma famille. Mes parents d'abord, pour m'avoir appris à faire des gomettes dès mon plus jeune âge et pour l'amour qu'ils me donnent quotidiennement depuis 26 ans maintenant. Ma petite sœur ensuite, qui se croit à tort souvent moins forte que moi (mais ça changera quand on comparera nos salaires...). Mes grands-parents / oncles / tantes / cousins et cousines enfin, qui ont toujours été là pour moi. J'espère que les CHAGBAMALUCACO auront encore l'occasion de se retrouver à Brétignolles (ou peut-être outre-Atlantique !).

Enfin, merci à tous mes amis :

- ceux avec qui j'ai appris à transformer des Animutants, à cloner des Pokémon, à *fragger* des Covenants, à repêcher des ballons dans la Chézine et à faire disparaître la... CLÉÉÉÉÉ à Lousmouss ;
- ceux avec qui j'ai appris à disséquer les sépales des scrofulariacées, différencier les plagiocalse albite et anorthite, diagonaliser les matrices et fabriquer des électrodes au calomel saturé ;
- ceux avec qui j'ai appris qu'il est plus facile d'endormir une drosophile que d'attraper un nématode, qu'en fait c'est « SZOSTAK !! » et « *Agrrrobacterium* » les plus forts, et que « Rabbi Jacob sait très bien danser ! » ;
- ceux avec qui j'ai appris que faire un minion avec des morceaux de carton c'est possible, que les quiches oignon/jambon sont très nourrissantes et que parfois les Perok' cachent bien leur jeu ;
- ceux avec qui j'ai appris que le Mercredi soir (mais pas le Mardi, non mais oh !) il suffit parfois de pâtes-bolo pour faire un bon repas.

Pour terminer, un grand merci aux radicaux libres. Votre obstination à ne pas respecter la règle de l'octet fait de vous les « enfants terribles » du monde de la chimie. Vous pouvez être dangereux mais savez aussi vous montrer indispensables, nous rappelant qu'il est parfois nécessaire de ne pas respecter les règles.



# Table des matières

<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	<b>11</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b>	<b>13</b>
<b>AVANT-PROPOS</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>19</b>
1. LE SYSTEME MUSCULAIRE DES MAMMIFÈRES	21
2. LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE	48
3. LA THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA DMD	72
4. RÉGULATION DE L'EXPRESSION DES GÈNES CHEZ LES MAMMIFÈRES	98
5. SYNTHÈSE	125
<b>ÉTUDE I</b>	<b>128</b>
<b>ÉTUDE II</b>	<b>158</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>180</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>199</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>202</b>



# Liste des figures et tableaux

En l'absence de mention contraire de ma part (figure tirée de..., adaptée de... ou inspirée de...), les figures suivantes ont été entièrement réalisées par moi-même principalement à l'aide des logiciels Inkscape ou PRISM 5© (GraphPad Software). L'ensemble de ces dernières est placé sous la licence [Creative Commons BY-NC-SA 3.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/) autorisant leur libre reproduction, modification et diffusion pour toute utilisation à but non commercial et sous réserve d'être publiées sous cette même licence en citant mes noms et prénoms.

Figure 1 : Schéma simplifié de l'anatomie d'un muscle strié squelettique. ....	23
Figure 2 : Schéma représentatif d'une fibre musculaire squelettique. ....	24
Figure 3 : Organisation des différentes couches concentriques du coeur. ....	27
Figure 4 : Organisation simplifiée d'un sarcomère en deux dimensions. ....	31
Figure 5 : Organisation simplifiée d'un costamère. ....	34
Figure 6 : Mécanisme moléculaire du déclenchement de la contraction musculaire. ....	36
Figure 7 : Dialogue entre les ions $Ca^{2+}$ , les ROS et l'ATP dans une cellule musculaire. ....	41
Figure 8 : Activation des cellules satellites et événements moléculaires associés. ....	45
Figure 9 : Histoire naturelle de la dystrophie musculaire de Duchenne. ....	51
Figure 10 : Carte schématique du transcrit et du cadre ouvert de lecture DMD. ....	54
Figure 11 : La dystrophine et son complexe protéique associé. ....	57
Figure 12 : Amplification incontrôlée du déséquilibre calcique / oxydatif. ....	63
Figure 13 : Oxydation des nucléotides désoxyguanine de l'ADN. ....	65
Figure 14 : Implication des macrophages dans la régénération musculaire. ....	67
Figure 15 : Exemple mécanistique du saut d'exon de l'ARNm DMD. ....	75
Figure 16 : Schéma représentatif du génome de l'AAV sauvage. ....	80
Figure 17 : Principe de production de vecteurs AAV2/n recombinants. ....	81
Figure 18 : Tropisme des principaux sérotypes d'AAV recombinants. ....	82
Figure 19 : Contrôle de la synthèse du second brin des vecteurs AAVr. ....	86
Figure 20 : Étapes de la transduction d'une cellule par un vecteur AAVr. ....	89
Figure 21 : Dogme central de la biologie moléculaire. ....	99
Figure 22 : Méthylation et déméthylation des cytosines de l'ADN. ....	101
Figure 23 : Hypothèse de régulation épigénétique de l'activation de la voie Notch. ....	103
Figure 24 : Marques épigénétiques au niveau de différentes régions du génome. ....	104

Figure 25 : Aperçu de la régulation épigénétique de la myogenèse. -----	107
Figure 26 : Aperçu du mécanisme d'épissage chez les eucaryotes. -----	113
Figure 27 : Schéma d'un ARN messenger épissé en cours de traduction. -----	116
Figure 28 : Aperçu de la régulation post-transcriptionnelle de la myogenèse. -----	118
Figure 29 : Méthylation des ribonucléotides adénosine de l'ARN. -----	120
Figure 30 : Devenir moléculaire d'un ARNm oxydé. -----	123
Figure 31 : Synthèse de l'introduction.-----	127
Figure 32 : Protocole d'injection et souris utilisées dans l'étude I.-----	132
Figure 33 : Schéma du vecteur AAVr2/8 RSV GFP utilisé dans l'étude I. -----	133
Figure 34 : Principe de notre protocole de ChIP / qPCR. -----	135
Figure 35 : Métabolisme intracellulaire du NAC. -----	161
Figure 36 : Protocole d'injection et souris utilisées dans l'étude II.-----	162
Figure 37 : Schéma du vecteur AAVr2/9 c5-12 muSeAP utilisé dans l'étude II. -----	165
Figure 38 : Répartition des tâches de l'étude II entre les différents partenaires. -----	169
Figure 39 : Schéma du protocole automatisé utilisé sur le logiciel ICY.-----	171
Figure 40 : Masse et mortalité des souris mdx4Cv traitées au NAC.-----	174
Figure 41 : Évolution de la masse médiane des souris de l'étude II. -----	174
Figure 42 : Mesure de l'anisocytose dans les muscles des souris de l'étude II. -----	176
Figure 43 : Immunofluorescence anti- $\gamma$ H2Ax sur coupe histologique de muscle.-----	177
Tableau 1 : Comparaison métabolique des fibres musculaires lentes et rapides. -----	39
Tableau 2 : Phases cliniques de la DMD, symptomatologie et prise en charge proposée. -----	50
Tableau 3 : Pharmacologie chez la souris mdx. -----	71
Tableau 4 : Tropisme des principaux sérotypes de vecteurs AAVr. -----	82
Tableau 5 : Études utilisant des vecteurs AAVr chez la souris mdx et le chien GRMD. -----	96-97
Tableau 6 : Exemples de modifications post-traductionnelles des histones. -----	105
Tableau 7 : Catégories d'histone désacétylases. -----	109
Tableau 8 : Récapitulatif des souris utilisées lors de l'étude I. -----	132
Tableau 9 : Récapitulatif des souris utilisées lors de l'étude II. -----	165

# Abréviations

$\alpha$ -SMA : *alpha smooth muscle actin*  
6-mA : 6-méthyladénine  
8-OHdG : 8-hydroxy(désoxy)guanine  
8-OHG : 8-hydroxyguanine  
AAP : *assembly-activated protein*  
AAV : *adeno-associated virus*  
AAVr : AAV recombinant  
Ach : acétylcholine  
AchR : *acetylcholine receptor*  
ActIIB-R : *activin IIB receptor*  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN codant  
ALKBH5 : *alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog 5*  
Alppl2 : *alkaline phosphatase, placental-like 2*  
ARE : *AU-rich element*  
ARN : Acide ribonucléique / ARNm : ARN messenger / ARNt : ARN de transfert  
ATM : *ataxia telangiectasia mutated*  
ATP : adénosine triphosphate  
B6 : souris C57BL/6J  
BMD : *Becker muscular dystrophy*  
BSA : *bovine serum albumin*  
CBC : *cap-binding complex*  
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine  
CK : créatine kinase  
CLIC / GEEC : *clathrin-independent carriers / GPI-enriched endocytic compartment*  
CMAH : *cytidine monophosphate sialic acid hydroxylase*  
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité  
CMV : cytomégalovirus  
CPA : cellule présentatrice d'antigène  
CRISPR : *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*  
CRR : *CpG-rich region*  
CUGBP2 : *CUG-binding protein 2*  
CXMDJ : *canine X-linked muscular dystrophy in Japan*  
DAPC : *dystrophin-associated protein complex*  
DGC : *dystrophin glycoprotein complex*  
DHPR : *dihydropyridin receptor*  
DMD : dystrophie musculaire de Duchenne  
DNA-PK : *DNA-dependent protein kinase*  
DNMT : *DNA methyltransferase*  
Dp : *dystrophin promoter*  
dPBS : *Dulbecco's phosphate buffer saline*

EDL : *extensor digitorum longus*  
EGCG : épigallocatechine gallate  
EGFR : *epidermal growth factor receptor*  
EGFR-PTK : EGFR - *protein tyrosine kinase*  
ERK : *extracellular signal-regulated kinase*  
ESE / ESS : *exonic splicing enhancer / silencer*  
EZH2 : *enhancer of zeste homolog 2*  
FGFR : *fibroblast growth factor receptor*  
FKBP52 : *FK506-binding protein 4*  
FTO : *fat mass obesity-associated protein*  
GFP : *green fluorescent protein*  
GRMD : *golden retriever muscular dystrophy*  
GSH : glutathion réduit  
GSSG : glutathion oxydé  
HAT : histone acétyl-transférase  
HDAC : histone désacétylase  
HEK293 : *human embryonic kidney 293*  
HGFR : *hepatocyte growth factor receptor*  
Hprt : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase  
HPTM : *histone post-translational modification*  
HuR : *human antigen R*  
HSP : *heat shock protein*  
HSPG : *heparan sulphate proteoglycan*  
hnRNP : *heterogenous ribonucleoprotein*  
IFN : interféron  
IL : interleukine  
IM : intramusculaire  
IP : *input*  
IRES : *internal ribosome entry site*  
ITR : *inverted terminal repeat*  
IV : intraveineuse  
JMJD2 : *Jumonji domain 2*  
kb : kilobase  
kD : kilodalton  
KSRP : *K-homology splicing regulator protein*  
LamR : *laminin receptor*  
LPLD : *lipoprotein lipase deficiency*  
LR : locorégionale  
KSRP : *K-homology splicing regulator protein*  
m7G : 7-méthylguanosine  
MAPK : *mitogen-activated protein kinase*  
MCK : *muscle creatin kinase*  
mdx : *muscle dystrophy, X-linked*  
mdx4Cv : *mdx chemical variant 4*

MeCP : *methyl-CpG-binding protein*  
METTL : *methyltransferase-like*  
MLP : *muscle LIM protein*  
MMF : *mycophénolate mofétil*  
MMLV : *Moloney murine leukemia virus*  
MPTP : *mitochondrial permeability transition pore*  
MRF4 : *myogenic regulatory factor 4*  
MRN : *Mre11 – Rad50 – Nbs1*  
muSeAP : *murine secreted alkaline phosphatase*  
Myf5 : *myogenic factor 5*  
MyoD : *myogenic differentiation*  
mTOR : *mammalian target of rapamycin*  
NAC : *N-acétylcystéine*  
NADPH : *nicotinamide adénine dinucléotide phosphate*  
NBT / BCIP : *nitro blue tatrazolum / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate*  
NF- $\kappa$ B : *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*  
NHEJ : *non-homologous end joining*  
nNOS : *neuronal nitric oxide synthase*  
NO : *monoxide d'azote*  
NOX : *NADPH oxydase*  
NCX : *Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger*  
NGD : *no-go decay*  
NMD : *nonsense-mediated decay*  
OA : *oligonucléotide antisens*  
PABP : *polyA-binding protein*  
pb : *paire de bases*  
PCAF : *p300/Creb-binding protein-associated factor*  
PDGFR : *platelet-derived growth factor receptor*  
PGC-1 $\alpha$  : *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$*   
PI3K : *phosphoinositide 3-kinase*  
Pol II : *ARN polymérase II*  
PP2A : *protéine phosphatase 2A*  
P-TEFb : *positive transcription elongation factor b*  
qPCR : *reaction en chaîne de la polymerase, quantitative*  
RBP : *RNA-binding protein*  
Rian : *RNA imprinted and accumulated in nucleus*  
RIP : *immunoprécipitation d'ARN*  
RNP : *ribonucléoprotéine*  
ROS : *reactive oxygen species*  
RQ : *relative quantity*  
RSV : *Rous sarcoma virus*  
RT-qPCR : *reverse-transcription suivie d'une qPCR*  
RyR : *ryanodin receptor*  
SA / SD : *site accepteur / donneur d'épissage*

SAC : *stretch-activated channel*  
sc / ssAAV : *self-complementary / single-stranded AAV*  
SERCA : *sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase*  
shRNA : *short hairpin RNA*  
SLA : *sclérose latérale amyotrophique*  
SMD : *Staufen-mediated decay*  
snRNP : *small nuclear ribonucleoprotein*  
SOD : *superoxyde dismutase*  
SOL : *soleus*  
SPF : *specific pathogen-free*  
SR : *spectrin-like region*  
SUV39H : *suppressor of variegation (3-9) homolog 1*  
SV : *simian virus*  
TA : *muscle tibialis anterior*  
TALEN : *transcription activator-like effector nuclease*  
TC-PTP : *T-cell – protein tyrosine phosphatase*  
TET1 : *ten eleven translocation 1*  
TFII : *facteur général de transcription de la Pol II*  
TGF- $\beta$  : *transforming growth factor  $\beta$*   
Tip60 : *TAT-interacting protein 60 kD*  
TNF : *tumor necrosis factor*  
TRPC1 : *transient receptor potential canonical 1*  
TSS : *transcription start site*  
TTP : *tristétraproline*  
UTR : *untranslated*  
vg : *vector genome*  
vg/dg : *vg normalisé par génome diploïde*  
VIH : *virus de l'immunodéficience humaine*  
Wnt : *Wingless homolog / integration1*  
X-SCID : *X-linked severe combined immunodeficiency*  
YY1 : *Yin Yang 1*  
ZFN : *zinc finger nuclease*

## **Avant-propos**

Le bon fonctionnement d'un organisme requiert le maintien en continu d'une homéostasie aussi bien à l'échelle des cellules individuelles que des organes ou des systèmes physiologiques. Pour ce faire, des mécanismes endogènes sont capables de détecter les variations de différents paramètres et d'agir en conséquence afin de les maintenir à des valeurs relativement stables. Même si l'efficacité de ces systèmes évolue au cours du temps, ces transitions sont lentes, progressives, et entrent dans le processus normal du vieillissement des organismes. Dans une certaine mesure, les maladies ou les blessures peuvent être considérées comme des ruptures homéostatiques, c'est-à-dire des défaillances de ces systèmes de contrôle. Dans les cas les moins graves, ces défaillances ne sont que transitoires et l'organisme enclenche une réponse adaptée permettant le retour rapide à l'homéostasie. Pour des contraintes de plus grande ampleur cependant, une intervention médicale ponctuelle peut s'avérer indispensable pour rétablir l'équilibre. Les maladies génétiques s'inscrivent dans un cadre particulier car elles imposent sur l'organisme une rupture homéostatique permanente. Si les mécanismes de contrôle endogènes ne suffisent pas à prendre en charge ces ruptures, c'est alors à la médecine d'apporter une réponse thérapeutique qui soit elle aussi permanente. Jusqu'à la fin du vingtième siècle, cette réponse se traduisait par une prise en charge en continu des patients depuis le moment où les premiers symptômes apparaissaient. Depuis, la thérapie génique s'est peu à peu développée et est devenue, dans certains cas bien définis, une alternative prometteuse.

Cette technique innovante de médecine moléculaire vise à utiliser un acide nucléique comme un véritable médicament à injecter dans les cellules du patient, dans l'espoir qu'il compense le défaut génétique causant la maladie. Dans ce cadre, la transformation de certains virus en vecteurs recombinants a permis de transporter des transgènes thérapeutiques de manière très efficace dans les cellules des patients. Lors d'essais thérapeutiques récents, le niveau d'expression du transgène d'intérêt a même été suffisamment élevé pour permettre une restauration au moins partielle de l'homéostasie, améliorant les conditions de vie des patients de manière notable. Alors que pour certaines maladies la thérapie génique ressemble de plus en plus à une option thérapeutique crédible, d'autres sont plus récalcitrantes.

Notamment, la dystrophie musculaire de Duchenne concentre depuis ces dernières années l'attention de nombreuses équipes de recherche fondamentale et translationnelle. Même si le gène responsable de cette maladie a été caractérisé il y a plus de vingt-cinq ans, la relation entre le génotype et les différents phénotypes pathologiques est encore sujette à controverse. Il semble que les cellules et les tissus musculaires des patients soient soumis à une rupture homéostatique multifactorielle et autoamplifiée, caractérisée par un ensemble de perturbations structurales ou métaboliques. Dans ce cadre, le rétablissement de l'homéostasie semble être un défi particulièrement difficile à relever, qui plus est s'il doit concerner l'intégralité du système musculaire (celui-ci représente en effet 30 à 50 % de la masse corporelle). Ces dernières années, de nombreuses études précliniques ont été menées dans le but d'augmenter le niveau d'expression du transgène délivré par les vecteurs viraux recombinants, dans l'espoir de faire pencher la balance en faveur d'une homéostasie à long terme. Mais les déboires rencontrés lors des premiers essais de thérapie génique chez l'Homme au début des années 2000 incitent à la prudence et à la modération. De plus, ils soulignent l'importance de caractériser le plus précisément possible les interactions qui s'établissent entre les vecteurs viraux et les tissus ou les cellules dans lesquels ils seront délivrés.

Dans cette optique, le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a eu pour objectif de définir ces interactions et d'identifier des facteurs de restriction susceptibles de défavoriser une expression à long terme du transgène. À terme, il s'inscrit dans une stratégie globale visant elle aussi à restaurer une homéostasie durable, mais en se focalisant sur le tissu musculaire pathologique plutôt que sur le vecteur recombinant injecté.

# Introduction

<b>1. LE SYSTEME MUSCULAIRE DES MAMMIFÈRES</b> .....	<b>21</b>
1.1. LES DIFFERENTS CONSTITUANTS DU SYSTEME MUSCULAIRE .....	21
1.2. LA CONTRACTION DES MUSCLES STRIES .....	30
1.3. ASPECTS METABOLIQUES DU TRAVAIL MUSCULAIRE .....	37
1.4. REPONSE DU SYSTEME MUSCULAIRE STRIE AUX DOMMAGES .....	42
<b>2. LA DYSTROPHIE MUSCULAIRE DE DUCHENNE</b> .....	<b>48</b>
2.1. PREMIERS TRAVAUX ET TABLEAU CLINIQUE .....	48
2.2. ÉTIOLOGIE DE LA DMD .....	53
2.3. LES MODELES ANIMAUX DE LA DMD .....	55
2.4. PHYSIOPATHOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE DE LA DMD .....	61
2.5. PHARMACOLOGIE DE LA DMD .....	69
<b>3. LA THERAPIE GENIQUE DE LA DMD</b> .....	<b>72</b>
3.1. BASES CONCEPTUELLES ET TYPES DE VECTEURS UTILISES .....	72
3.2. ESSOR DES VECTEURS AAV RECOMBINANTS .....	78
3.3. OPTIMISATION DES VECTEURS AAVR POUR LE CIBLAGE DU MUSCLE .....	88
3.4. ÉTUDES PRE-CLINIQUES DANS LES MODELES ANIMAUX DMD .....	94
<b>4. REGULATION DE L'EXPRESSION DES GENES CHEZ LES MAMMIFERES</b> .....	<b>98</b>
4.1. ORGANISATION DE LA CHROMATINE ET REGULATION DE LA TRANSCRIPTION .....	98
4.2. METABOLISME DE L'ARN ET REGULATIONS POST-TRANSCRIPTIONNELLES .....	111
<b>5. SYNTHÈSE</b> .....	<b>125</b>



# **1. Le système musculaire des mammifères**

Les muscles sont les organes du mouvement et du maintien de la posture. Que ce soit les mouvements des membres, du sang ou des fluides biologiques, ils sont capables de générer une énergie mécanique utilisable par l'organisme. À cette fonction majeure répond une complexité structurale tant à l'échelle macroscopique qu'au niveau des cellules individuelles composant ces organes. Par leur organisation et leurs relations étroites, ces cellules confèrent au système musculaire ses propriétés intrinsèques : contractilité ou extensibilité, excitabilité, conductibilité et élasticité. L'objet de cette première partie est de poser les bases histologiques et moléculaires permettant de comprendre comment se traduisent ces propriétés à l'échelle de l'organe et de la cellule. Elles nous serviront ensuite pour interpréter les phénotypes pathologiques dans le cadre de la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) et pour comprendre la complexité des approches de thérapie génique.

## **1.1. Les différents constituants du système musculaire**

### **1.1.1. Les muscles striés squelettiques**

Comme leur nom l'indique, ces muscles entretiennent un lien étroit avec le squelette. Lorsqu'ils sont reliés aux os par l'intermédiaire des tendons, ils vont permettre le déplacement relatif de ces os et donc le mouvement à l'échelle de l'organisme, ou le maintien de la posture. Mais les os ne sont pas les seuls à interagir avec les muscles squelettiques : certains d'entre eux sont connectés à l'hypoderme de la peau (comme certains muscles de l'expression faciale), la sclère de l'œil (muscles extrinsèques de l'œil), voire avec d'autres muscles (muscles extrinsèques de la langue). Outre les mouvements du squelette et d'autres organes, les muscles squelettiques sont également impliqués dans la protection et le soutien des organes internes (muscles de la cavité abdominale et du plancher pelvien) ou encore dans l'acheminement et l'élimination des matières ingérées (sphincters externes de l'anus ou de l'urètre). À l'échelle de l'organisme humain adulte, cette diversité fonctionnelle aboutit à plusieurs centaines de muscles striés squelettiques qui représentent 30 à 50% de la masse corporelle. Malgré cela, l'étude histologique des muscles squelettiques révèle une organisation conservée.

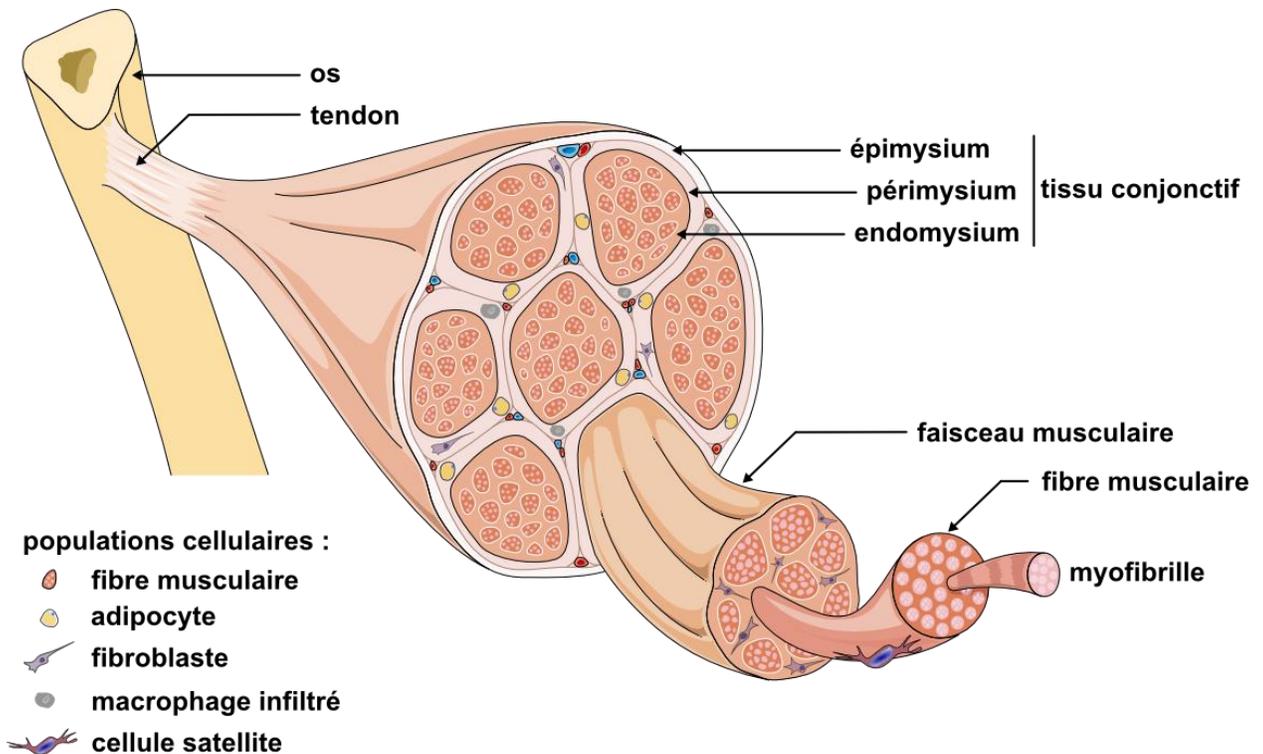
## a. Organisation histologique du muscle strié squelettique

Les muscles striés squelettiques sont constitués de deux types tissulaires intriqués : un tissu musculaire contractile et un tissu conjonctif de soutien (**Figure 1**). Le tissu musculaire est organisé en faisceaux accolés, c'est à dire en groupes de cellules musculaires parallèles entre elles. Le soutien de ces cellules est assuré par un tissu conjonctif dense interstitiel, composé principalement de collagène (majoritairement du collagène de type I et III, [Light 1984](#)), de glycoprotéines ([Bertolotto 1983](#)) et de protéoglycanes ([Bertolotto 1987](#)), molécules classiquement rencontrées dans les matrices extracellulaires ([Gillies 2011](#)). Le réseau formé par ces molécules est communément séparé en trois entités (**Figure 1**) :

- l'endomysium, qui recouvre la lame basale autour de chaque cellule musculaire individuelle ;
- le pérимysium, autour de chaque faisceau de cellules, au sein duquel passent de nombreuses fibres nerveuses et vaisseaux sanguins ;
- l'épimysium, qui recouvre le muscle dans son ensemble.

Les extrémités de ces trois tissus finissent par se rejoindre et former des structures spécialisées dans la transmission du mouvement (tendons, aponévroses, raphés). Même s'il reste difficile d'isoler et de purifier biochimiquement ces trois tissus conjonctifs, certains auteurs sont parvenus à les différencier en fonction de leur composition chimique ([Light 1984](#)). D'autres considèrent cependant la matrice extracellulaire des muscles squelettiques davantage comme un continuum structural et fonctionnel ([Gillies 2011](#)), intégrant et transmettant le mouvement généré par chaque cellule de chaque faisceau aux extrémités des muscles squelettiques ([Turrina 2013](#)). Les bases moléculaires de cette transmission de mouvement seront détaillées dans la **partie 1.2** de cette introduction.

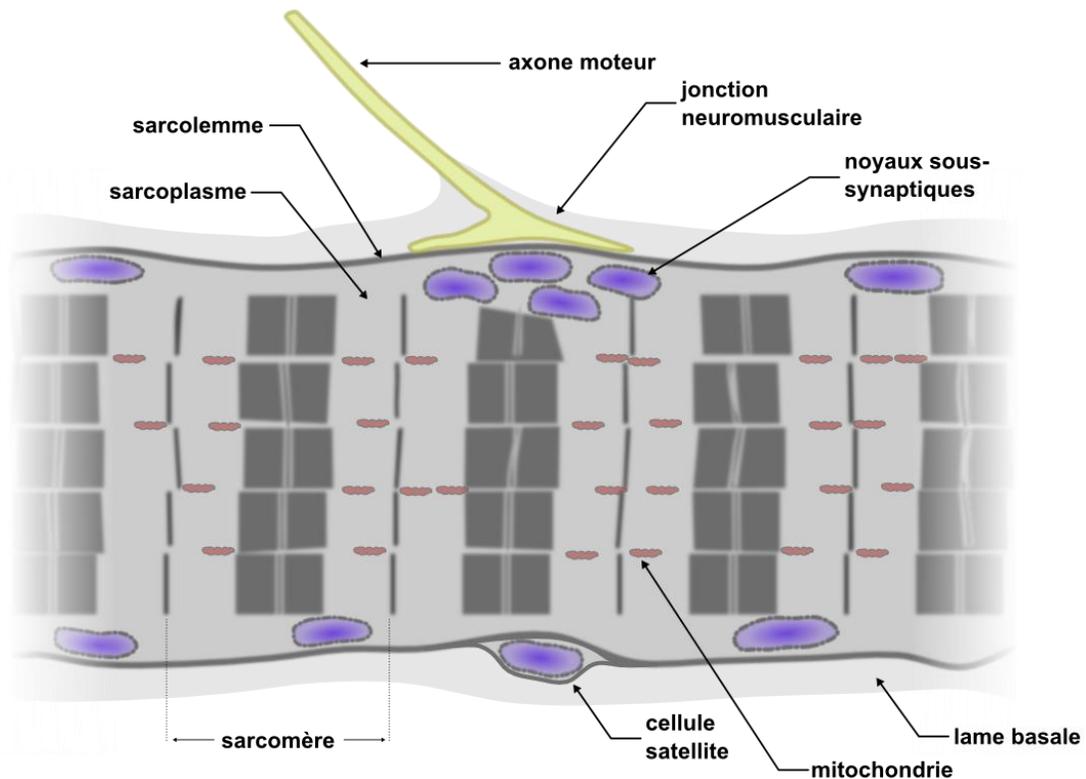
En plus du tissu conjonctif au sens strict décrit ci-dessus, les muscles squelettiques contiennent aussi parfois du tissu adipeux, pouvant être localisé à deux endroits distincts : entre des muscles différents d'un même groupe (tissu adipeux épimysial), ou entre des faisceaux musculaires au sein d'un même muscle (tissu adipeux pérимysial) ([Kim 2004](#)). Presque absent chez le jeune adulte en conditions physiologiques, il apparaît néanmoins avec l'âge ([Song 2004](#)) ou en cas de sédentarité ([Manini 2007](#)). Sa présence est de plus associée à certains phénotypes pathologiques, notamment chez les patients atteints de DMD. Plus de détails sur ces phénotypes seront donnés dans la **partie 2.1**.



**Figure 1** : Schéma simplifié de l'anatomie d'un muscle strié squelettique fusiforme coupé transversalement. Il décrit l'organisation de l'organe en faisceaux de fibres musculaires parallèles et entourés des trois couches de tissus conjonctifs (épi-, péri- et endomysium), qui se relie à l'extrémité du tendon. Certaines populations cellulaires résidentes sont également représentées. Figure adaptée d'une planche illustrative Servier Medical Art (<http://www.servier.fr/slidekit/?item=145>).

## b. Populations cellulaires du muscle strié squelettique

Les cellules musculaires striées squelettiques constituant les faisceaux musculaires, également appelées fibres musculaires, se distinguent en premier lieu par leur taille. Chez l'Homme, leur longueur s'échelonne de 100  $\mu\text{m}$  à 30 cm et leur diamètre de 10 à 500  $\mu\text{m}$ . Cette taille importante est associée à une plurinucléation des fibres, qui forment alors des syncytia (**Figure 2**). Notons que dans le muscle adulte quiescent, ces noyaux se répartissent de manière relativement homogène en périphérie des fibres, où ils sont plaqués contre la membrane plasmique, le sarcolemme ([Bruusgaard 2003](#)). Le cytoplasme des fibres musculaires (ou sarcoplasme) est parcouru de stries transverses caractéristiques du tissu. Cet agencement quasi-cristallin résulte de la présence de myofibrilles, des systèmes protéiques architecturés s'étendant sur toute la longueur des fibres musculaires et dont l'unité de base est le sarcomère. Ces



**Figure 2** : Schéma représentatif d'une fibre musculaire squelettique vue en coupe longitudinale, au niveau d'une jonction neuromusculaire. La fibre se poursuit longitudinalement aux deux extrémités. Ces cellules possèdent plusieurs noyaux répartis de manière homogène le long du sarcolemme, à l'exception de la jonction neuromusculaire, en regard de laquelle s'agrègent des noyaux sous-synaptiques. Une cellule satellite, accolée au sarcolemme, est également représentée. On remarque aussi l'aspect strié caractéristique, et les mitochondries intercalées entre ces stries. Pour plus de lisibilité, le réticulum sarcoplasmique n'a pas été représenté ici.

myofibrilles sont entourées par un réticulum endoplasmique lisse très développé : le réticulum sarcoplasmique, en proche interaction avec un réseau de mitochondries. L'ensemble de ces éléments va permettre à la fibre musculaire de réaliser sa fonction contractile, aussi bien mécaniquement que métaboliquement. Ces deux aspects seront abordés respectivement dans la **partie 1.2** et la **partie 1.3** de cette introduction.

Plaquée entre le sarcolemme et la lame basale entourant chaque fibre musculaire, on distingue une population de cellules mononuclées qui va permettre la synthèse de tissu musculaire lors de la régénération ou l'hyperplasie : les cellules satellites ([Mauro 1961](#)). Certains stimuli externes tels que des stress physico-chimiques ou inflammatoires vont entraîner l'activation et la prolifération de ces cellules, qui vont ensuite fusionner entre elles ou avec des

fibres préexistantes ([Brack 2012](#), **partie 1.4**).

Accompagnant ces cellules satellites, on trouve au sein des muscles squelettiques de nombreuses populations cellulaires résidentes ([Pannérec 2012](#), [Bentzinger 2013](#)). Ce sont notamment des fibroblastes, présents au sein de l'endomysium ou du périomyosium et qui synthétisent des composants essentiels de la matrice extracellulaire ([Kühl 1984](#), [Mathew 2011](#)). En dehors des cellules satellites, il est également possible d'observer des populations cellulaires progénitrices ayant des capacités de différenciation myogénique ([Mitchell 2010](#), [Liadaki 2012](#), [Dellavalle 2007](#)), adipogénique, fibro-adipogénique ([Schulz 2011](#), [Joe 2010](#)) voire même ostéogénique ([Downey 2015](#)). Enfin, des cellules immunitaires infiltrées peuvent également être détectées, notamment des mastocytes et des macrophages ([Pimorady-Esfahani 1997](#), [Gersch 2002](#)). Malgré une majorité de fibres musculaires (75 à 90 % du volume selon les muscles), nous pouvons donc constater l'hétérogénéité et la complexité du muscle strié squelettique au niveau cellulaire. Loin d'être un simple assemblage parallèle de fibres musculaires, on y trouve une variété de cellules interstitielles, qui seront notamment mobilisées en cas de stress ou de dommage musculaire. Plus de détails seront donnés dans la **partie 1.4** de cette introduction.

### 1.1.2. Le muscle strié cardiaque

Chez les mammifères, la mise en mouvement du sang est une fonction involontaire et autonome assurée par le cœur. Pour assurer cette fonction, la pompe cardiaque possède deux activités interdépendantes et mesurables tant au niveau macroscopique qu'au niveau cellulaire :

- une activité électrique : les battements cardiaques sont déclenchés par la genèse d'un courant ionique au sein même du tissu cardiaque et qui est ensuite transmis à l'ensemble du muscle cardiaque ;
- une activité mécanique : en tant que muscle, le cœur est capable de se contracter et de se relâcher de manière continue.

Ces deux activités sont assurées par la nature et l'organisation des tissus composant le muscle cardiaque.

#### a. Organisation histologique du cœur

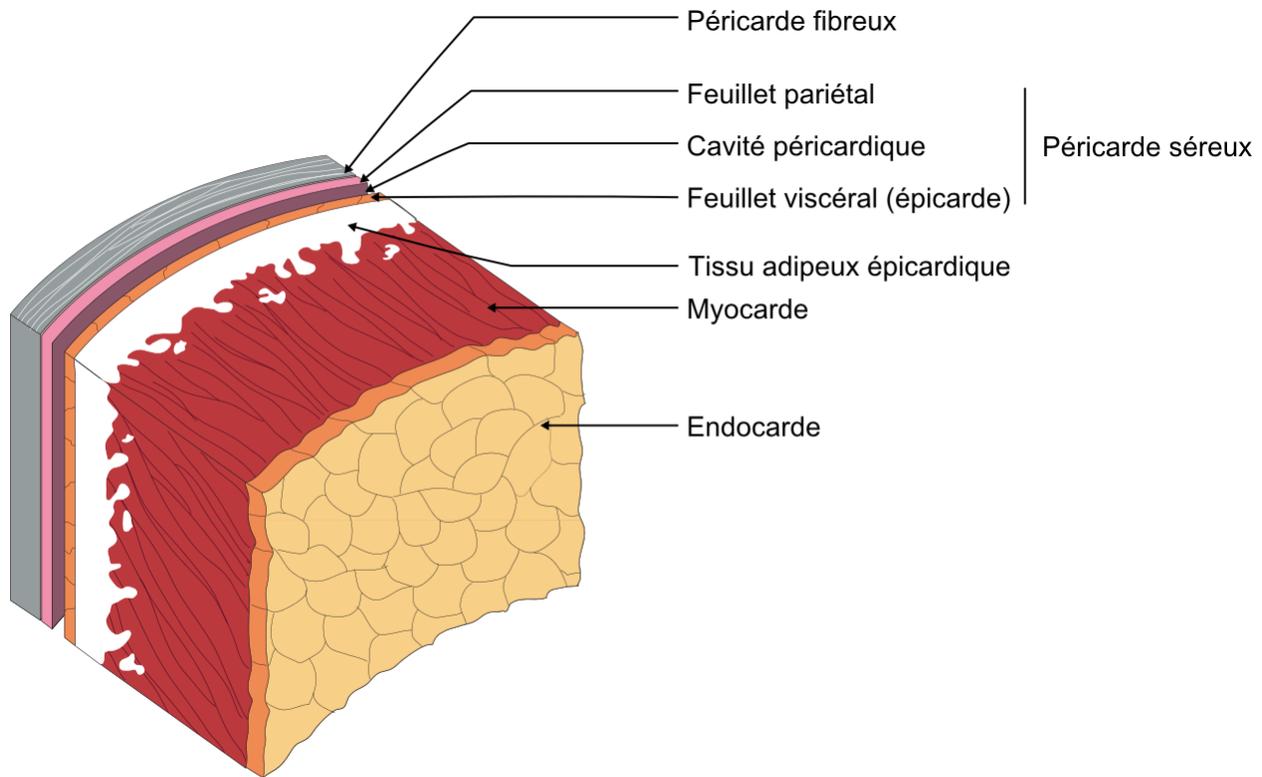
L'organisation spatiale du tissu musculaire cardiaque (le myocarde) a été l'objet de nombreux débats. Plusieurs modèles ont été proposés, parmi lesquels on peut citer une

organisation en « vaisseau sanguin modifié » ([Greenbaum 1981](#)), en une bande continue de forme hélicoïdale complexe parcourant l'ensemble du cœur ([Kocica 2006](#)), ou encore en couches laminaires séparées par des feuillets de tissu conjonctif ([Zhang 2012](#)). Ces différentes hypothèses, soutenues par des résultats obtenus grâce à des techniques différentes chez des espèces différentes, n'ont pas apporté de réponse définitive mais montrent la complexité de l'architecture de cet organe. Une étude récente menée chez la Souris ([Gouda 2015](#)) a démontré que l'orientation des cellules musculaires dépendait de leur position au sein du myocarde (base ou apex, extérieur ou intérieur de la cavité) et de leur interaction avec les tissus non-musculaires du cœur.

Comme dans le cas des muscles squelettiques, on note la présence d'un tissu conjonctif fibreux, essentiellement composé de collagène de type I mais aussi de protéoglycanes et de glycoprotéines ([Rienks 2014](#)). Dans le cas du cœur, cette matrice extracellulaire va jouer un rôle fondamental dans la transmission des forces générées par le myocarde, mais elle est aussi impliquée dans la protection du tissu musculaire contre l'hypoxie ([Csont 2010](#)) ou les processus cicatriciels suite à un stress mécanique ou un infarctus ([Huebener 2008](#), [Herum 2013](#)). Joutant ce tissu conjonctif de part et d'autre du myocarde, on trouve des tissus épithéliaux simples composés de cellules de forme « aplaties » (épithéliums pavimenteux unistratifiés) : l'épicarde, séparant le myocarde du feuillet pariétal du péricarde séreux, et l'endocarde, au contact du sang circulant (**Figure 3**).

## **b. Populations cellulaires du muscle strié cardiaque**

Les cellules musculaires composant le myocarde, appelées cardiomyocytes, présentent une morphologie allongée mais plus courte que les fibres musculaires, et ne comportent après la naissance qu'un ou deux noyaux ([Li 1996](#)). Cette binucléation ne résulte pas d'une fusion de myoblastes lors du développement, mais serait plutôt due à une absence de cytotdiérèse suite à la dernière mitose ([Engel 2006](#)). Les cardiomyocytes sont organisés au sein du myocarde de manière à assurer une continuité structurale et fonctionnelle entre eux. Ceci est permis par les disques intercalaires, contacts directs s'établissant aux extrémités de cellules adjacentes. Plus de 200 protéines sont impliquées dans la fonction de ces disques ([Estigoy 2009](#)), enchâssées au sein des replis membranaires où elles participent à la formation de jonctions cellulaires, notamment des jonctions adhérentes, des desmosomes et des jonctions gap ([Pinali 2015](#)). Nous verrons dans la **partie 1.2** que ces structures permettent notamment le couplage mécanique et électrique entre



**Figure 3 :** Organisation des différentes couches concentriques du cœur. Le péricarde est séparé en deux parties : le péricarde fibreux, tissu conjonctif dense délimitant et protégeant l'organe ; le péricarde séreux, constitué d'un feuillet pariétal et d'un feuillet viscéral (épicaire), entre lesquels circule un fluide lubrifiant dans la cavité péricardique. On note la présence d'un tissu adipeux épicaire s'infiltrant dans le myocarde. À l'intérieur de la cavité cardiaque, le myocarde est séparé du sang circulant par un épithélium squameux unistratifié, l'endocarde. Figure adaptée d'une planche illustrative Servier Medical Art (<http://www.servier.fr/slidekit/?item=106>).

cardiomyocytes adjacents. Le myocarde est donc un pseudo-syncytium fonctionnel. Le cytoplasme des cardiomyocytes présente quant à lui une organisation striée en myofibrilles similaire à celle rencontrée dans les fibres musculaires squelettiques. Enfin, il est important de noter le volume important occupé par les mitochondries, qui peuvent occuper jusqu'à 30% de l'espace intracellulaire (Neary 2014).

Chez l'Homme, même si le volume du myocarde est principalement occupé par du tissu musculaire, la population de cardiomyocytes n'y est pas majoritaire. Selon une étude, ils ne représenteraient même que 20 à 30% des cellules résidentes (Vliegen 1991). Toutefois, cette propriété semble être dépendante de l'espèce, puisqu'une autre étude menée plus récemment chez des souris adultes montre que les myocytes représentent 54% des cellules du myocarde, et

les fibroblastes 27% ([Banerjee 2007](#)). Ici aussi ces fibroblastes sont capables de remodeler et d'interagir avec la matrice extra-cellulaire interstitielle. Dans le contexte du myocarde néanmoins, ils adoptent également des phénotypes originaux et des propriétés physico-chimiques particulières. Au sein de l'endomysium cardiaque, ils peuvent par exemple établir des liaisons avec les cardiomyocytes (notamment des jonctions gap, [Goldsmith 2004](#)) et acquérir des propriétés de conductibilité électrique ([Gaudesius 2003](#)).

Comme dans le cas du muscle strié squelettique, le myocarde comprend aussi des populations de cellules immunitaires résidentes, comme des macrophages ou des mastocytes. Après activation et dégranulation, ces derniers peuvent notamment libérer des médiateurs fibrotiques et inflammatoires, et jouer un rôle dans le remodelage du tissu cardiaque ([Frangogiannis 1998](#), [Aldi 2014](#)).

Ainsi, le myocarde peut également être considéré comme un assemblage complexe de multiples populations cellulaires architecturées de manière précise et en interaction les unes avec les autres. En cas de déséquilibre pathologique, ces interactions sont modifiées et aboutissent à un remodelage du tissu cardiaque, qui s'exprime souvent par une hypertrophie et une fibrose (**partie 1.4**).

### 1.1.3. Les muscles lisses

Comme nous le verrons dans la **partie 2**, une grande majorité des travaux fondamentaux publiés dans le cadre de la DMD sont focalisés sur le système musculaire strié squelettique et cardiaque. Même si les muscles lisses présentent eux aussi probablement certaines dysfonctions chez les patients ([Barohn 1988](#)), l'atteinte est souvent secondaire, voire consécutive à certaines interventions chirurgicales ([Boland 1996](#)). Le but de ce paragraphe, qui se veut volontairement plus court que les deux précédents, est donc de préciser certains éléments d'anatomie et de physiologie concernant le tissu musculaire lisse, dans un souci d'exhaustivité. Par la suite, nous nous focaliserons principalement sur le tissu musculaire strié (squelettique ou cardiaque).

#### a. Un tissu étendu et multifonctionnel

Anatomiquement, le tissu musculaire lisse est présent au sein de multiples systèmes, principalement au niveau des parois des organes creux :

- le système cardio-vasculaire : dans la *tunica media* des vaisseaux sanguins, les cellules musculaires lisses permettent la vasoconstriction et la vasodilatation, régulant ainsi l'irrigation des tissus ;
- le système digestif : au sein de la paroi stomacale et intestinale, les muscles lisses permettent respectivement le brassage et le transit du bol alimentaire par péristaltisme ;
- le système respiratoire : dans la paroi des bronchioles, il permet la modulation du volume d'air entrant dans les alvéoles pulmonaires ;
- le système urinaire : les muscles lisses des uretères permettent ici le transport de l'urine depuis les reins jusqu'à la vessie ;
- le système génital féminin : le tissu musculaire lisse de l'utérus est notamment mobilisé lors de l'accouchement.

Des cellules musculaires lisses sont également présentes dans l'iris où elles modulent le diamètre de la pupille, ainsi que dans les muscles arrecteurs des poils. De manière générale, les muscles lisses sont des organes à contraction involontaire, lente et longue, ce qui assure le tonus continu des structures associées.

#### **b. Quelques caractéristiques des cellules musculaires lisses**

La morphologie des cellules musculaires lisses diffère fortement de celle des fibres musculaires et des cardiomyocytes. En forme de fuseaux allongés, elles sont mononucléées et leur réticulum sarcoplasmique est peu développé. Leur apparence au microscope ne laisse pas apparaître de stries transverses ou longitudinales, ce qui sous-tend des mécanismes contractiles spécifiques. Les cellules musculaires lisses se distinguent par leur plasticité phénotypique. Au cours du développement, ou en réponse à des stimuli environnementaux, elles peuvent transiter par plusieurs états cytologiques ([Alexander 2012](#)) :

- un phénotype contractile : l'état différencié est caractérisé par l'acquisition de propriétés contractiles, qui permettent aux cellules d'assurer les fonctions listées ci-dessus ;
- un phénotype prolifératif : les cellules musculaires lisses peuvent se différencier et proliférer ; ceci les distingue des fibres musculaires squelettiques et des cardiomyocytes ;
- un phénotype productif et sécrétoire : enfin, elles peuvent synthétiser certains composants de la matrice extracellulaire.

Cette plasticité contraste nettement avec les fibres musculaires et les cardiomyocytes, totalement différenciés.

## 1.2. La contraction des muscles striés

Les fonctions des muscles striés ne peuvent être accomplies que grâce aux propriétés d'excitabilité et de contractilité des cellules les composant. Cette partie vise à expliquer la conversion énergétique se produisant lors du couplage excitation / contraction.

### 1.2.1. Organisation des myofibrilles et glissement des myofilaments

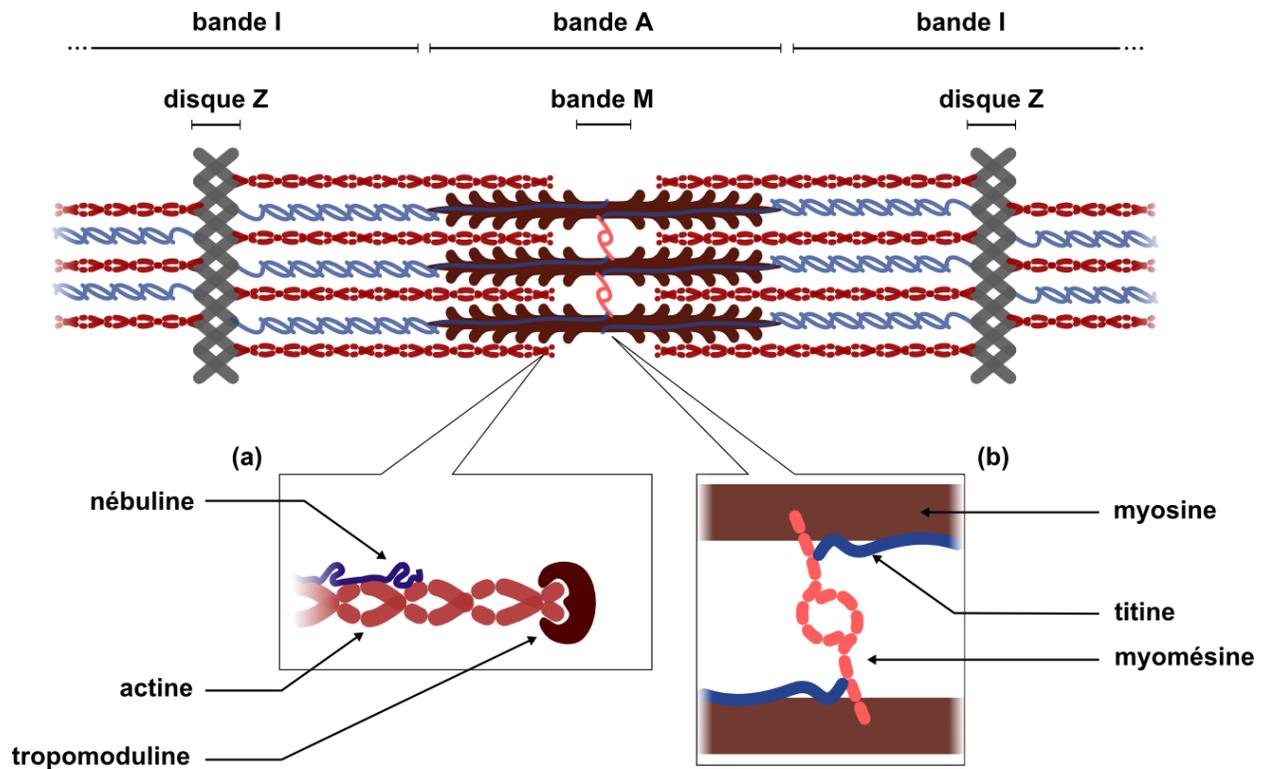
Les premières observations microscopiques des cellules musculaires striées ont décrit la présence de myofibrilles organisées en une succession de bandes répétées plus ou moins réfringentes. Depuis les travaux de Hugh Huxley et Jean Hanson dans les années 1950 ([Hanson & Huxley 1953](#)), la composition de ces différentes bandes et leur architecture a fait l'objet de très nombreuses études et a abouti au modèle de contraction musculaire par glissement des filaments (**Figure 4**). Largement plébiscité de nos jours, ce modèle laisse néanmoins entrevoir certaines zones d'ombres que les méthodes d'analyse modernes mettent peu à peu en évidence.

#### a. Les protéines contractiles - les myofilaments

L'interaction entre les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine permet la conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique. L'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP) par la myosine fournit l'énergie nécessaire au changement de conformation de ces protéines. Telles des leviers, les molécules de myosines transmettent leur mouvement aux filaments d'actine, ce qui entraîne le glissement relatif des myofilaments, aboutissant à une réduction de la longueur des sarcomères ([Rayment 1993](#)).

#### b. Les protéines structurales - le squelette du sarcomère

Les protéines constituant les bandes M et les disques Z, et celles faisant le lien entre ces deux structures n'étaient au départ considérées que comme une armature du sarcomère, permettant l'ancrage des myofilaments et régulant leur longueur. Mais des études récentes ont permis de définir un rôle plus actif pour ces différents composants. Plus qu'un simple squelette d' $\alpha$ -actinine, les disques Z sont composés de dizaines de protéines aux fonctions variées, parmi lesquelles la protéine MLP (*muscle LIM protein*) qui intègre les stress mécaniques ([Knöll 2002](#), [Boateng 2009](#)). On trouve également un complexe protéique complexe au niveau des bandes M,



**Figure 4** : Organisation simplifiée d'un sarcomère en deux dimensions. L'axe longitudinal de la fibre musculaire court horizontalement. Un sarcomère s'étend entre deux disques Z, comprenant donc deux demi-bandes I et une bande A, au centre de laquelle on trouve la bande M. (a) Détail de l'extrémité d'un myofilament fin d'actine. La nébuline parcourt le filament mais n'atteint pas nécessairement son extrémité. Pour plus de lisibilité, tropomyosine et troponine n'ont pas été représentées bien qu'elles soient également présentes sur toute sa longueur. (b) Détail de l'organisation de la bande M, où myosine, titine et myoméline interagissent et permettent le relâchement et l'élasticité du sarcomère.

parmi lesquelles la myoméline qui permet le maintien de l'alignement des myofilaments épais ainsi que la résistance à l'étirement pouvant résulter d'un déséquilibre de forces entre molécules de myosine adjacentes ([Schoenauer 2005](#), [Berkemeier 2011](#)). La titine est une protéine multifonctionnelle s'étendant des disques Z aux bandes M, le long des filaments épais. Elle confère notamment ses propriétés viscoélastiques au sarcomère et est considérée comme un véritable « ressort moléculaire » ([Li 2002](#)). Mais elle sert aussi de plate-forme pour de nombreux ligands, l'impliquant potentiellement dans de multiples autres fonctions, notamment l'expression génique ([Lange 2005](#)), la mécano-transduction ([Sheikh 2008](#)) ou encore le *turn-over* protéique ([Taveau 2003](#)). Enfin, la nébuline, qui court le long des filaments d'actine, permettrait leur stabilisation, mais le modèle selon lequel elle régulerait strictement leur longueur a été remis en

question par des études récentes ([Castillo 2009](#), [Pappas 2010](#)).

### **c. Les protéines régulatrices**

En association avec les filaments d'actine, on trouve un ensemble de protéines régulant le glissement des myofilaments. La tropomyosine et la troponine s'assemblent et parcourent le filament fin sur toute sa longueur ([Barua 2012](#)). En présence d'ions  $Ca^{2+}$ , la troponine change de conformation et entraîne une rotation azimutale de la tropomyosine, permettant l'interaction actine - myosine ([Lehman 2001](#)). Enfin, la tropomoduline se fixe à l'extrémité des filaments d'actine et contrôle leur stabilité et leur longueur ([Gokhin 2010](#)). Mais une étude récente a montré qu'elle assurait également l'optimisation des jonctions actine - myosine ([Ochala 2014](#)).

Le sarcomère est donc un ensemble dynamique, dont la fonction va bien au-delà de la simple conversion énergétique. A la lumière des études menées ces dernières années, il apparaît comme une plate-forme de détection des stress mécaniques que subissent les cellules musculaires, et un centre de signalisation en réponse à ces stress.

## **1.2.2. Transmission de la force générée à l'ensemble de l'organe**

Pour que le raccourcissement des sarcomères permette à l'ensemble du muscle de se contracter, un lien continu doit exister entre ces structures et la matrice extracellulaire. Afin d'obtenir une contraction optimale, les forces générées par les sarcomères doivent être transmises selon deux axes : longitudinal et latéral.

### **a. Transmission longitudinale des forces**

Dans les muscles squelettiques reliés aux os, les fibres musculaires aboutissent longitudinalement à la jonction myotendineuse, laquelle finit par s'insérer sur l'os. Au niveau de cette jonction, le sarcolemme forme de profondes invaginations et le dernier sarcomère de chaque myofibrille s'insère au niveau d'un disque Z terminal relié à la membrane ([Tidball 1991](#)). Une analyse du protéome des jonctions myotendineuses après microdissection laser a identifié de nombreuses protéines également retrouvées au sein des disques Z ([Can 2014](#)). À ce niveau, ces protéines interagissent avec des jonctions intercellulaires, notamment des desmosomes, auxquels sont probablement liés les myofilaments d'actine.

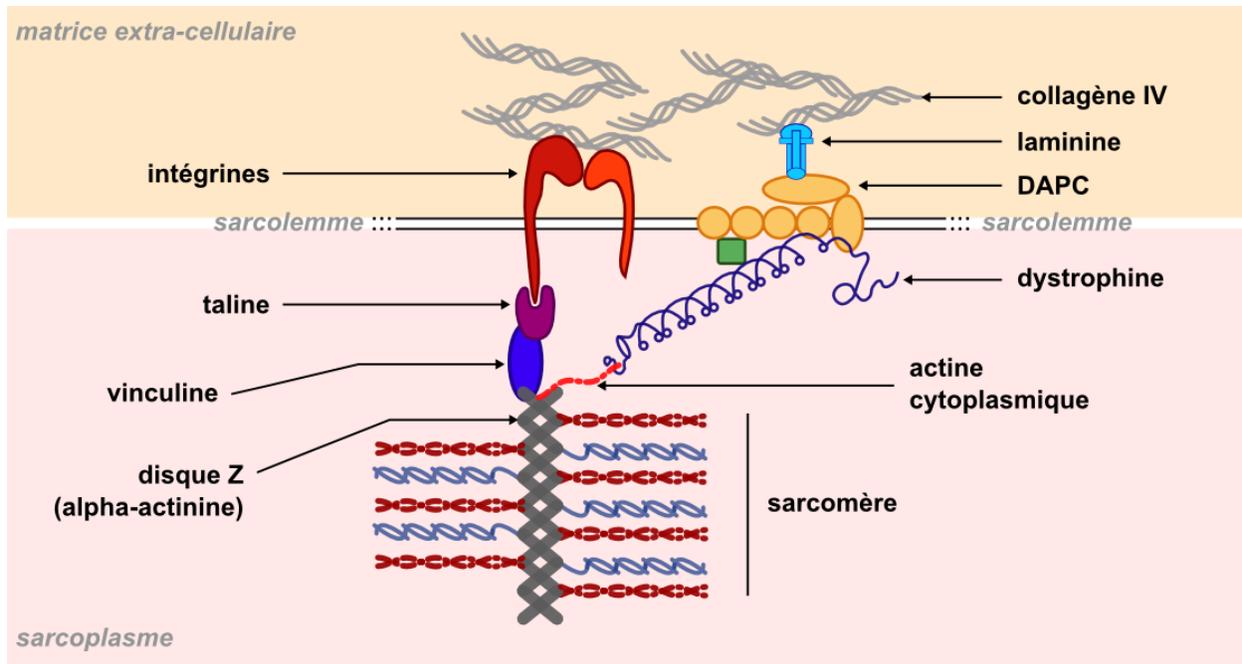
Au niveau du myocarde, les cardiomyocytes forment un réseau de cellules connectées par

l'intermédiaire des disques intercalaires. À ces endroits, les sarcoplasmes de deux cardiomyocytes adjacents sont très rapprochés et forment de profondes interdigitations, augmentant ainsi leur surface de contact ([Pinali 2015](#)). Ces domaines membranaires sont riches en spectrine, et constitués de jonctions hybrides entre jonctions adhérentes et desmosomes (*area composita*, [Borrmann 2006](#), [Sato 2011](#)). Les filaments d'actine des sarcomères terminaux sont reliés aux disques intercalaires par l'intermédiaire de jonctions de transition ([Bennett 2006](#)), ce qui assure une continuité mécanique intercellulaire.

### **b. Transmission latérale des forces par les costamères**

Que ce soit au niveau du myocarde, qui se contracte dans les 3 dimensions de l'espace, ou des muscles squelettiques, dont les longues fibres impriment leurs déformations à l'endomysium, la transmission latérale des forces est essentielle pour obtenir une contraction optimale. Elle nécessite l'établissement d'un lien transmembranaire entre les sarcomères et les composants de la matrice extracellulaire endomysiale. Ce lien prend la forme de complexes spécialisés nommés costamères ([Danowski 1992](#), [Ervasti 2003](#)). C'est au niveau de ces structures que peuvent être observés les complexes de glycoprotéines associées à la dystrophine (*dystrophin glycoprotein complex* (DGC)). La dystrophine fera à elle seule l'objet de la **partie 2** de cette introduction, mais un premier aperçu de cette protéine et de ses partenaires est donné en **Figure 5**. Son extrémité N-terminale est directement reliée à l'actine cytoplasmique elle-même connectée aux disques Z, tandis qu'en C-terminal elle se lie à un complexe protéique transmembranaire lui-même rattaché à la matrice extracellulaire, le *dystrophin-associated protein complex* (DAPC). Ce lien protéique permet la transmission latérale des forces générées par les fibres musculaires jusqu'à l'endomysium ([Ramaswamy 2011](#)). Nous constaterons dans la **partie 2** que l'absence de dystrophine pourrait justement entraîner l'inefficacité des muscles à transmettre cette force.

Au sein des costamères se forment aussi des adhésions focales particulières permettant de relier l'actine cytoplasmique avec les intégrines membranaires, notamment grâce à la vinculine et la taline. Enfin, la formation des costamères implique également des protéines appartenant aux filaments intermédiaires musculaires, comme par exemple la desmine qui interagit avec le DAPC via la syncoiline ([Poon 2002](#)).



**Figure 5** : Organisation simplifiée d'un costamère au niveau d'un disque Z. L'axe longitudinal de la fibre musculaire s'étend horizontalement, et la matrice extra-cellulaire de la lame basale est simplifiée par des triples hélices de collagène IV et des glycoprotéines de type laminine. À droite, la dystrophine et le DAPC relient l'actine sarcoplasmique à la laminine. À gauche, le complexe  $\alpha$ -actinine / vinculine / taline relie les sarcomères aux intégrines transmembranaires.

### 1.2.3. Couplage Excitation / Contraction des muscles striés

Comme nous l'avons noté dans la **partie 1.2.1.c**, le glissement relatif des myofilaments implique le changement de conformation de la troponine (dépendant des ions  $\text{Ca}^{2+}$ ), puis celui de la myosine, dépendant de l'ATP. La formation d'ATP par les voies métaboliques classiques sera abordée dans la **partie 1.3** de cette introduction. Ce paragraphe vise à décrire les mouvements des ions  $\text{Ca}^{2+}$  régulant les cycles de contraction - relâchement des myofilaments.

#### a. Flux de calcium durant la contraction musculaire

Le sarcolemme des cellules musculaires striées forme de profondes invaginations transversales au niveau des disques Z (cardiomyocytes) ou à la frontière entre les bandes A et I (fibres musculaires) : les tubules transverses. Ces structures établissent des contacts rapprochés avec le réticulum sarcoplasmique, formant un réseau tridimensionnel complexe autour des myofibrilles ([Savio-Galimberti 2008](#), [Hayashi 2009](#)). Cette association permet l'interaction entre

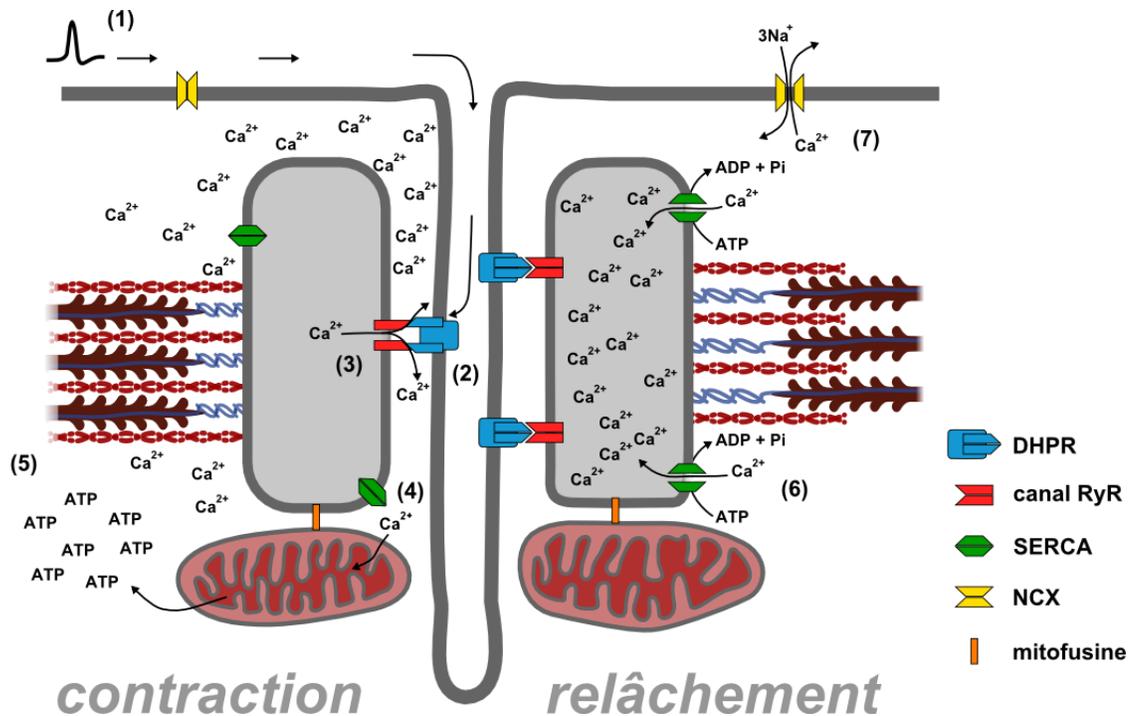
deux protéines : le récepteur à la dihydropyridine (DHPR) et le récepteur à la ryanodine (RyR) ([Franzini-Armstrong 1999](#), [Scriven 2000](#)). Sous l'influence d'un potentiel d'action, cette interaction permet la libération d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  depuis la lumière du réticulum sarcoplasmique jusqu'au sarcoplasme ([Fleischer 1985](#)). Ces ions diffusent ensuite au sein des myofibrilles et activent la troponine. La relaxation musculaire est liée à la diminution de la concentration des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans le sarcoplasme ([Inesi 1995](#), [Crespo 1990](#)). Le détail des flux calciques et des acteurs protéiques impliqués est schématisé sur la **Figure 6**.

## b. Déclenchement de la contraction musculaire

Pour ce paragraphe, il convient de séparer les muscles squelettiques du myocarde, car ce phénomène s'y déroule de manière spécifique, compte-tenu des différences fonctionnelles entre ces deux tissus : les muscles squelettiques se contractent après une stimulation nerveuse, tandis que le myocarde est le siège d'une activité électrique imprimant des cycles de contraction périodiques et continus :

- chacune des fibres musculaires squelettiques est en contact avec l'une des extrémités d'un neurone moteur, formant ainsi une jonction neuromusculaire (**Figure 2**). En regard de la terminaison nerveuse, le sarcoplasme s'invagine et forme une plaque motrice, sous laquelle on observe une agrégation particulière de noyaux musculaires (les noyaux sous-synaptiques) dont l'aspect et la structure interne diffèrent des autres noyaux ([Ravel-Chapuis 2007](#)). Certaines études ont mis en évidence les spécificités de ces noyaux notamment sur le plan épigénétique, et leur capacité à exprimer spécifiquement les gènes du récepteur à l'acétylcholine (AChR) ([Simon 1992](#)). L'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur libéré dans la fente synaptique depuis la terminaison nerveuse, et qui se fixe aux récepteurs AChR enchassés dans le sarcolemme au niveau de la plaque motrice ([Frank & Fischbach 1979](#)). Sur les fibres musculaires squelettiques, les AChR sont des canaux sodiques. La fixation de l'ACh sur ces récepteurs conduit à une dépolarisation cellulaire. Si suffisamment de molécules d'ACh sont fixées, la dépolarisation génère un potentiel d'action musculaire, qui se propage à l'ensemble du système membranaire, y compris les tubules transverses où il active le complexe DHPR - RyR.

- Même si le myocarde est lui aussi connecté au système nerveux, il demeure capable de se



**Figure 6 :** Mécanisme moléculaire du déclenchement de la contraction et du relâchement d'une fibre musculaire squelettique. (1) Propagation du potentiel d'action musculaire par mouvements d'ions le long du sarcolemme. (2) Activation et changement de conformation des récepteurs DHPR dépendants du voltage au niveau des tubules transverses. (3) Activation et ouverture des canaux RyR : sortie d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  des citernes du réticulum sarcoplasmique vers le sarcoplasme. (4) Entrée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries : augmentation de la synthèse d'ATP. (5) Glissement relatif des myofilaments grâce à l'action combinée des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et de l'ATP. (6) Lors du relâchement musculaire, l'activation des pompes *Sarco/endoplasmic reticulum*  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) permet le repompage des ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les citernes du réticulum sarcoplasmique. (7) Activation des canaux échangeurs  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  (NCX). Dans les cardiomyocytes, le mécanisme est globalement similaire à l'exception de l'étape (2), où le récepteur DHPR est lui-même un importeur calcique voltage-dépendant. Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  qu'il laisse entrer activent ensuite eux-même l'ouverture des canaux RyR (mécanisme dit de *calcium-induced calcium release*).

contracter de manière autonome. Ceci est dû à la présence de myocytes particuliers appelés cellules nodales générant un potentiel d'action de manière automatique ([Boyett & Dobrzynski 2007](#)). Anatomiquement, on trouve ces cellules au niveau du nœud sino-auriculaire dans l'oreillette droite, où elles expriment des canaux ioniques particuliers permettant la formation d'un potentiel entraîneur auto-dépolarisant ([Herrmann 2011](#)). Le potentiel entraîneur se propage dans les oreillettes, puis jusqu'aux ventricules *via* le faisceau de His et les fibres de Purkinje, où il provoque la contraction de l'ensemble du myocarde. Ceci s'effectue par des mécanismes

globalement similaires à ceux observés dans les muscles squelettiques, à base de mouvements d'ions transmembranaires et de flux calciques d'un compartiment cellulaire à l'autre. Cependant dans le cas du myocarde, les flux ioniques doivent pouvoir se transmettre rapidement d'un cardiomyocyte à l'autre afin que la contraction de l'ensemble du tissu soit coordonnée. Au sein du tissu nodal, mais aussi du myocarde, la propagation des potentiels d'action d'une cellule à l'autre, fait appel aux jonctions gap ([Beauchamp 2004](#)). Celles-ci connectent les cytoplasmes de cardiomyocytes adjacents grâce à des protéines de type connexines, notamment Cx43 au niveau des disques intercalaires ([Gourdie 1991](#)). Elles y interagissent avec de nombreuses protéines des jonctions adhérentes ([Zemljic-Harpf 2014](#)), des desmosomes ([Sato 2011](#)) et également avec des canaux sodiques voltage-dépendants ([Westenbroek 2013](#)).

Au sein des cellules musculaires striées, la conversion de l'énergie chimique en énergie mécanique est donc un processus faisant intervenir des flux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  entre le milieu extracellulaire, le sarcoplasme et les citernes du réticulum sarcoplasmique. L'énergie mécanique produite par les myofilaments épais permet le raccourcissement des sarcomères, et donc la déformation de l'ensemble de la cellule musculaire striée. Des structures protéiques fondamentales permettent de transmettre cette tension jusqu'à la matrice extracellulaire dans toutes les dimensions de l'espace, optimisant le raccourcissement à l'échelle de l'organe. Nous verrons que la désorganisation d'une de ces structures, le DAPC, consécutif à l'absence de dystrophine, aura de graves conséquences sur la physiologie musculaire dans son ensemble, ce qui souligne leur importance fonctionnelle.

### 1.3. Aspects métaboliques du travail musculaire

Les muscles ne fournissent pas tous le même travail. Un muscle impliqué dans le mouvement rapide d'un membre doit pouvoir se contracter de manière phasique, c'est à dire rapidement mais pendant une courte durée (exemple : le muscle extenseur des doigts *extensor digitorum longus*, EDL). À l'inverse, un muscle impliqué dans le maintien de la posture se contracte plutôt de manière tonique, c'est-à-dire plus lentement mais pendant une durée plus longue (exemple : le muscle soléaire, *soleus*, SOL). Enfin, le muscle cardiaque se contracte quant

à lui de manière périodique et en cycles continus. Ces différences fonctionnelles sont associées à l'utilisation de voies métaboliques spécifiques.

### 1.3.1. Les voies métaboliques des cellules musculaires striées

La capacité d'une cellule musculaire à fournir un certain type de travail pendant un certain temps dépend directement des voies métaboliques lui permettant de générer l'ATP nécessaire au glissement relatif des myofilaments. Au sein des muscles squelettiques, on distingue ainsi les fibres lentes (de type I, ou oxydatives) des fibres rapides (de type II, ou glycolytiques), représentées en proportions différentes selon les muscles ([Johnson 1973](#)). Cette dénomination reflète littéralement la rapidité avec laquelle les fibres se contractent après stimulation ([Buchthal 1970](#)), et moléculairement, celle avec laquelle les différents isoformes de myosine exercent leur activité ATPase ([Bottinelli 1994](#)). Sur le plan métabolique, un muscle riche en fibres rapides consommera donc une quantité importante d'ATP en un délai court, alors qu'un muscle riche en fibres lentes aura une consommation plus modérée mais sur un délai beaucoup plus long. Le **Tableau 1** liste les différences métaboliques entre ces deux types de fibres : alors que les fibres rapides utilisent principalement la glycolyse, l'ATP des fibres lentes provient majoritairement du catabolisme oxydatif mitochondrial. De par leur activité contractile continue, le métabolisme des cardiomyocytes se rapproche de celui des fibres lentes, avec une surface mitochondriale encore plus importante ([Neary 2014](#)) et l'utilisation d'un substrat principalement lipidique ([Goldberg 2012](#)).

Ces différences sur le plan métabolique s'accompagnent de différences structurales, notamment au niveau du réticulum sarcoplasmique qui occupe un volume moins important dans les fibres lentes du muscle SOL murin par rapport à celles de l'EDL ([Luff & Atwood 1971](#)). De plus, la densité de canaux calciques RyR couplés aux récepteurs DHPR est également plus faible dans les fibres lentes ([Delbono & Meissner 1996](#)). S'ensuivent des flux calciques plus rapides et d'amplitude plus importante dans les fibres rapides ([Baylor 2012](#)).

**Tableau 1 : Comparaison des caractéristiques métaboliques des fibres musculaires lentes et rapides.**

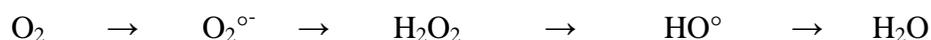
phénotypes métaboliques	fibres lentes (type I)	fibres rapides (type II)	références
voie métabolique principale	Catabolisme oxydatif	Glycolyse	
consommation d'ATP en contraction	-	+	<a href="#">Stienen 1996</a>
<b>glycogénolyse et glycolyse</b>			
quantité de glycogène	-	+	<a href="#">Greenhaff 1993</a>
glycogénolyse	-	+	<a href="#">Greenhaff 1993</a>
activité enzymes glycolyse	-	+	<a href="#">Spamer 1977</a>
<b>irrigation</b>			
densité des capillaires sanguins	+	-	<a href="#">Dawson 1987</a>
quantité de myoglobine	+	-	<a href="#">Jansson 1983</a>
<b>catabolisme oxydatif</b>			
surface mitochondriale	+	-	<a href="#">Schwerzmann 1989</a>
consommation O <sub>2</sub>	+	-	<a href="#">Kushmerick 1992</a>
activité enzymes cycle de Krebs	+	-	<a href="#">Spamer 1977</a>
activité chaîne transport électrons	+	-	<a href="#">Jackman 1996</a>
<b>métabolisme lipidique</b>			
expression lipases	+	-	<a href="#">Hamilton 1998</a>
captation acides gras	+	-	<a href="#">Bonen 1998</a>
goutelettes lipidiques	+	-	<a href="#">Howald 1985</a>

### 1.3.2. Couplage entre le réticulum sarcoplasmique et les mitochondries

Les mitochondries des muscles striés peuvent être trouvées principalement à deux endroits : en position sous-sarcolemmale et dans l'espace étroit situé entre les myofibrilles, à proximité des tubules transverses et des citernes du réticulum sarcoplasmique ([Hayashi 2009](#)). À ce niveau, ces deux organites sont couplés structurellement, grâce à des protéines de type mitofusine, habituellement impliquée dans les processus de fusion mitochondriale (**Figure 6**, [de Brito & Scorrano 2008](#), [Chen 2012](#)). Grâce à cette proximité, les ions Ca<sup>2+</sup> libérés par les canaux RyR après passage d'un potentiel d'action musculaire pénètrent rapidement dans la matrice mitochondriale ([Szalai 1999](#)), et y sur-activent des déshydrogénases sensibles aux ions Ca<sup>2+</sup>, qui participent au cycle de Krebs ([Hansford 1989](#)). Les ions Ca<sup>2+</sup> sont également capables de réguler l'activité de l'ATPase F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> à l'extrémité de la chaîne respiratoire mitochondriale ([Territo 2000](#)). Ces actions coordonnées aboutissent à l'augmentation de l'activité respiratoire des

mitochondries et de la synthèse d'ATP. Ainsi, les muscles striés peuvent répondre efficacement à l'arrivée d'un potentiel d'action, et à la demande énergétique que le glissement des myofilaments requiert en réponse.

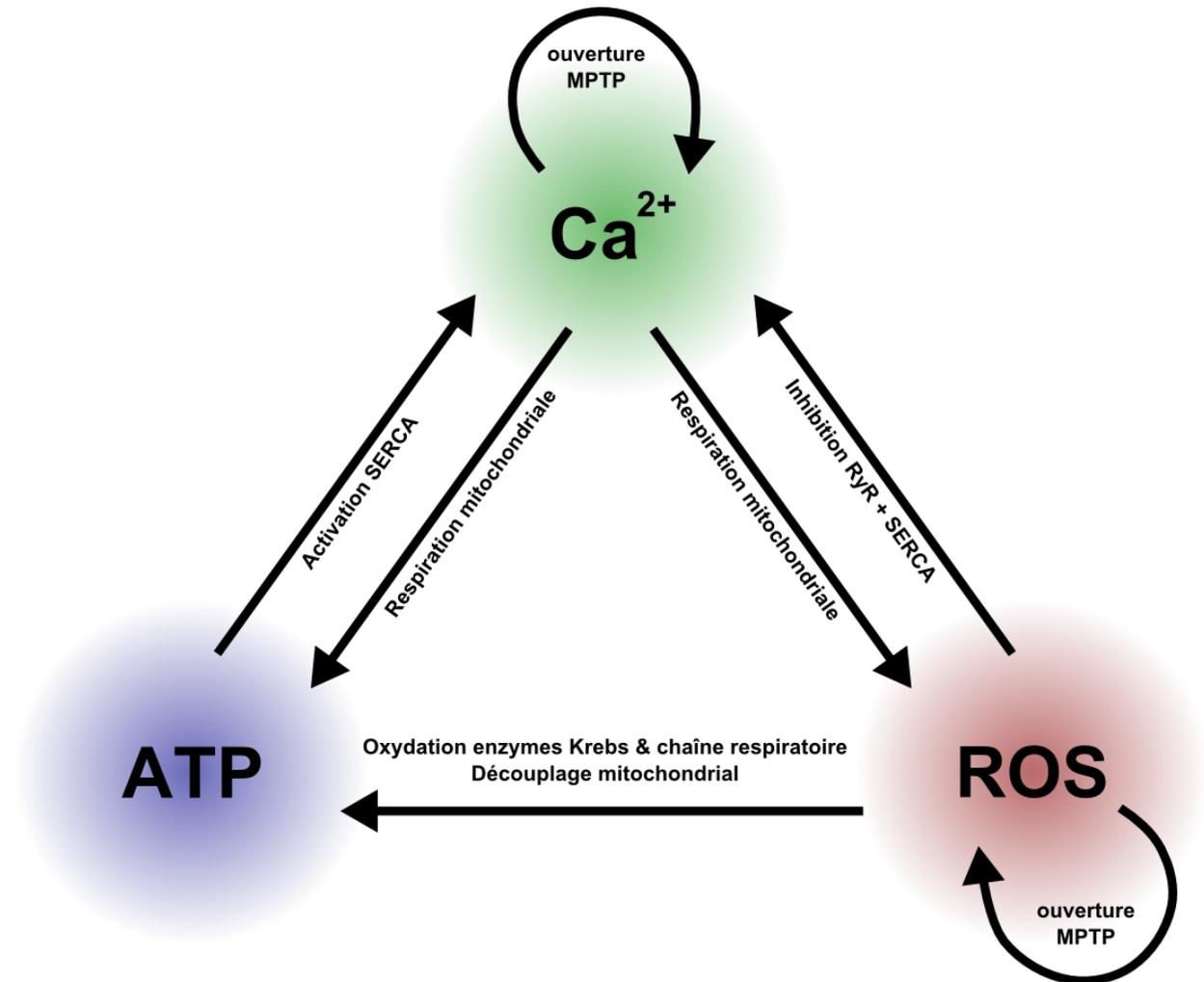
Cette augmentation de l'activité respiratoire induite par les ions  $\text{Ca}^{2+}$  a d'autres effets que la seule synthèse d'ATP. En effet, le transport d'électrons au sein du complexe membranaire générant la force proton-motrice s'accompagne de la synthèse de radicaux libres oxygénés (*reactive oxygen species*, ROS). L'enchaînement des réactions qui s'y produit peut être schématisé de la sorte :



Plus l'activité respiratoire est importante, plus la production des radicaux superoxydes ( $\text{O}_2^{\circ-}$ ), hydroxyles ( $\text{HO}^{\circ}$ ) ou du peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) est élevée. Cependant, les mitochondries ne sont pas les seules responsables de la formation des ROS au sein des fibres musculaires. Des enzymes cytosoliques telles que la NADPH oxydase (NOX) ([Piao 2005](#)) ou la phospholipase A2 ([Gong 2006](#)) peuvent également y participer. Générés en faible quantité, ces ROS participent, et sont même indispensables, au fonctionnement cellulaire ([Piao 2005](#), [Gong 2006](#)). Tout comme les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , ils sont capables au sein même des mitochondries d'activer l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (MPTP) ([Zorov 2000](#)). En conditions physiologiques, le MPTP s'ouvre de manière transitoire et contrôlée ([Ichas 1997](#), [Petronilli 1999](#)), libérant localement des ions  $\text{Ca}^{2+}$  et des radicaux superoxydes ([Wang 2008](#)). En revanche, lors d'une surproduction de ROS ou lorsque la matrice mitochondriale est surchargée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ , l'ouverture du MPTP est plus durable et est généralement un signal déclencheur de la mort cellulaire par nécrose ([Nakagawa 2005](#)). Les cellules musculaires possèdent des mécanismes physiologiques permettant de neutraliser ces ROS lors d'un stress oxydatif, grâce notamment à la superoxyde dismutase (SOD), la catalase ou bien des protéines de la famille *Heat Shock Protein* (HSP) ([McArdle 2001](#)).

Il est donc certain qu'un dialogue moléculaire est en place dans les cellules musculaires entre la respiration mitochondriale, les flux calciques et la genèse de ROS (**Figure 7**). En conditions physiologiques, ce système est dans un état homéostatique, où toute modification transitoire de l'un des facteurs est immédiatement compensée par les autres. En revanche, une

dérégulation prolongée peut rapidement s'auto-amplifier et mener à des dysfonctions mitochondriales et à la mort cellulaire. Nous verrons dans la **partie 2** comment ce système évolue dans le cas de la DMD.



**Figure 7 :** Dialogue moléculaire entre les ions  $Ca^{2+}$ , les ROS et l'ATP dans les cellules musculaires. Les ions  $Ca^{2+}$  pénétrant dans les mitochondries stimulent leur activité respiratoire, qui s'accompagne inévitablement de la production de ROS. Lorsqu'ils sont présents en trop forte quantité, les ions  $Ca^{2+}$  et les ROS entraînent l'ouverture du pore de transition de perméabilité (MPTP). De plus, les ROS peuvent entraîner l'inhibition des canaux RyR, des pompes SERCA et des complexes de la chaîne respiratoire. L'ATP produit par l'activité respiratoire contrôle quant à lui l'activation des pompes SERCA. Figure inspirée de [Brookes 2004](#).

## 1.4. Réponse du système musculaire strié aux dommages

Chez l'adulte, les muscles striés sont considérés comme des organes quiescents. Suite à leur développement embryonnaire à partir du mésoderme paraxial somitique (muscles squelettiques) ou du mésoderme latéral (myocarde), les cellules musculaires striées se différencient et sortent du cycle cellulaire. Si les fibres musculaires squelettiques montrent un potentiel régénératif important après la naissance, c'est grâce à la présence de cellules progénitrices résidentes qui répondent de manière efficace aux dommages subis par le tissu. En revanche, malgré la découverte de cellules souches cardiaques, le cœur ne possède qu'une capacité de régénération limitée. Les réponses de ces deux tissus face à un dommage ou un stress physico-chimique semblent donc être spécifiques, et elles seront abordées séparément.

### 1.4.1. Régénération du muscle squelettique

#### a. Le potentiel régénératif des cellules satellites

Décrites dès leur découverte comme des cellules potentiellement impliquées dans des processus de régénération musculaire ([Mauro 1961](#)), les cellules satellites et leur fonctionnement ont vite attiré l'attention de nombreuses équipes et fait l'objet de nombreux travaux. La preuve formelle de leur capacité à répondre à un dommage musculaire en proliférant, se différenciant et s'auto-renouvelant n'a néanmoins été apportée que récemment ([Sacco 2008](#)). Elles peuvent depuis lors être considérées comme de véritables cellules souches adultes nécessaires à la régénération musculaire ([Lepper 2011](#), [Sambasivan 2011](#)) (**Figure 8a, b**). Localisées entre la lame basale et le sarcolemme, ces cellules demeurent dans un état quiescent en l'absence de dommage. Cet état est maintenu par la modulation de différentes voies de signalisation, notamment les voies Notch ([Mourikis 2012](#)), *Wingless homolog / integration1* (Wnt) ([Otto 2008](#)), *p38/mitogen-activated protein kinase* (MAPK) ([Liu 2010](#)), et phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / Akt / *mammalian target of rapamycin* (mTOR) ([Majmundar 2012](#)) (**Figure 8c**).

Suite à un dommage, les fibres musculaires libèrent un ensemble de facteurs de croissance et de médiateurs immunitaires. En réponse à ces molécules, les cellules satellites sortent de leur quiescence et entrent en prolifération ([Yablonka-Reuveni 1999](#), [Chen 2007](#)). Le processus myogénique qui s'ensuit, aboutissant à la fusion et la différenciation des cellules

satellites, fait lui aussi appel à l'activation de voies de signalisation spécifiques ([Tureckova 2001](#), [Jones 2005](#), [Brack 2008](#), [Friedrichs 2011](#)). Ceci permet l'expression de différents régulateurs transcriptionnels myogéniques : *myogenic differentiation* (MyoD), *myogenic factor 5* (Myf5), *myogenic regulatory factor 4* (MRF4) et la myogénine (**Figure 8d**).

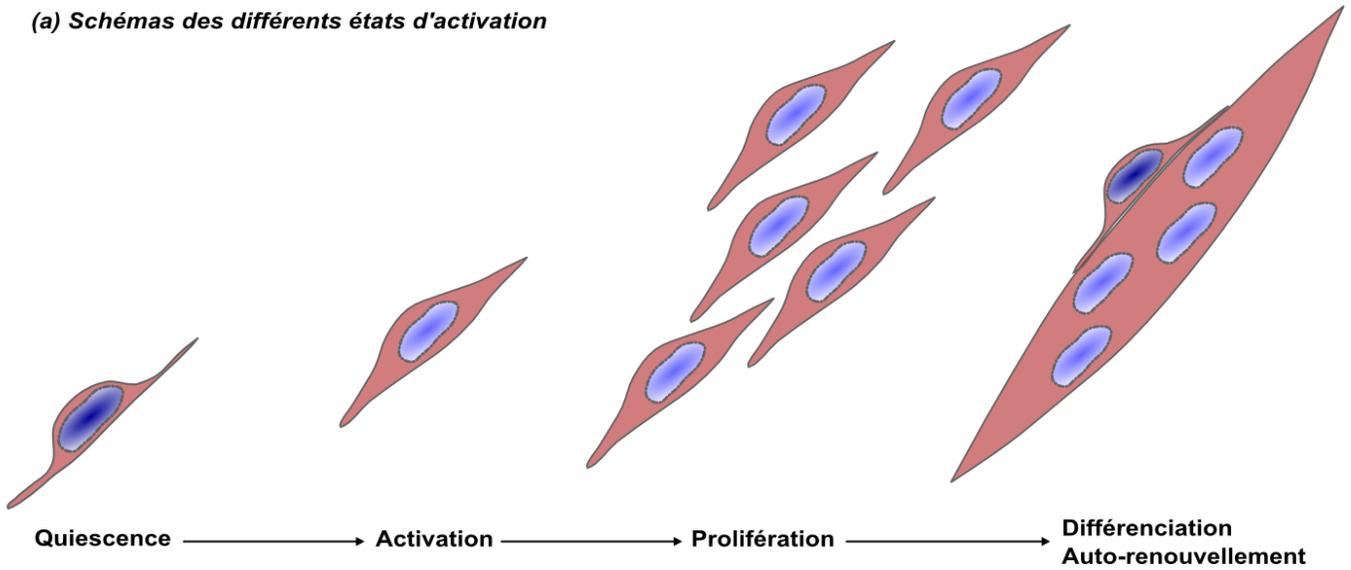
La réalisation de ces phénomènes fait appel à des processus complexes régulés de manière précise, et impliquant notamment une régulation de l'expression des différents acteurs impliqués au niveau épigénétique, post-transcriptionnel et même traductionnel. Le détail de ces processus ne sera pas abordé dans cette partie, mais servira d'exemple lors du développement de la **partie 4** de cette introduction.

## **b. Remodelage de la niche des cellules satellites par différentes populations cellulaires**

Avec l'âge, le nombre de cellules satellites diminue progressivement ([Renault 2002](#)). Les cellules satellites quittent en effet peu à peu leur état quiescent et deviennent sénescents, perdant leurs capacités prolifératives ([Sousa-Victor 2014](#)). Plusieurs études récentes suggèrent que cette déplétion est également causée par des variations de la niche dans laquelle évoluent les cellules satellites ([Chakkalakal 2012](#), [Barberi 2013](#)). Lors d'un dommage musculaire, les propriétés physico-chimiques de la niche changent également. La réponse pro-inflammatoire mise en place par les macrophages résidents ([Arnold 2007](#)) et la prolifération des fibroblastes ([Murphy 2011](#)) modifient l'élasticité du microenvironnement à proximité des cellules satellites et favorisent leur prolifération ([Trensz 2015](#)). La résolution de la réponse inflammatoire permet ensuite le remodelage du tissu fibreux et favorise la différenciation musculaire ([Arnold 2007](#), [Tidball 2010](#)). D'autres cellules résidant au sein de la niche des cellules satellites peuvent avoir une influence sur la régénération musculaire. Parmi elles, on peut trouver des cellules issues des vaisseaux sanguins ([Dellavalle 2007](#)), des cellules interstitielles ([Mitchell 2010](#)) ou encore des progéniteurs fibro-adipogéniques ([Joe 2010](#)).

La prolifération des cellules satellites dépend donc à la fois de facteurs intrinsèques (régulation de voies de signalisation) que de facteurs extrinsèques traduits par les constituants et les propriétés physico-chimiques de leur niche. Le dialogue complexe qui s'établit entre ces cellules, les fibroblastes et les cellules inflammatoires met en place une réponse régénératrice efficace. Nous verrons dans la **partie 2.4** que certains phénotypes de la DMD peuvent être liés à des dérégulations de ce dialogue moléculaire.

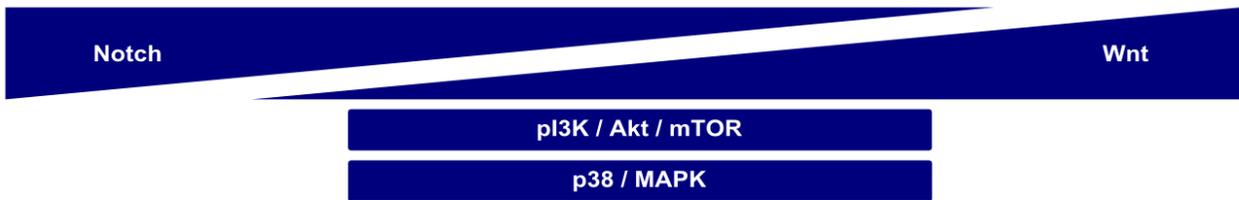
(a) Schémas des différents états d'activation



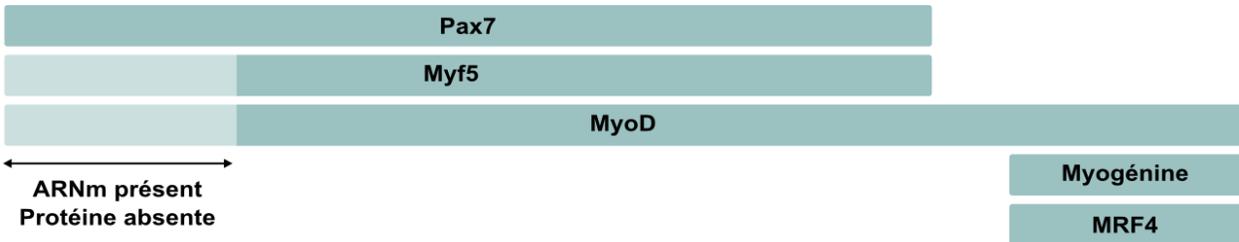
(b) Phases du cycle cellulaire correspondantes



(c) Activation des voies de signalisation



(d) Expression des facteurs myogéniques



(e) Métabolisme



**Figure 8** : L'activation des cellules satellites et les événements moléculaires associés. (a, b) Après stimulation (cytokine inflammatoire, facteur de croissance), les cellules satellites passent d'un état quiescent à un état activé (potentiellement via un état réversible G(Alert)) puis prolifèrent et se différencient en myotubes pluri-nucléés ou fusionnent avec des fibres pré-existantes. Une fraction de cellules retourne à l'état quiescent. (c) Le passage par ces différents états est contrôlé par l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation spécifiques. (d) Ce contrôle passe par l'expression coordonnée de marqueurs myogéniques. Notons qu'à l'état quiescent, les gènes codant pour MyoD et Myf5 sont transcrits mais non traduits (voir à ce sujet la **partie 4.2.3.b**). (e) Au cours de ces différentes phases, les besoins métaboliques des cellules satellites changent, ce qui se traduit par l'utilisation de substrats spécifiques pour la production d'ATP. Références : [Yablonka-Reuveni 1999](#), [Tureckova 2001](#), [Jones 2005](#), [Chen 2007](#), [Brack 2008](#), [Bentzinger 2012](#), [Ryall 2013](#), [Ryall 2015](#), [Hausburg 2015](#), [Dumont 2015](#).

### c. Transitions métaboliques des cellules satellites

Le passage des cellules satellites d'un état de quiescence à un état prolifératif puis différencié s'accompagne de transitions métaboliques définies ([Ryall 2013](#), et voir **Figure 8e**). Récemment, une étude a démontré que l'activation de ces cellules entraînait un changement métabolique important, depuis une oxydation des lipides (active en quiescence) à une glycolyse anaérobie (active en prolifération, [Ryall 2015](#)). Cette transition permet probablement de subvenir à l'importante demande d'énergie requise pour les divisions cellulaires successives. Une fois les cellules entrées en différenciation, la biogénèse mitochondriale s'amorce et permet, selon son intensité et le type de substrat disponible, de spécifier le type de fibre (lente ou rapide) ([Moyes 1997](#)). Parallèlement à ces transitions énergétiques, le métabolisme des radicaux libres oxygénés est lui aussi contrôlé de manière spécifique. Contre intuitivement, une équipe a mesuré des taux de radicaux superoxydes plus importants dans les myoblastes en prolifération (et donc glycolytiques) que dans les myotubes ([Mofarrahi 2008](#)). Produits par la NOX, ces ROS auraient un rôle direct dans l'activation des voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire (notamment PI3K / Akt / mTOR) ([Mofarrahi 2008](#)).

### 1.4.2. Régénération du myocarde et fibrose cardiaque

Jusqu'au début des années 2000, les cardiomyocytes étaient perçus comme des cellules non-prolifératives, caractérisées de « post-mitotiques ». Néanmoins, des études récentes ont montré que chez l'Homme comme chez la Souris, ces cellules se divisent à très faible fréquence ([Bergmann 2009](#), [Senyo 2013](#), [Ali 2014](#)). De plus, l'existence de cellules souches cardiaques

multipotentes a été démontrée ([Beltrami 2003](#)). Néanmoins, le rôle véritable de ces progéniteurs, notamment dans le maintien de l'homéostasie du myocarde reste méconnu. En effet, les études précédentes tendent à montrer que les cardiomyocytes néoformés du myocarde proviennent de cardiomyocytes préexistants et non de progéniteurs ([Senyo 2013](#), [Ali 2014](#)). De plus, ces progéniteurs semblent impuissants face aux dommages massifs engendrés par un infarctus, qui évolue dans le meilleur des cas vers la formation d'une cicatrice fibrotique et non d'un tissu musculaire fonctionnel ([Willems 1994](#)). Ceci est probablement dû à l'étendue de la zone à réparer, au fait que les cellules souches de la zone infarctée sont également endommagées, et au contexte particulier accompagnant la destruction des cardiomyocytes ([Robey 2008](#)).

Les fibroblastes interstitiels du myocarde sont néanmoins mobilisés lorsque celui-ci subit un stress. De même que pour le muscle squelettique, tout dommage du myocarde se répercute sur le microenvironnement cellulaire, dont les propriétés physico-chimiques changent. En présence d'un stress mécanique et de médiateurs chimiques libérés en cas de dommage, les fibroblastes acquièrent un phénotype de myofibroblastes ([Davis 2012](#)). Ils expriment alors une isoforme de l'actine présent dans les cellules musculaires lisses (*alpha Smooth Muscle Actin*,  $\alpha$ -SMA) ([Willems 1994](#)), ainsi que des protéines participant à la formation de la matrice extracellulaire. Par ce biais, ils participent à la cicatrisation et à l'apparition d'une fibrose cardiaque, souvent visible dans des situations pathologiques telles que l'infarctus du myocarde ([Willems 1994](#)). Une fois le processus cicatriciel achevé, les myofibroblastes disparaissent, potentiellement par apoptose ([Takemura 1998](#)).

Les muscles striés sont donc de parfaits exemples illustrant l'homéostasie en biologie, à toutes les échelles (organe, tissu, cellule). La contraction musculaire nécessite pourtant une activité mécanique et métabolique intense qui endommage en permanence le système, aussi bien structurellement que fonctionnellement (tensions mécaniques, surcharges calciques, stress oxydatif, *etc.*). Le maintien de l'homéostasie à l'échelle de l'organe fait intervenir des mécanismes intracellulaires efficaces qui permettent d'optimiser l'efficacité de la contraction, tout en maintenant l'intégrité cellulaire et l'architecture tissulaire. Lors de dommages à plus large échelle, les fibres musculaires squelettiques sont assistées par des populations cellulaires annexes (cellules satellites, fibroblastes, macrophages, progéniteurs myogéniques, *etc.*). Cependant, l'ensemble de ces processus n'est pas infaillible, et peine à répondre à des stress

environnementaux aigües de trop grande ampleur. De la même façon, des déséquilibres métaboliques chroniques peuvent eux aussi avoir une influence considérable sur la structure et la fonction du système musculaire strié. De tels déséquilibres se produisent parfois en cas de myopathie héréditaire, et la dystrophie musculaire de Duchenne en est un bon exemple.

## **2. La Dystrophie Musculaire de Duchenne**

*Dans la période ultime de la paralysie pseudo-hypertrophique, si l'exagération du volume des muscles a disparu (s'ils ont fondu pour ainsi dire) et que les membres paraissent atrophiés, l'examen microscopique de l'état anatomique des muscles sur le vivant, à l'aide de mon emporte-pièce histologique ou de tout autre instrument analogue, montrera que leurs faisceaux primitifs ont conservé, en général, leur striation transverse, et que leur tissu connectif interstitiel hyperplasié est mêlé à un tissu fibroïde et à des vésicules graisseuses en plus ou moins grande quantité.*

Guillaume Benjamin Amand Duchenne de Boulogne  
*Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclérotique*  
Archives générales de médecine, 1868, Vol. 11, p. 566.

### **2.1. Premiers travaux et tableau clinique**

Avec une incidence d'environ 1 sur 3600 garçons nés vivants (Canada, [Greenberg 1988](#)) et une prévalence de 1,38 pour 10000 individus mâles âgés de 5 à 24 ans (USA, [Romitti 2015](#)), la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD, [OMIM #310200](#)) est l'une des plus fréquentes des maladies neuromusculaires d'origine génétique. Elle affecte l'ensemble des muscles à des degrés variables et à des périodes différentes lors de l'évolution de la maladie. Les muscles striés squelettiques et le myocarde étant les plus largement atteints, la DMD est aussi l'une des maladies génétiques musculaires les plus sévères et handicapantes. Ce premier paragraphe rappelle brièvement les fondements historiques de la découverte de la DMD, et en détaille le tableau clinique et la prise en charge actuelle.

#### **2.1.1. Premières caractérisations de la DMD**

La DMD a été observée et décrite pour la première fois par Conte et Gioja en 1836 puis par Edward Meryon ([Meryon 1852](#)). Ce dernier avait noté l'apparition de symptômes moteurs chez quatre garçons d'une même famille qui éprouvaient des difficultés à sauter ou gravir des escaliers. Ces troubles moteurs étaient inévitablement suivis d'un déclin rapide de la condition physique avec perte complète de la marche puis des capacités respiratoires entre 15 et 20 ans. Ne

constatant aucune atteinte neurologique à l'autopsie, mais notant des altérations majeures de la structure des muscles, il avait déjà émis l'hypothèse d'une maladie myogénique. Malgré cette première description, la caractérisation exhaustive de la pathologie émergera des travaux de Guillaume Duchenne de Boulogne entre 1860 et 1870 ([Duchenne 1861](#) pp. 353-356, [1868](#) pp. 95-132) où il évoque une « paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ». Comme Meryon il finit par conclure à une origine myogénique pour cette maladie. L'examen histologique qu'il réalisa à l'époque lui révéla que les muscles des patients étaient infiltrés par un tissu conjonctif hyperplasié et par des vésicules adipeuses.

Ces premières découvertes datant d'environ 150 ans avaient déjà permis aux scientifiques de l'époque d'anticiper certaines caractéristiques de la DMD, tant sur le plan de sa transmission que de ses atteintes histologiques. Suite à ces premiers travaux, d'autres patients ont été identifiés et l'évolution de la DMD a pu être caractérisée en détail.

### 2.1.2. Sémiologie de la DMD et prise en charge actuelle

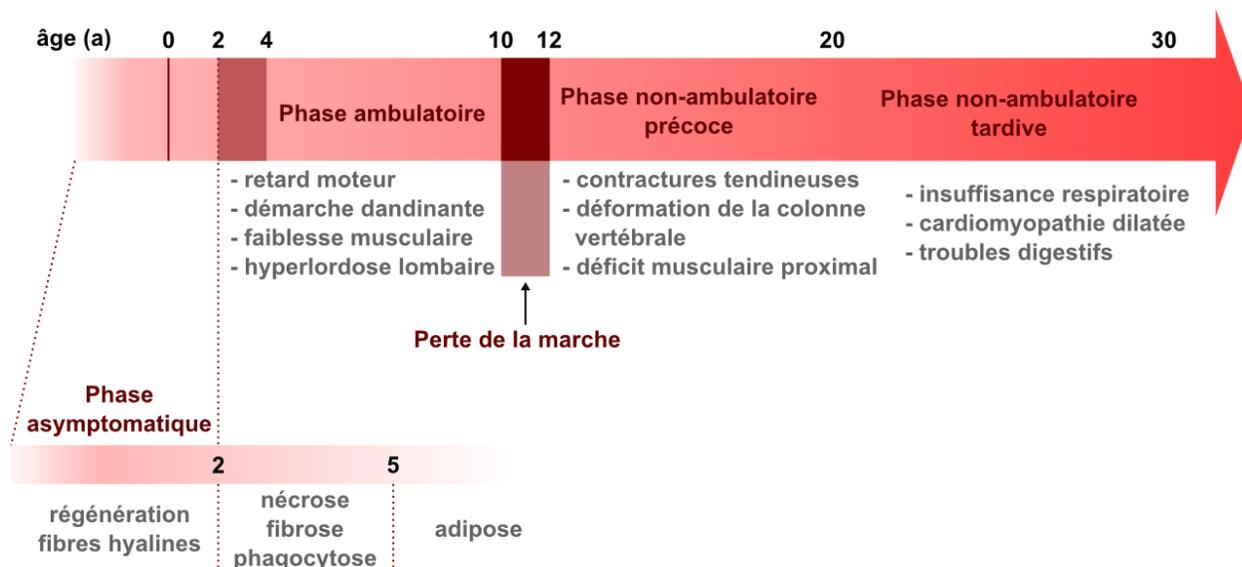
On sépare la DMD en trois phases successives récapitulées sur la **Figure 9** et dans le **Tableau 2** ([Duchenne Muscular Dystrophy: Advances in Therapeutics](#), SECTION I, Chapitre 1. pp. 1-20) :

- la phase ambulatoire : les premiers symptômes apparaissent généralement entre 2 et 4 ans, avec un retard moteur voire psychomoteur, une démarche digitigrade puis dandinante et le développement d'une hyperlordose lombaire. Malgré une hypertrophie apparente (notamment des triceps suraux), une faiblesse proximale se développe, principalement dans les membres inférieurs ;
- la phase non-ambulatoire précoce : la perte de la marche est observée classiquement vers l'âge de 10 ans. Les patients ne se déplacent qu'en fauteuil roulant, et développent un déficit musculaire généralisé, notamment aux membres supérieurs, ainsi qu'une scoliose ;
- la phase non-ambulatoire tardive : elle est marquée par une insuffisance respiratoire qui engendre une susceptibilité accrue aux infections pulmonaires graves. S'y ajoute une insuffisance cardiaque marquée par une diminution de la fraction d'éjection du ventricule gauche et des troubles du rythme cardiaque. Les parois ventriculaires finissent par se dilater de manière plus ou moins importante, aboutissant à une cardiomyopathie dilatée.

**Tableau 2 : Phases cliniques de la dystrophie musculaire de Duchenne, symptomatologie et prise en charge proposée.**

phases cliniques	symptômes	prise en charge
phase ambulatoire	faiblesse musculaire	corticostéroïdes : prednisone ou deflazacort
	retard moteur, difficultés motrices	orthèses
phase non-ambulatoire précoce	faiblesse musculaire	corticostéroïdes
	rétractations tendineuses	kinésithérapie, étirements, ténotomie
	scoliose	chirurgie stabilisatrice (arthrodèse rachidienne)
	problèmes cardiaques (préventif)	inhibiteurs de l'enzyme de conversion (périndopril, lisinopril)
phase non-ambulatoire tardive	insuffisance respiratoire	ventilation non invasive ou trachéotomie, corticostéroïdes
	cardiomyopathie	inhibiteurs de l'enzyme de conversion (périndopril, lisinopril)
	dysfonctionnements gastro-intestinaux (hypomobilité, constipation)	verticalisation, hydratation, régimes adaptés, traitements laxatifs
toutes phases confondues	problèmes cognitifs et troubles neuro-comportementaux	psychothérapie, orthophonie, scolarité adaptée

En plus de ces symptômes manifestation dus à des dysfonctionnements des muscles striés, on observe également pendant la phase non-ambulatoire tardive des troubles gastro-intestinaux probablement causés en partie par une atteinte des muscles lisses ([Barohn 1988](#)). Enfin, des troubles cognitifs et comportementaux ont parfois été relevés ([Hendriksen 2008](#)), le quotient intellectuel des patients DMD étant légèrement inférieur à la moyenne ([Bresolin 1994](#)). Mais ce sont bien les symptômes respiratoires et cardiaques qui mènent inévitablement au décès des patients. Néanmoins, alors que la survie à 20 ans n'atteignait même pas 25% dans les années 1980, elle est d'environ 60% à l'heure actuelle ([Passamano 2012](#)), et entre 40 et 50% des patients atteignent l'âge de 30 ans. Cette augmentation résulte directement de la meilleure prise en charge et des nouvelles options chirurgicales et thérapeutiques développées ces dernières décennies



**Figure 9:** Histoire naturelle de la DMD. La frise supérieure indique l'âge approximatif des patients auquel apparaissent les phases successives de la pathologie (en années). Une phase asymptotique précède l'apparition des premiers troubles, le plus souvent entre 2 et 4 ans. Les patients perdent la marche à un âge d'environ 10 - 12 ans. La transition entre les phases non-ambulatrices précoce et tardive est plus variable mais coïncide avec l'apparition des premiers troubles respiratoires et cardiaques. La partie inférieure de la frise est focalisée sur l'apparition des premiers signes histologiques de la DMD, qui semblent être déjà présents durant la période pré-natale.

(**Tableau 2**). Parmi elles, le traitement quasi-systématique des patients avec des corticostéroïdes (prednisone ou deflazacort) a permis d'améliorer la fonction musculaire ([Mendell 1989](#), [Henricson 2013](#)) et de retarder l'apparition des troubles orthopédiques ou cardiaques durant les phases non-ambulatrices ([King 2007](#), [Markham 2008](#)). De plus, la mise des patients sous ventilation non invasive associée à une chirurgie stabilisatrice de la colonne vertébrale peut améliorer leurs capacités respiratoires, et donc leur survie ([Eagle 2007](#)). Enfin, l'utilisation d'inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (périndopril, lisinopril, *etc*) peut permettre de retarder la dégradation de la fonction cardiaque ([Duboc 2007](#)).

### 2.1.3. Aspect histologique des muscles déficients en dystrophine

Suites aux premières observations de Duchenne et Meryon sur les muscles de leurs patients, plusieurs études ont permis de détailler les phénotypes pathologiques au niveau histologique ([Pearson 1962](#), [Bradley 1972](#), [Emery 1977](#), [Cullen 1980](#), **Figure 9**). Sur des

préparations de muscles de patients DMD, il est notamment possible d'observer :

- une régénération musculaire : présente dès les stades précoces de la maladie, elle se caractérise par des amas de petites cellules basophiles, au noyau central, élargi, et siège d'une synthèse importante d'ARN (les myoblastes) ;
- la présence de fibres hyalines : autre marqueur des phases précoces de la DMD, ces fibres présentent une ultrastructure hyper-contractée. Cet état pourrait correspondre à un stade pré-nécrotique réversible ;
- la présence de fibres calcifiées : les causes et conséquences de cette accumulation de calcium seront détaillées dans la **partie 2.4.2** ;
- le développement d'une fibrose touchant l'endomysium et le périnysium : l'épaississement des travées de tissu conjonctif est visible dès la phase ambulatoire et même chez les nouveau-nés. L'atteinte cardiaque qui se manifeste lors de la phase non-ambulatoire est également accompagnée d'une fibrose touchant l'épicarde et le myocarde ([Frankel 1976](#), [Verhaert 2011](#)) ;
- une nécrose et une phagocytose : la dégénérescence des fibres musculaires devient notable à l'âge de deux ans environ, de manière concomitante avec l'apparition des premiers symptômes. Les foyers de cellules nécrotiques sont parfois entourés de cellules immunitaires, notamment des macrophages et des lymphocytes ([McDouall 1990](#), [Desguerre 2009](#)) ;
- le remplacement du tissu musculaire par du tissu adipeux, qui n'est observé qu'à des stades plus avancés de la phase ambulatoire, soit environ vers l'âge de cinq ans.

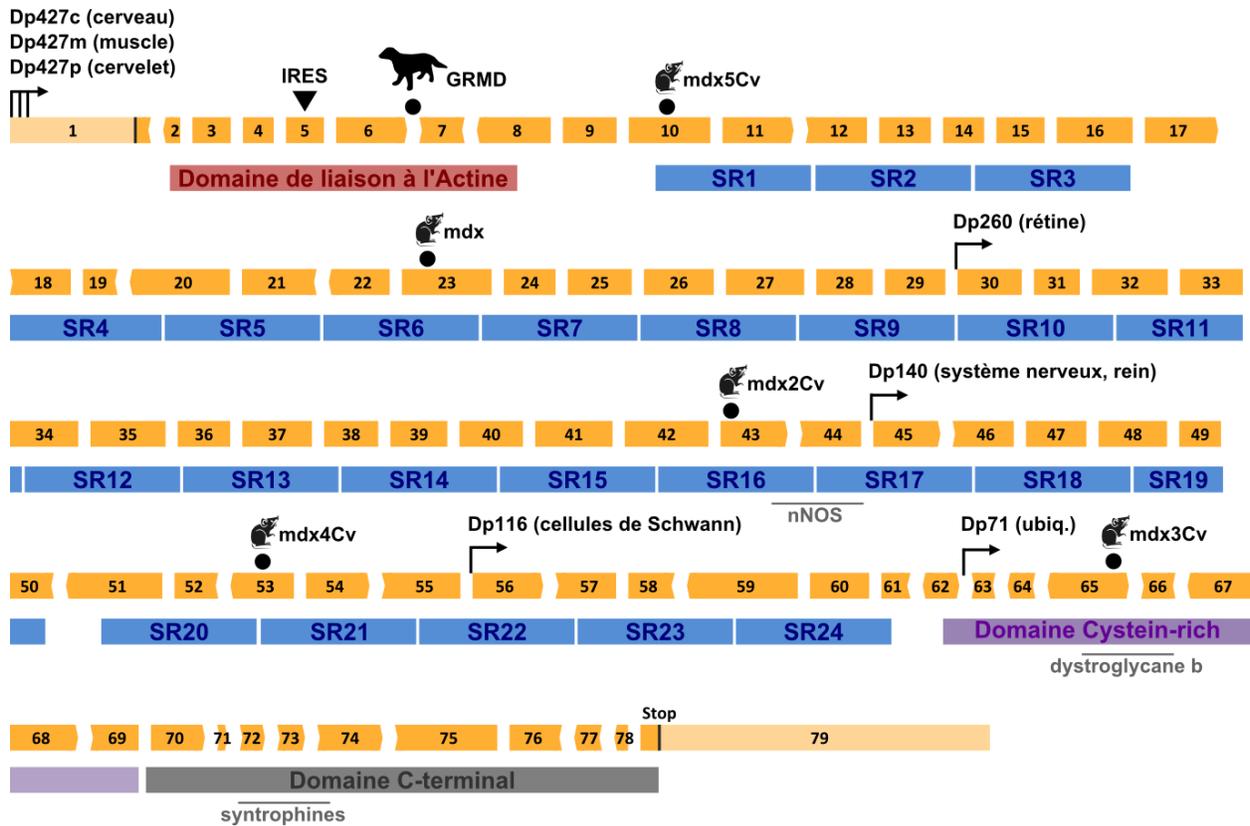
La **Figure 9** récapitule les trois phases de la DMD, les symptômes ainsi que les atteintes histologiques associées. Aux premiers stades de la maladie, la nécrose semble compensée par une régénération efficace, mais celle-ci finit par échouer après les premières années. S'installent alors un tissu fibrotique puis un tissu adipeux qui finissent par envahir la quasi-totalité des muscles squelettiques. Cependant, l'apparition précoce de la fibrose suggère que des dysfonctionnements de certaines cellules non-musculaires pourraient jouer un rôle actif dans le développement de la maladie. Quoi qu'il en soit, de nombreuses catégories de cellules sont visibles au sein des muscles malades (fibres en nécrose, en régénération, fibres hyalines, cellules immunitaires, fibroblastes, adipocytes, *etc*). La variabilité du diamètre cellulaire qui en résulte, appelée anisocytose, peut être quantifiée et servir de marqueur de l'évolution de la pathologie.

## 2.2. Étiologie de la DMD

### 2.2.1. Association de la DMD avec le gène *DMD*

Lors de leurs premières découvertes, Meryon et Duchenne avaient déjà remarqué que la maladie qu'ils étudiaient était familiale, progressive, et que la grande majorité de leurs patients étaient de sexe masculin ([Meryon 1852](#), [Duchenne 1868](#)). Jusqu'aux années 1980, plusieurs indices suggéraient également que la DMD avait une origine génétique et un mode de transmission lié au chromosome X, notamment sa ségrégation avec le syndrome de Turner (monosomie X, [Ferrier 1965](#)). Mais ce n'est qu'au début des années 1980 et avec l'essor de la génétique moléculaire que la DMD a pu être associée définitivement à un locus situé sur le bras court du chromosome X ([Murray 1982](#)). Le développement de la maladie chez les garçons implique un mode de transmission récessif, même si certaines patientes porteuses de l'anomalie génétique à l'état hétérozygote présentent parfois des symptômes neuromusculaires et cardiaques (on parle alors de conductrices symptomatiques, [Mercier 2013](#)). Suite au clonage d'un ADN codant (ADNc) de 14 kilobases (kb) issu du locus DMD ([Koenig 1987](#)), plusieurs transcrits isoformes ont été mis en évidence dans différents tissus (**Figure 10**). La base de données du groupe de recherche hollandais de Leiden recense ces différents isoformes (<http://www.dmd.nl>).

Le gène *DMD* (*dystrophin*, OMIM \*300377) s'étend sur plus de 2,2 mégabases, ce qui en fait l'un des plus longs du génome humain. Le nombre de mutations identifiées dans ce gène s'élève à ce jour à plus de 7000 chez les patients français ([Bladen 2015](#), [http://umd.be/TREAT\\_DMD/](http://umd.be/TREAT_DMD/)). Environ 69 % de ces mutations consistent en de larges délétions supprimant plus d'un exon du gène *DMD*. Lorsque ces délétions maintiennent un cadre de lecture ouvert dans le gène *DMD*, les patients présentent parfois une atteinte moins sévère que la DMD et évoluant moins rapidement : la dystrophie musculaire de Becker (BMD, OMIM #300376, [Becker 1955](#)). Les autres mutations rencontrées chez les patients DMD sont principalement des larges duplications (11 %) et des mutations ponctuelles (11 %). L'ensemble de ces phénomènes ne touche pas le gène *DMD* de manière homogène, et certains exons semblent être particulièrement sensibles aux mutations (deux tiers des délétions touchent par exemple une région située entre les exons 45 et 55). Dans certains cas, on observe dans les muscles des patients quelques fibres ré-exprimant le gène *DMD* de manière sporadique. Ces fibres révertantes, restent cependant minoritaires (1 à 10% selon les patients, [Thanh 1995](#)).



**Figure 10** : Carte schématique du transcrit *DMD* (jaune) et du cadre ouvert de lecture de la dystrophine (bleu). Les différents promoteurs (Dp) y sont indiqués suivis de la masse moléculaire des isoformes protéiques qu'ils génèrent ainsi que les organes où ils s'expriment (ex : Dp427m génère l'isoforme de 427 kilodalton (kD) dans le muscle). Les mutations rencontrées chez les principaux modèles animaux (**partie 2.3**) et la position du site d'entrée interne des ribosomes ([Wein 2014](#), **partie 4.2.2.b**) sont indiqués, ainsi que les sites de liaison à la *neuronal nitric oxide synthase* (nNOS), au dystroglycane  $\beta$  et aux syntrophines. SR : répétition homologue à la spectrine. Figure adaptée de la thèse de doctorat d'Adrien Léger ([adrien.leger@inserm.fr](mailto:adrien.leger@inserm.fr)).

La production de transcrits à partir du gène *DMD* est un processus complexe dont la durée est estimée à 12 à 16 heures ([Tennyson 1995](#)). Le détail de ces mécanismes ne sera pas abordé ici, mais servira d'exemple dans la **partie 4** de cette introduction.

## 2.2.2. La protéine dystrophine et le DAPC

L'expression du gène *DMD* à partir du promoteur musculaire aboutit à la synthèse de la dystrophine, protéine de 427 kD localisée en périphérie des cellules musculaires à proximité du sarcolemme ([Zubrzycka-Gaarn 1988](#), [Bonilla 1988](#)). Comme nous l'avons mentionné

précédemment (**partie 1.2.2.b**), cette protéine se situe au niveau des costamères ([Rybakova 2000](#)) et de la jonction myotendineuse ([Tidball 1991](#)), c'est à dire aux endroits où s'effectuent les transmissions de la force musculaire. Au sein des cardiomyocytes, on trouve en plus la dystrophine au niveau des tubules transverses ([Kaprielian 2000](#)). Suite à la détermination de la séquence complète de l'ADNc *DMD*, la structure et les différents domaines de la protéine ont pu être prédits puis validés expérimentalement ([Koenig 1988](#), **Figure 10**) :

- l'extrémité N-terminale permet la liaison à l'actine cytoplasmique (différente de l'actine sarcomérique) au niveau des costamères des disques Z ([Rybakova 2000](#)) ;
- un enchaînement de 24 répétitions homologues à la spectrine (SR) confèrent à la protéine sa rigidité et sa forme en bâtonnet ;
- un domaine riche en cystéines (*Cystein-rich* sur la **Figure 10**) ;
- l'extrémité C-terminale, structurée principalement en hélices  $\alpha$ .

Ces deux derniers domaines permettent à la protéine d'établir des liaisons avec les glycoprotéines du DAPC, et donc d'ancrer la dystrophine au sarcolemme ainsi qu'à la matrice extracellulaire (**Figure 5**). La composition et l'organisation du DAPC a fait l'objet de nombreuses études ([Lapidos 2004](#)). La **Figure 11** propose un schéma de ce complexe.

Chez les patients DMD, on observe qu'en l'absence de dystrophine, les protéines du DAPC semblent être déstabilisées et délocalisées ([Ervasti 1990](#), [Matsumura 1993](#)). Après une brève présentation des modèles animaux de la DMD, nous détaillerons les conséquences cellulaires et moléculaires de l'absence de la dystrophine et de la dislocation du DAPC sur la physiopathologie musculaire.

### 2.3. Les modèles animaux de la DMD

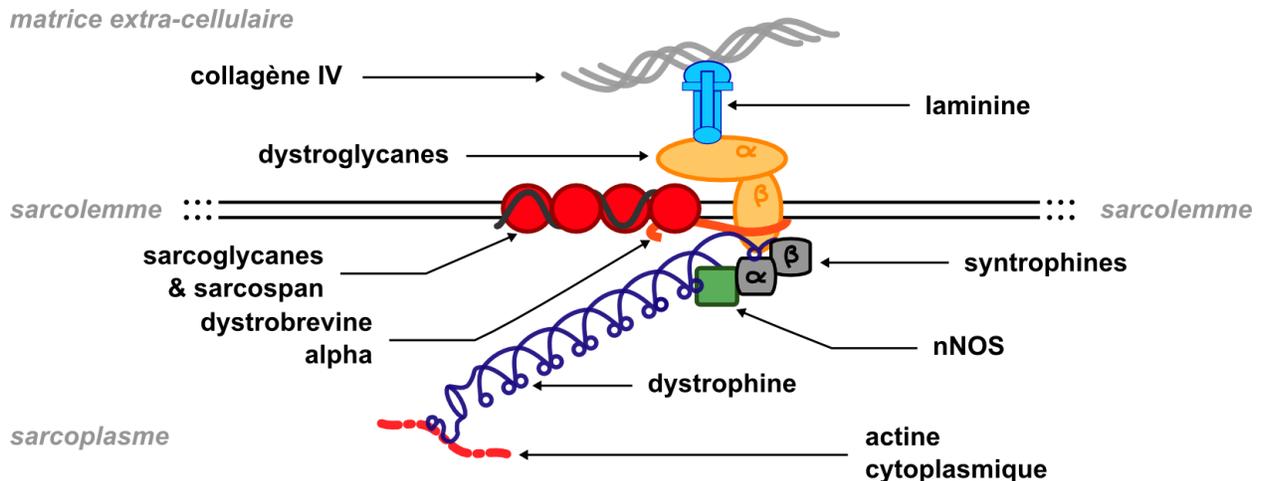
À l'heure actuelle, il existe environ une soixantaine de modèles animaux mimant la DMD, allant de la Drosophile et du Nématode aux nombreux modèles mammifères ([McGreevy 2015](#)). Chez ces deux espèces invertébrées, la mutation de l'orthologue du gène *DMD* ne mène pas à des phénotypes similaires. L'absence de dystrophine chez la Drosophile entraîne une dégénérescence musculaire, une dilatation du tube cardiaque et une diminution de la durée de vie, rappelant les phénotypes observés chez les patients ([Shcherbata 2007](#), [Taghli-Lamalle](#)

[2008](#)). En revanche, les nématodes mutants pour le gène *dys-1* présentent plutôt un phénotype hyperactif et hypercontracté sans atteinte musculaire majeure ([Bessou 1998](#)). Un modèle reproduisant plus fidèlement l'atteinte observée chez les patients peut toutefois être obtenu en combinant cette mutation avec une mutation supplémentaire dans le gène *hlh-1* (orthologue du gène *MYOD1* humain) ([Gieseler 2000](#)). Grâce à leur petite taille, leur facilité d'élevage et les outils génétiques qu'ils permettent de développer, ces modèles invertébrés sont principalement utilisés pour des criblages pharmacologiques ou génétiques à haut débit ([Gaud 2004](#), [Kucherenko 2011](#)). Toutefois, leur éloignement évolutif et leurs différences morphologiques et/ou génétiques avec les mammifères les excluent des études pré-cliniques de thérapie génique. Pour ces études, les équipes de recherche utilisent préférentiellement des modèles mammifères de la DMD, notamment murins et canins, sur lesquels nous nous focaliserons par la suite.

### 2.3.1. Les modèles rongeurs

#### a. La souris mdx et ses variantes alléliques

La souris mdx (pour *muscle dystrophy, X-linked*) a été découverte au cours d'un criblage visant à identifier des lignées mutantes pour des enzymes de la glycolyse ([Bulfield 1984](#)). Suite à l'observation d'un taux élevé de créatine kinase (CK) dans le sérum de ces souris, les auteurs ont décrit un ensemble d'atteintes histologiques rappelant celles des muscles des patients DMD. Cette ressemblance a été confirmée par des analyses génétiques démontrant l'existence d'une mutation non-sens dans l'exon 23 du gène *Dmd*, homologue murin du gène *DMD* (**Figure 10**, [Sicinski 1989](#)). Après caractérisation histologique, l'évolution de la dystrophie musculaire chez la souris mdx a pu être séparée en plusieurs phases ([Tanabe 1986](#)). Les premiers signes histologiques apparaissent environ à 3 semaines d'âge et se manifestent par une nécrose massive et simultanée affectant notamment les fibres musculaires des muscles appendiculaires. Celle-ci est associée à la présence de fibres hyalines, d'infiltrats de phagocytes et de progéniteurs musculaires activés. Des cycles de régénération / dégénérescence des fibres musculaires se succèdent ensuite, et vont durer la majeure partie de la vie des animaux. Ils sont à l'origine de la centronucléation et de l'anisocytose importante observées pendant cette phase. La fibrose musculaire est visible dès 3 semaines, mais reste un événement minoritaire et incomparable à celle observée chez les patients DMD ([Chamberlain 2007](#)). La fonction cardiaque des souris mdx



**Figure 11 :** La dystrophine et son complexe protéique associé, le DAPC. En plus de sa liaison à l'actine cytoplasmique par son domaine N-terminal, la dystrophine est liée au dystroglycane  $\beta$  par son domaine riche en cystéines, et aux syntrophines par son extrémité C-terminale. Tout comme la syntrophine  $\alpha$ , la dystrophine est également liée à la protéine nNOS par ses régions SR 16 et 17. Le dystroglycane  $\beta$  forme un complexe avec le dystroglycane  $\alpha$  à l'extérieur des cellules musculaires, lui-même relié à la matrice extra-cellulaire de collagène IV (par la laminine). De plus, il est connecté au complexe des sarcoglycanes par la dystrobrevine  $\alpha$ .

n'est pas affectée durant les premiers stades de la pathologie, mais des troubles apparaissent à l'âge de 9 à 10 mois et se maintiennent jusqu'à la mort des animaux ([Quinlan 2004](#), [Spurney 2008](#)). Les auteurs ont pu noter une diminution de la fraction de raccourcissement ventriculaire, une augmentation des diamètres internes systoliques et diastoliques du ventricule gauche, et l'apparition d'une fibrose cardiaque modérée. Le diaphragme reproduit plus fidèlement l'évolution de la DMD humaine, dans la mesure où la régénération tissulaire est moins efficace que dans les muscles des membres ([Stedman 1991](#)). Ainsi, les phénotypes musculaires rencontrés chez la souris mdx rappellent ceux des patients DMD, mais l'évolution pathologique est beaucoup plus lente chez ce modèle murin et n'affecte que très peu sa durée de vie ([Chamberlain 2007](#)). Diverses stratégies ont été développées pour tenter d'aggraver le phénotype des souris mdx, dans le but de le rendre plus semblable à celui des patients DMD. La mutagenèse chimique a notamment été utilisée afin de générer des variantes alléliques de la mutation mdx : les mdx *chemical variants* (Cv) ([Chapman 1989](#)). Quatre allèles alternatifs ont ainsi pu être créés, chacun apportant ses spécificités phénotypiques ([Danko 1992](#)). Le modèle mdx4Cv, auquel nous nous intéresserons dans les deux études de ce manuscrit, présente par exemple un

nombre moins élevé de fibres révertantes. Cependant, la sévérité globale de la maladie ainsi que son évolution ne sont pas fondamentalement différentes de celles des souris mdx.

### **b. Croisement de la souris mdx avec d'autres mutants**

En l'absence de dystrophine, des mécanismes compensatoires entrent en jeu et certaines protéines fonctionnellement analogues à la dystrophine voient leur niveau d'expression augmenter. C'est notamment le cas de l'utrophine et de l'intégrine  $\alpha 7$ , dont le niveau sous-sarcolemmal augmente dans les muscles des souris mdx et des patients DMD ([Hodges 1997](#), [Kleopa 2006](#)). La délétion de l'un de ces deux gènes provoque l'aggravation notable du phénotype mdx ([Grady 1997](#), [Guo 2006](#)). Ces souris affichent un retard de croissance, des déformations de la colonne vertébrale et des troubles respiratoires et cardiaques réduisant leur durée de vie à 10 - 20 semaines (mdx /*utr*<sup>-/-</sup>) ou 24 - 28 jours (mdx /*itga7*<sup>-/-</sup>). Histologiquement, les muscles squelettiques et cardiaques de ces souris présentent des atteintes structurales et fonctionnelles majeures, notamment une nécrose importante et une fibrose précoce et étendue.

Une autre hypothèse pouvant expliquer les différences phénotypiques entre souris mdx et patients DMD stipule que le potentiel régénératif des cellules satellites est plus important chez la Souris. En suivant ce raisonnement, d'autres modèles doubles mutants ont été générés : le modèle mdx/*Myod*<sup>-/-</sup> ([Megency 1996](#)), et le modèle mdx/*mTR*<sup>-/-</sup>, déficient en un composant de la télomérase (une enzyme permettant de maintenir la longueur des télomères constante au fil des divisions cellulaires) ([Sacco 2010](#)). Chez ces deux modèles, des aggravations phénotypiques semblables à celles décrites ci-dessus ont aussi pu être obtenues.

Même si ces modèles reproduisent plus fidèlement les phénotypes rencontrés dans la forme humaine de la DMD, ils sont néanmoins imparfaits du point de vue génétique, dans la mesure où une mutation supplémentaire est présente chez ces souris. Le modèle *Cmah*<sup>-/-</sup> mdx ne présente pas cet inconvénient ([Chandrasekharan 2010](#)). La *cytidine monophosphate sialic acid hydroxylase* (*Cmah*) est une enzyme intervenant dans le métabolisme des glycanes membranaires, et dont l'expression a été inactivée chez l'Homme au cours de l'évolution. Génétiquement parlant, le double mutant *Cmah*<sup>-/-</sup> mdx est donc même plus proche des patients DMD que les simples souris mdx. L'atteinte musculaire s'y développant est également plus sévère que celle du modèle mdx, avec une survie à 1 an d'environ 50% et des atteintes structurales et fonctionnelles dans la totalité des muscles analysés, dont le cœur et le diaphragme ([Chandrasekharan 2010](#)). Toutefois, ce modèle n'est à l'heure actuelle que très peu répandu dans

la communauté, et aucune étude à visée thérapeutique n'y a encore été entreprise.

### c. Autres modèles rongeurs

Les récents progrès en matière d'édition du génome ont permis de manipuler génétiquement des espèces animales d'intérêt afin d'en faire des modèles pour certaines maladies. Concernant la DMD, deux études récentes ont permis la création de lignées transgéniques de rats déficients en dystrophine en utilisant des nucléases de type CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*, [Nakamura 2014](#)) ou TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*, [Larcher 2014](#)). Les rats obtenus par ces deux équipes affichent une pathologie musculaire sévère, visible dès l'âge de 3 mois et progressive jusqu'à au moins 7 mois. L'un de ces deux modèles a même été décrit pour développer une cardiomyopathie dilatée associée à une fibrose et une nécrose du myocarde ([Larcher 2014](#)).

## 2.3.2. Les modèles « gros animaux »

### a. Le chien GRMD

Même s'ils reproduisent la plupart des symptômes de la DMD le plus fidèlement possible, les modèles rongeurs pourront toujours être critiqués pour leur taille et leur masse, trop éloignées de la morphologie humaine. Pour une maladie touchant l'appareil locomoteur, la nécessité d'utiliser des modèles dits « gros animaux » est d'une importance capitale lors des phases précliniques avancées. Des apparitions spontanées de phénotypes dystrophiques ont été enregistrées dans de nombreux élevages canins, et certains mutants ont pu être caractérisés. Parmi eux, le chien *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (GRMD) est le plus étudié ([Valentine 1986](#), [Kornegay 1988](#)). Cette lignée porte une mutation ponctuelle dans le site d'épissage en 3' de l'intron 6 du gène *DMD* canin entraînant le saut de l'exon 7 dans l'ARN messager (ARNm), un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP précoce dans l'exon 8 (**Figure 10**, [Sharp 1992](#)). L'absence de dystrophine fonctionnelle résultant de cette mutation mène à une panoplie de symptômes classiquement rencontrés chez les patients DMD : difficultés motrices, faiblesse musculaire, troubles cardiaques et respiratoires ([Valentine 1988](#)). Toutefois les chiens GRMD présentent aussi des symptômes spécifiques, comme un déficit de croissance et une hyper-salivation, dus à une atteinte majeure de la langue et des muscles pharyngés. De plus,

l'expressivité de la mutation GRMD est variable ; la mortalité néonatale est importante, la sévérité de l'atteinte musculaire peut être modérée chez certains animaux, voire même quasi-asymptomatique ([Ambrosio 2008](#)). Même si cette variabilité est retrouvée dans la forme humaine de la maladie, elle complexifie indéniablement les analyses statistiques lors de l'utilisation de ce modèle. Histologiquement, les muscles GRMD affichent des modifications sévères et équivalentes à celles des muscles des patients DMD ([Valentine 1992](#)). Ainsi, même si ce modèle canin n'affiche pas des phénotypes strictement identiques à ceux des patients DMD, il reste à l'heure actuelle le modèle « gros animal » de choix pour les études pré-cliniques avancées.

#### **b. Autres modèles « gros animaux »**

Hormis le golden retriever, d'autres espèces canines présentent spontanément des mutations engendrant les symptômes d'une dystrophie musculaire ([McGreevy 2015](#)). De plus, la mutation GRMD a été introduite dans un fond génétique Beagle afin d'obtenir un modèle canin de plus petite taille mais avec un phénotype globalement similaire (*canine X-linked muscular dystrophy in Japan, CXMDJ*, [Shimatsu 2003](#)). Enfin, même si leur utilisation est encore marginale, citons par souci d'exhaustivité l'existence de modèles félins ([Carpenter 1989](#)), porcins ([Klymiuk 2013](#)) et plus récemment la création d'un modèle primate non-humain ([Chen 2015](#)).

#### **2.3.3. Conclusion : comparaison des différents modèles**

Il n'existe probablement pas de modèle parfait pour la DMD. Les différences inter-espèces introduisent nécessairement des biais et ne seront jamais en mesure de reproduire l'exacte situation génétique et physiopathologique rencontrée chez les patients. Toutefois, en gardant à l'esprit ces limitations, chaque modèle peut être utilisé pour un certain type d'applications. Et si les modèles gros animaux, notamment le chien GRMD, sont les plus pertinents lors d'une évaluation pré-clinique avancée, les modèles murins mdx et leurs dérivés restent quant à eux les plus utiles pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques (**partie 2.4**), le criblage de composés pharmacologiques (**partie 2.5**), ou la mise au point et l'optimisation de stratégies thérapeutiques innovantes (**partie 3**).

## 2.4. Physiopathologie cellulaire et moléculaire de la DMD

La dystrophine et son complexe protéique associé (le DAPC) forment un ensemble multifonctionnel dont l'absence dans les muscles des patients DMD entraîne des dysfonctionnements multiples à l'échelle cellulaire. Si l'hypothèse initiale d'un rôle purement mécanique de la dystrophine explique en partie les phénotypes observés, sa fonction de plateforme de signalisation et son interaction avec de nombreux partenaires protéiques participent certainement au développement des processus nécrotiques, inflammatoires et fibrotiques. Ce paragraphe détaille les conséquences cellulaires et moléculaires de l'absence de dystrophine et tente de mettre en évidence leur interdépendance.

### 2.4.1. Modifications de l'architecture cellulaire

Plus d'un siècle après les premières suppositions de Meryon et Duchenne, l'arrivée du microscope électronique a pu mettre en évidence des ruptures de la membrane plasmique à partir de biopsies musculaires de patients DMD ([Mokri 1975](#)). En l'absence de dystrophine, la structure des costamères est fortement modifiée et ne permet plus la transmission du mouvement de raccourcissement des myofibrilles à l'endomysium ([Rybakova 2000](#), [Ramaswamy 2011](#)). La désolidarisation du sarcolemme de l'appareil contractile génère alors des tensions qui finissent par rompre l'intégrité des fibres musculaires, les rendant perméables ([Petrof 1993](#), [Straub 1997](#)). Parmi les autres altérations de l'architecture cellulaire, on trouve une hypercontraction des sarcomères, des mitochondries enflées et mal-positionnées ([Percival 2013](#)) et une dilatation du réticulum sarcoplasmique ([Cullen 1980](#)). Chez les souris mdx adultes, on note de plus une densification et une désorganisation du réseau de microtubules, allant de pair avec une localisation aberrante de l'appareil de Golgi ([Percival 2007](#), [Khairallah 2012](#)). L'ensemble de ces phénomènes aboutit à une déstructuration importante des cellules musculaires déficientes en dystrophine, qui a certainement un impact sur l'homéostasie mécanique des cellules musculaires striées ([Ramaswamy 2011](#)).

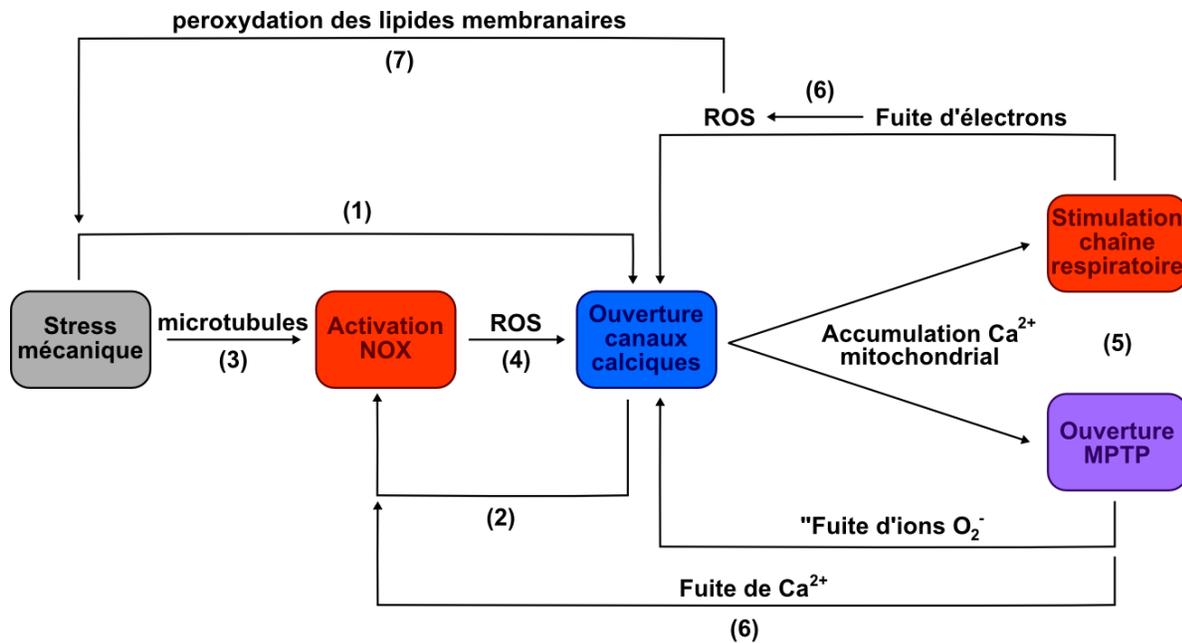
### 2.4.2. Rupture de l'homéostasie calcique

En l'absence de dystrophine, la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  augmente de manière notable

dans le cytoplasme des fibres musculaires ([Geissinger 1990](#)). Sur des fibres mdx isolées, une succession de contractions excentriques provoque une nette augmentation des flux calciques, notamment au niveau sous-sarcolemmal ([Mallouk 2000](#)). De manière intéressante, ce mouvement d'ions ne semble pas être un phénomène passif résultant d'une simple rupture membranaire, mais plutôt de la suractivation de canaux SAC (*stretch-activated channels*) ([Allen 2010](#)). Par ailleurs, le canal mécano-sensitif TRPC1 (*transient receptor potential canonical 1*) est connu pour interagir avec la syntrophine au niveau du DAPC ([Vandebrouck 2007](#)), et son inhibition diminue l'accumulation intracellulaire de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les fibres mdx ([Vandebrouck 2002](#)). Tout se passe donc comme si la déstabilisation du DAPC entraînait une incapacité des fibres musculaires mdx à réguler l'activité des canaux SAC et TRPC1, provoquant l'entrée incontrôlée d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  suite à une contraction. En conséquence, certaines protéases dépendantes du calcium (appelées calpaïnes) sont suractivées dans les muscles mdx ([Spencer 1995](#)), menant à une protéolyse importante de protéines essentielles, notamment au niveau des myofibrilles ([Gokhin 2014](#)). Comme nous l'avons vu dans la **partie 1.3.2**, l'augmentation de la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$  dans les mitochondries entraîne l'ouverture du MPTP et la mort cellulaire ([Nakagawa 2005](#)). Il est intéressant de noter que les mitochondries diaphragmatiques et cardiaques des souris mdx sont particulièrement sensibles à la surcharge calcique, qui provoque rapidement l'ouverture du MPTP ([Ascah 2011](#), [Pauly 2012](#)), phénomène susceptible de participer à la nécrose musculaire. En faveur de cette hypothèse, une étude a montré que l'utilisation d'un inhibiteur de la cyclophiline D, un membre présumé du MPTP, permettait une amélioration phénotypique notable chez la souris mdx ([Millay 2008](#)). Pour conclure, il semble que la rupture de l'homéostasie calcique soit l'un des facteurs majeurs de la physiopathologie de la DMD. Or, nous avons vu dans la **partie 1.3.2** qu'au sein des cellules musculaires, cette homéostasie était inséparable de l'activité métabolique ainsi que de l'équilibre oxydo-réducteur intracellulaire (**Figure 8, Figure 12**).

#### 2.4.3. Altérations métaboliques et stress oxydatif

De nombreuses études ont montré que les mitochondries issues des fibres musculaires DMD avaient une efficacité respiratoire amoindrie et génèrent moins d'ATP ([Percival 2013](#),



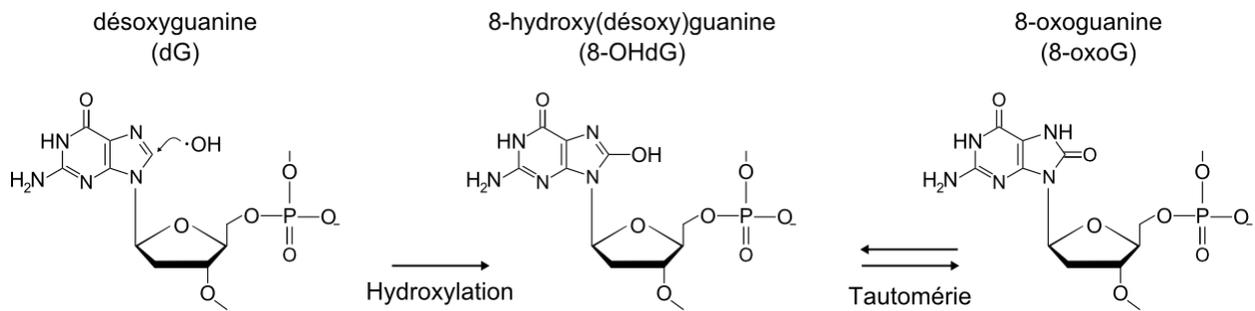
**Figure 12 :** Amplification incontrôlée du déséquilibre calcique (bleu) / oxydatif (rouge) ou mixte (violet) dans les muscles DMD. À cause de stress mécaniques chroniques (gris), une augmentation des flux calciques est observée (1), provoquant l'activation de NOX (2). Cette enzyme peut également être activée directement par le stress mécanique, via le réseau de microtubules (3). Les ROS générés auto-amplifient le déséquilibre calcique, notamment par l'ouverture du canal TRPC1 (4). Les ions  $\text{Ca}^{2+}$  finissent par s'accumuler au sein des mitochondries, augmentant l'activité respiratoire et provoquant l'ouverture du MPTP (5). Ces deux phénomènes entraînent le relargage d'ions  $\text{O}_2^-$  et  $\text{Ca}^{2+}$ , aggravant encore plus le déséquilibre calcique et le stress oxydatif (6). Enfin, les ROS endommagent également le sarcolemme par peroxydation des lipides, augmentant sa susceptibilité aux stress mécaniques (7).

[Rybalka 2014](#)). Les causes de cette inefficacité sont sûrement multiples. Une étude a notamment démontré l'existence de dysfonctionnements intrinsèques des chaînes respiratoires mitochondriales, notamment au niveau du complexe I ([Rybalka 2014](#)). S'il réduit fatalement l'efficacité respiratoire, ce découplage fonctionnel, combiné à l'augmentation de la concentration en ions  $\text{Ca}^{2+}$ , est aussi susceptible de conduire à la formation de ROS (**partie 1.3.2**). Une étude parue en 2009 a élégamment montré l'existence d'une auto-amplification des niveaux d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  et de ROS spécifiquement dans les fibres musculaires mdx, se déroulant successivement dans le sarcoplasme (probablement en position sous-sarcolemmale) puis dans les mitochondries ([Shkryl 2009](#), **Figure 12**). Le phénomène initial déclenchant ce déséquilibre pourrait être la formation de ROS par l'enzyme NADPH oxydase (NOX), dont le niveau d'expression est augmenté dans les muscles mdx ([Shkryl 2009](#), [Whitehead 2010](#)). Au sein de ces cellules, NOX

pourrait être suractivée de manière mécano-dépendante, à la suite de tensions mécaniques transmises par le réseau de microtubules ([Khairallah 2012](#)).

La surproduction de ROS dans les fibres musculaires mdx se répercute sur de nombreux composants cellulaires. Ils causent notamment la peroxydation des lipides membranaires, participant probablement à la susceptibilité du sarcolemme vis à vis des stress mécaniques ([Nakae 2004](#), [Renjini 2012](#)). Ils entraînent de plus l'oxydation des protéines, notamment par carbonylation ([El-Shafey 2011](#), [Renjini 2012](#), [Iwasaki 2013](#)). En plus des canaux calciques mentionnés ci-dessus, on peut légitimement penser que ces dommages affectent aussi les protéines sarcomériques, ce qui est connu pour mener à des dysfonctionnements des sarcomères et une diminution de force ([Steinberg 2013](#)). Enfin, les ROS peuvent également endommager les acides nucléiques. Les sites de la molécule d'ADN les plus sensibles au stress oxydatif se trouvent au niveau des guanines, qui peuvent être hydroxylées sur leur carbone N°8 (8-OHdG, **Figure 13**). De manière intéressante, les urines des patients DMD contiennent des quantités importantes de 8-OHdG, signe que leur ADN a subi un stress oxydatif ([Rodriguez 2003](#)). La présence de ces nucléotides modifiés au sein de l'ADN peut avoir plusieurs conséquences, et entraîner par exemple une mutagenèse ou une carcinogénèse ([Klaunig 2010](#)). Or, plusieurs études menées chez des souris mdx âgées ont noté l'apparition spontanée de tumeurs musculaires de type rhabdomyosarcomes ([Chamberlain 2007](#), [Schmidt 2011](#)). Concernant l'ARN, la présence de dommages oxydatifs dans les cellules musculaires n'a jamais été envisagée à ce jour. Ceci n'est pourtant pas à exclure, compte tenu de la mise en évidence d'un tel phénomène lors du vieillissement musculaire ([Hofer 2008](#)) ou dans une certaine forme de myopathie à corps d'inclusion ([Tateyama 2003](#)) (**partie 4.2.2.b**).

Enfin, une altération métabolique supplémentaire est à noter dans les muscles déficients en dystrophine, résultant de la perte de la protéine nNOS (*neuronal Nitric Oxide Synthase*). Cette enzyme fait partie du DAPC et établit des liaisons avec la syntrophine  $\alpha$  et la dystrophine ([Lai 2009](#)). Chez les patients DMD, on constate non seulement que nNOS n'est plus localisée au niveau du sarcolemme ([Brennan 1995](#)), mais également que son expression est inhibée au niveau transcriptionnel ([Arning 2004](#)). Physiologiquement, nNOS utilise l'arginine et le NADPH pour synthétiser du monoxyde d'azote (NO), un gaz impliqué dans les processus de vasodilatation mais aussi dans la relaxation musculaire ([Kobzik 1994](#)). Chez les patients DMD, la quantité de NO synthétisée en réponse à l'activité musculaire est diminuée, entraînant une



**Figure 13 :** Oxydation des nucléotides déoxyguanosine monophosphate de l'ADN par les radicaux libres hydroxyl. L'attaque oxydative se fait sur le carbone N°8 de la base azotée et débouche sur un équilibre entre deux formes tautomères : la 8-hydroxyguanosine et la 8-oxoguanosine.

ischémie ([Sander 2000](#)). Cette carence en NO et l'ischémie aiguë qui en résulte ont certainement des implications fonctionnelles majeures sur le métabolisme et le stress oxydatif développés dans les muscles déficients en dystrophine.

#### 2.4.4. Réaction du système immunitaire

L'absence de dystrophine dans le muscle squelettique et la nécrose cellulaire qui en résulte créent un environnement tissulaire favorable à l'apparition d'une réponse inflammatoire. L'examen microscopique du muscle DMD révèle la présence de différentes populations de cellules myéloïdes (principalement des macrophages, mais aussi des mastocytes, neutrophiles et éosinophiles) ([Hodgetts 2006](#), [Radley 2006](#), [Villalta 2009](#)) et lymphoïdes (principalement des lymphocytes T, [Engel 1986](#)). Les événements moléculaires déclenchant cette réponse immunitaire ne sont pas encore totalement compris, mais impliquent probablement la voie NF- $\kappa$ B. Chez la souris mdx, il a été démontré qu'un stress mécanique était susceptible d'augmenter l'activation de cette voie de signalisation, par l'intermédiaire des ROS ([Kumar 2003](#)). Ceci entraîne probablement une augmentation de la réponse immunitaire *in situ* en créant un environnement cytokinique favorable au recrutement des cellules immunitaires. Plusieurs études ont mis en évidence la contribution de ces cellules dans le développement et l'évolution de la DMD ([Spencer 2001](#), [Hodgetts 2006](#)). Plus particulièrement, les macrophages semblent orchestrer précisément les processus de nécrose / régénération des fibres musculaires : au moment du pic de nécrose observé chez la souris mdx entre 3 et 4 semaines, ils adoptent un phénotype « pro-inflammatoire » (M1) et participent à l'élimination des myotubes ; dans un

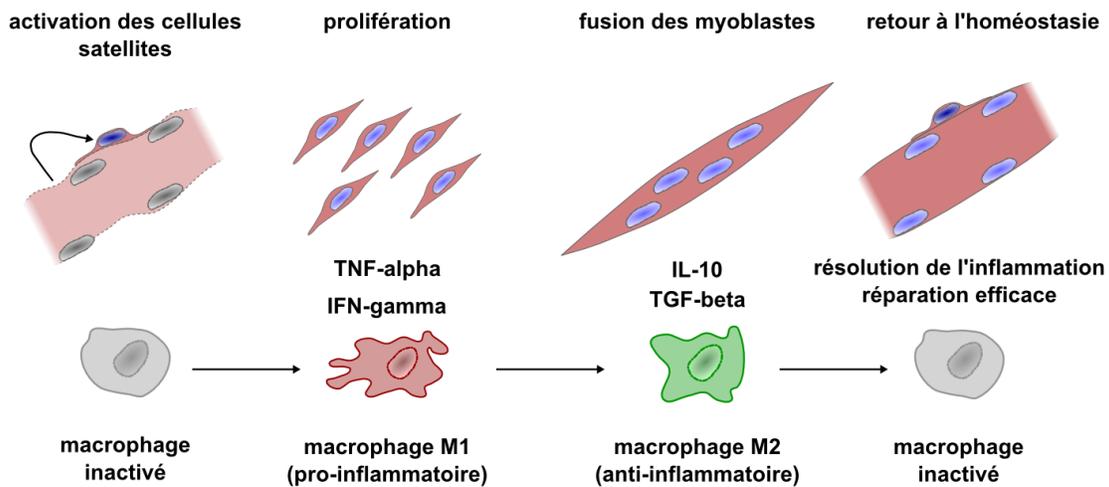
second temps, ils basculent vers un phénotype « anti-inflammatoire » (M2) et favorisent la résolution de la réponse inflammatoire et la fibrose ([Villalta 2009](#)). Une étude récente nuance toutefois cette dichotomie, et suggère l'implication d'autres populations de macrophages chez la souris mdx ([Lemos 2015](#)). Ces cellules sécrètent simultanément des facteurs pro-inflammatoires et pro-fibrotiques. En empêchant l'apoptose des progéniteurs fibro-adipogéniques (**partie 2.4.5**), elles pourraient participer au développement de la fibrose durant la phase tardive de la pathologie des souris mdx. La **Figure 14** récapitule ces événements de manière simplifiée, et précise les principaux facteurs solubles (souvent des cytokines) impliqués.

#### 2.4.5. Fibrose et cellules satellites

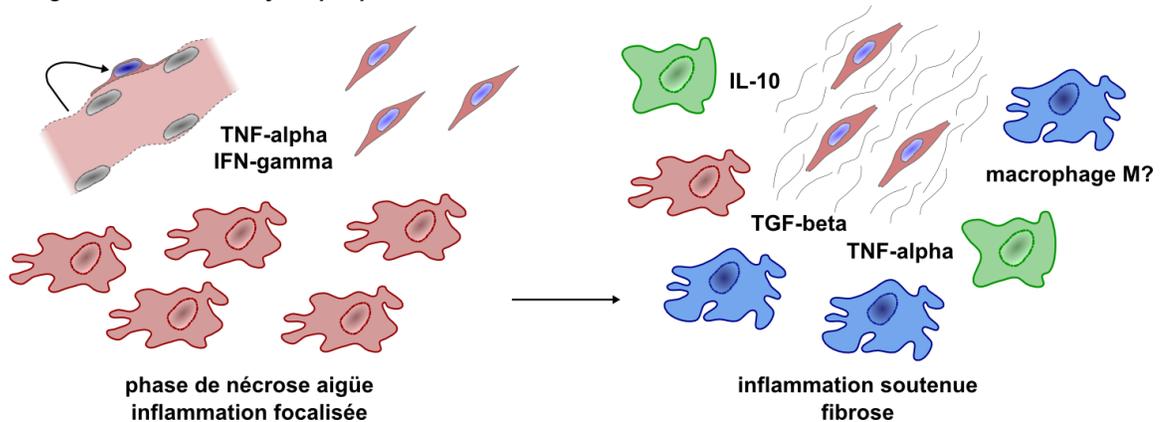
Le changement de phénotype des macrophages s'accompagne du développement d'un processus fibrotique, déclenché par l'expression de *transforming growth factor* (TGF)- $\beta$  par les macrophages « anti-inflammatoires » M2 ([Zhou 2006](#), [Vidal 2008](#), [Wehling-Henricks 2008](#)). En réponse, les fibroblastes interstitiels sécrètent du collagène et d'autres molécules participant à la formation de matrice extracellulaire. En plus des fibroblastes, des études récentes ont démontré l'existence de progéniteurs fibro-adipogéniques ([Joe 2010](#), [Uezumi 2010](#)). Ces cellules ont notamment pour fonction d'assister les cellules satellites lors de la régénération musculaire, mais elles pourraient également participer à la fibrose musculaire dans certaines conditions. De manière intéressante, une partie de ces cellules s'accumule dans les zones fibrotiques du diaphragme des souris mdx, et est capable de répondre à l'action du TGF- $\beta$  en sécrétant du collagène ([Uezumi 2011](#)). Au niveau du myocarde mdx, des cellules similaires ont pu être identifiées, et participerait à l'établissement de la fibrose périvasculaire typiquement observée à des stades avancés de la pathologie ([Ieronimakis 2013](#)). Enfin, ces progéniteurs sont capables d'interagir avec les macrophages infiltrés, ceux-ci conditionnant leur survie ou leur apoptose durant les phases successives de la régénération musculaire ([Lemos 2015](#)).

La nécrose des fibres musculaires et la réponse inflammatoire qui l'accompagne sont aussi de puissants signaux d'activation pour les cellules satellites résidentes du muscle. L'une des hypothèses pour expliquer la faiblesse progressive des muscles DMD repose sur une inefficacité de leurs capacités régénératives ([Webster 1990](#)) et leur différenciation prématurée ([Yablonka-Reuveni 2006](#)), qui pourraient dépendre de la dérégulation de la voie Notch ([Jiang](#)

a) *dommage dans un muscle sain :*



b) *dommage dans un muscle dystrophique :*



**Figure 14 :** Implication des macrophages infiltrés dans la régénération musculaire (a : muscle sain) ou la fibrose (b : muscle DMD). a) Dans un muscle sain, les macrophages transitent successivement par les phénotypes pro-inflammatoire (M1) et anti-inflammatoire (M2) avant de revenir à l'état initial inactivé. Ils participent aux différentes étapes de la régénération musculaire grâce aux différents facteurs solubles qu'ils sécrètent. b) Dans un muscle de souris mdx, la phase de nécrose aiguë observée vers 3 semaines d'âge est marquée par une infiltration massive de macrophages M1, participant à la nécrose des fibres. Une fois cette phase terminée, la réponse inflammatoire reste soutenue au sein du tissu, avec la maintenance de macrophages M1, M2 et potentiellement de macrophages de phénotypes différent ou mixte (M?), ce qui provoque le développement progressif d'une fibrose. IFN : interféron ; IL : interleukine.

2014). Ces observations peuvent être mises en relation avec plusieurs études ayant démontré une érosion des télomères au sein des muscles de patients DMD (Decary 2000) ou de souris mdx (Lund 2007), résultant probablement des cycles de régénération successifs. Même si des facteurs

intrinsèques participent sans doute à ces phénomènes, le remodelage de la niche résultant de l'absence de dystrophine joue probablement un rôle majeur. Ceci a notamment été illustré lors d'une étude récente, démontrant la sensibilité particulière des cellules satellites mdx à un stress oxydatif due à un défaut d'expression de la protéine Bmi1 ([Di Foggia 2014](#)).

#### 2.4.6. Altérations épigénétiques dans les muscles dystrophiques

L'absence de dystrophine mène également à une perturbation profonde de l'expression génique ([Haslett 2002](#), [Noguchi 2003](#)). Les études de séquençage à haut débit à l'échelle du transcriptome entier sont encore rares mais démontrent l'existence d'un panel de transcrits surexprimés (tubuline, NOX, TRPC, *etc.*) ou sous-exprimés (RyR, DHPR, SERCA, enzymes anti-oxydantes *etc.*) dans les muscles DMD ([Khairallah 2012](#), [Wein 2014](#)). Nous constaterons dans la **partie 4** de cette introduction que l'absence de dystrophine entraîne des dérégulations de l'activité de certaines enzymes épigénétiques, notamment les Histone Désacétylases (HDAC), menant à une perturbation globale du paysage épigénétique chez les souris mdx et les patients DMD. Ces perturbations sont à même d'expliquer, au moins en partie, les dérégulations transcriptionnelles notées ci-dessus.

#### 2.4.7. Bilan

La physiopathologie de la DMD à l'échelle cellulaire et moléculaire est démesurément complexe. Alors que le muscle sain possède de formidables capacités de régénération après un dommage, l'absence de dystrophine entraîne un stress chronique du tissu musculaire chez les patients. Celui-ci fait intervenir différents processus (fibrotique, inflammatoire, oxydatif, *etc.*) résultant plus ou moins directement de l'absence de la dystrophine ou du DAPC, et qui peuvent débiter avant même l'apparition des premiers signes cliniques. Plus que la simple hypothèse de "rupture mécanique", c'est un ensemble de voies de signalisation qui se retrouvent dérégulées, aboutissant à une rupture de l'homéostasie à l'échelle cellulaire et tissulaire. Une étude récente suggère qu'au sein du microenvironnement tissulaire des muscles, la coexistence de signaux moléculaires asynchrones provenant de cellules engagées dans des stades différents du processus de régénération serait à même de bloquer la régénération musculaire ([Dadgar 2014](#)). Au sein des muscles déficients en dystrophine, la focalisation des épisodes nécrotiques aboutit à une telle

situation, et serait susceptible d'expliquer en partie les défauts de régénération observés.

## 2.5. Pharmacologie de la DMD

Depuis l'adoption de la souris mdx et la caractérisation de plus en plus poussée de la physiopathologie de la DMD, les études pharmacologiques se sont multipliées ([Fairclough 2012](#)) et la liste ne cesse de s'allonger ([Kornegay 2014](#)). Les nombreux composés ciblent différentes facettes de la physiopathologie de la DMD. Pour plus de clarté, le **Tableau 3** liste les classes fonctionnelles principales de molécules déjà évaluées chez la souris mdx, et donne pour chacune quelques exemples.

Il demeure difficile de comparer l'efficacité thérapeutique de ces molécules, compte-tenu de la variabilité entre les études en termes de nombre d'animaux utilisés, de dosage, de voie d'administration et de durée de traitement. De plus, les paramètres physiopathologiques mesurés pour évaluer l'efficacité des traitements sont également différents d'une étude à l'autre, et les méthodes ne sont pas standardisées. C'est d'ailleurs l'un des points qu'a soulevé le réseau d'excellence *TREAT-NMD* dans son rapport de 2012, où il tente d'améliorer la translation des études pré-cliniques menées chez les souris mdx ([Willman 2012](#)). En effet, les molécules testées jusqu'à présent chez les patients DMD ont apporté des résultats cliniques généralement plus mitigés que ceux obtenus chez leurs homologues murins. Outre la variabilité inhérente aux différences inter-espèces ([Partridge 2013](#)), l'absence de standardisation des procédures chez la souris mdx pourrait peut-être également expliquer cette absence de reproductibilité.

Toutefois, au regard des études mentionnées dans le **Tableau 3** et avec les réserves évoquées ci-dessus, aucune molécule ne semble réellement surclasser ses concurrentes. Néanmoins, certaines ont récemment fait l'objet d'essais cliniques plus ou moins avancés, et ont parfois apporté des résultats encourageants. C'est le cas de l'idébénone, connue pour inhiber la peroxydation des lipides et améliorer la fonction respiratoire mitochondriale, qui a été administrée à des patients DMD lors d'un essai de phase III et permis une amélioration notable des capacités respiratoires ([Buyse 2015](#)). Cependant, la nécessité d'utiliser ces composés à long terme soulève certaines questions, notamment en termes d'économie médicale, de contraintes logistiques pour les patients et surtout d'effets secondaires indésirables. Les études

toxicologiques à long terme sont pourtant rarement effectuées en recherche pré-clinique, du fait de leur coût et de la compétition scientifique internationale.

Face à ces différents arguments, il apparaît donc nécessaire de développer et d'optimiser des approches thérapeutiques novatrices pour la DMD, plus efficaces et mieux tolérées sur le long terme.

Références associées au **Tableau 3** : [Welch 2007](#), [Gazzerro 2010](#), [Anderson 1996](#), [Ermolova 2014](#), [Hodgetts 2006](#), [Cohn 2007](#), [Morales 2013](#), [Turgeman 2008](#), [Huang 2009](#), [Buyse 2009](#), [Whitehead 2008](#), [Nakae 2008](#), [Minetti 2006](#), [Consalvi 2013](#), [Adamo 2010](#), [Vianello 2014](#), [Uaesoontrachoon 2014](#).

Tableau 3 : Quelques classes fonctionnelles de composés pharmacologiques testés lors d'études pré-cliniques chez la souris mdx.				
Identité de la drogue	Rôle moléculaire	bénéfice structural	bénéfice fonctionnel	Clinique
<b>Absence de Dystrophine</b>				
Ataluren	dé-sensibilisateur ribosomal	Oui (perméabilité membranaire)	Oui (test de force)	Essai phase Ib
Bortezomib	inhibiteurs du protéasome	Oui (perméabilité, inflammation, fibrose)	?	Non
<b>Inflammation / Immunité</b>				
Prednisolone / Deltazacort	glucocorticoïde / anti-inflammatoire ?	Oui	Oui	Oui
Infliximab	anticorps anti-TNF- $\alpha$	Résultats contrastés	Oui (test de force)	Non
Etanercept	mimétique du récepteur au TNF- $\alpha$	Oui (nécrose, perméabilité, centronucléation)	Oui	Non
<b>Fibrose</b>				
Losartan	Antagoniste du récepteur à l'angiotensine II	Oui (fibrose, régénération)	Oui (test de force, grip test)	Oui
Enalapril	Inhibiteur de l'enzyme de conversion Ang I - Ang II	Oui (fibrose)	Oui (test de force)	Oui
Halofuginone	Inhibiteur de la phosphorylation de Smad3	Oui (fibrose, centronucléation)	Oui (coordination motrice, équilibre)	Essai Phase VII
Imatinib	Inhibiteur de Tyrosine-kinases (e.g. PDGF-R)	Oui (nécrose, inflammation, fibrose)	Oui (grip test)	Non
<b>Stress oxydatif</b>				
Idebenone	Antioxydant membranaire (sarcolemme, mitochondries)	Oui (fibrose cardiaque)	Oui (fonction cardiaque + test d'effort)	Essai phase III
N-acetylcystéine	Précurseur de glutathion réduit (GSH)	Oui (centronucléation, ROS, inflammation)	Oui (test de force sur muscle isolé)	Non
Epigallocatechine gallate	Polyphénol	Oui (nécrose, fibro-adipose)	Oui (test de force sur muscle isolé)	Essai Phase VII
<b>Dérégulation épigénétique</b>				
Trichostatine A	Inhibiteur d'Histone Desacétylase (HDAC)	Oui (inflammation, fibrose nécrose)	Oui (test d'effort)	Non
Entinostat	Inhibiteur d'HDAC	Oui (inflammation, fibrose nécrose)	Oui (test d'effort)	Non
Givinostat	Inhibiteur d'HDAC	Oui (fibrose, adipose, inflammation, perméab.)	Oui (test d'effort)	Essai Phase II
<b>Ischémie / absence de nNOS</b>				
Sildenafil	Inhibiteur de Phosphodiesterase 5	Oui (inflammation, fibrose)	Oui (fonctions cardiaques)	Non
Butyrate d'arginine	donneur de NO + inhibiteur d'HDAC	Oui (fibrose cardiaque)	Oui (grip test, conductibilité cardiaque)	Non
Naproxénol	inhibiteur de cyclophosphine + donneur de NO	Oui (inflammation, fibrose)	Oui (fonctions cardiaques + grip test)	Essai en préparation

## **3. La thérapie génique de la DMD**

À l'issue de la partie précédente, nous avons constaté que les solutions pharmacologiques ne permettaient qu'une prise en charge symptomatique de la DMD, même si elles améliorent indéniablement les conditions de vie des patients. Face à ce « vide curatif », la thérapie génique s'est peu à peu imposée comme une alternative prometteuse. À ce jour, plus de 2000 essais cliniques de thérapie génique ont été approuvés dans le monde, ciblant principalement les cancers (environ 65 % [Gene Therapy Clinical Trials Worldwide](#)). Les maladies monogéniques ne représentent pour le moment qu'à peine 10 % des essais, mais les succès de ces dernières années ont fait gagner en crédibilité à cette technique novatrice de médecine moléculaire. En effet, la thérapie génique a apporté des preuves irréfutables d'efficacité thérapeutique chez des patients atteints d'immunodéficiences sévères ([Hacein-Bey-Abina 2014](#)), d'hémophilie B ([Nathwani 2014](#)) ou encore de rétinites pigmentaires ([Bennett 2012](#)). Avec la mise sur le marché du Glybera<sup>®</sup>, premier médicament de thérapie génique autorisé en Europe pour la déficience en lipoprotéine lipase (LPLD, [Bryant 2013](#)), la thérapie génique entre aujourd'hui dans une nouvelle ère ([Ylä-Herttuala 2012](#)). Même si les récents succès cliniques font l'unanimité, il s'agit aujourd'hui d'évaluer la bio-sécurité et l'efficacité de ces médicaments innovants mais peu connus, afin d'améliorer la balance bénéfices / risques pour les futurs patients ([Bryant 2013](#)).

Après un développement rapide des concepts de base de cette approche innovante, nous nous focaliserons sur les vecteurs viraux Adéno-Associés recombinants (AAV<sub>r</sub>) et leur utilisation pré-clinique dans les modèles animaux de la DMD.

### **3.1. Bases conceptuelles et types de vecteurs utilisés**

#### **3.1.1. Rationnel et définitions**

Par définition, la thérapie génique désigne le transfert d'un acide nucléique exogène dans des cellules d'intérêt à des fins thérapeutiques. Elle a pour but de pallier à un défaut d'expression génique en modifiant de manière transitoire ou permanente le profil génomique (transfert d'ADN) ou transcriptomique (transfert d'ARN) des cellules cibles. Nous allons distinguer trois types d'actions potentiellement réalisables par les acides nucléiques transférés, chacune

applicable (et appliquée) à la dystrophie musculaire de Duchenne.

#### **a. Thérapie génique de substitution**

Dans le cas d'une maladie monogénique où la mutation entraîne une inactivation de l'expression d'un gène donné, la stratégie la plus évidente consiste à apporter directement une copie fonctionnelle de ce gène, la plupart du temps sous la forme d'un ADNc. En fonction de la taille de cet ADNc, des adaptations seront parfois nécessaires afin de pouvoir utiliser un type de vecteur plutôt qu'un autre. Dans le cas de la DMD où le transcrit est long de 14 kb, différentes stratégies peuvent être employées, parmi lesquelles une miniaturisation de l'ADNc et la construction de « mini-dystrophines » ou « micro-dystrophines » ([Wang 2000](#), [Harper 2002](#)) ou le découpage de l'ADNc en plusieurs fragments ré-assemblés *in vivo* après recombinaison ou épissage ([Lostal 2014](#)) (**partie 3.3.3.b**).

#### **b. Thérapie génique de compensation**

Il arrive que l'étiologie précise d'une maladie monogénique entraîne des dérégulations secondaires de l'expression de certains gènes. Ces dérégulations peuvent être corrigées par une thérapie génique de compensation en transférant un gène différent du gène muté, mais dont l'expression aura un effet bénéfique sur le phénotype. Dans le cas de la DMD, la surexpression de l'utrophine, protéine analogue de la dystrophine connue pour son rôle compensatoire chez la souris mdx ([Tinsley 1998](#)) a déjà été envisagée ([Odom 2008](#)). De la même manière, l'apport de la follistatine, qui favorise la croissance et la différenciation musculaire en bloquant l'action de la myostatine, a montré des effets intéressants chez la souris mdx et les patients BMD ([Haidet 2008](#), [Mendell 2015](#)). Il en va de même pour la protéine nNOS dont l'expression diminue en l'absence de dystrophine, et dont l'apport par thérapie génique améliore les phénotypes cardiaques chez des souris mdx âgées ([Lai 2014](#)).

#### **c. Thérapie génique de correction**

Enfin, une correction *in situ* des acides nucléiques mutés peut permettre de rétablir une séquence codante fonctionnelle. La thérapie génique de la DMD est ici un exemple de choix, puisque l'une des stratégies principales consiste à effectuer un saut d'exon, c'est à dire à modifier l'épissage de l'ARNm *DMD* afin de rétablir un cadre ouvert de lecture ([Fairclough 2013](#), **partie 3.1.2**). Ceci aboutit à une situation théoriquement similaire à celle rencontrée chez un patient atteint de BMD, avec une dystrophine plus courte mais fonctionnelle. De plus, la

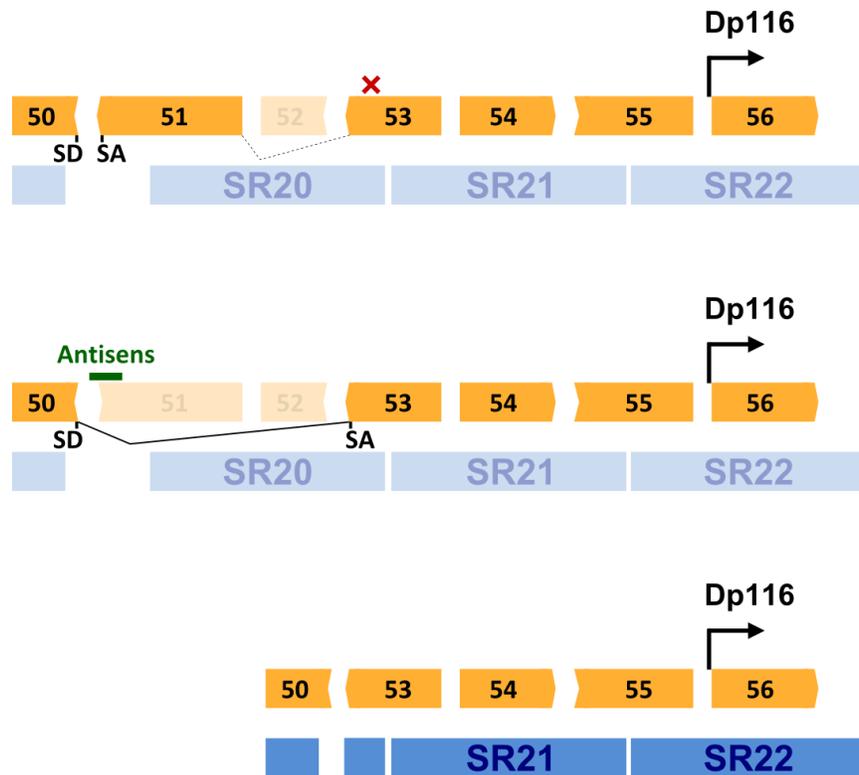
thérapie génique de correction peut également s'effectuer directement sur l'ADN, au moyen de différentes nucléases permettant l'édition du génome de cellules d'intérêt. Le transfert de l'ADN codant pour l'une de ces nucléases dans les muscles déficients en dystrophine pourrait ainsi permettre de supprimer la mutation sur le gène *DMD* au sein des noyaux musculaires. Plusieurs études récentes menées sur des cellules de patients ont amené la preuve de concept de la faisabilité d'une telle approche par l'utilisation de *Zinc Finger Nucleases* (ZFN) ou du système CRISPR ([Ousterout 2015a, b](#)).

### 3.1.2. La thérapie génique non-virale

La stratégie de thérapie génique la plus intuitive consiste à utiliser simplement l'ADNc fonctionnel du gène muté comme un médicament à injecter dans les cellules cibles. Malheureusement, ce type d'approche se solde souvent par une faible efficacité de transfert. Ainsi, l'injection intramusculaire (IM) d'un plasmide exprimant l'ADNc *DMD* chez la souris mdx aboutit à environ 1 % de fibres positives ([Acsadi 1991](#)). Chez les patients DMD ou BMD, ce même type d'approche permet d'obtenir 2 à 6 % de fibres complètement positives pour la protéine ([Romero 2004](#)). Même si des améliorations peuvent permettre d'augmenter sensiblement le pourcentage de transduction (par exemple l'utilisation de co-polymères amphiphiles, [Richard 2005](#)), la stabilité d'expression à long terme et le potentiel immunogénique de ces composés restent peu documentés.

Dans le cadre de la DMD, la thérapie génique non-virale est en revanche largement employée pour des stratégies visant à corriger l'ARNm *DMD* muté. Ces méthodes s'appuient sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens (OA) modifiés chimiquement pour augmenter leur stabilité et leur efficacité. Ces OA s'hybrident à l'ARNm *DMD* et empêchent l'inclusion d'un ou plusieurs exons à proximité de la mutation. Cette technique dite du « saut d'exon » permet de restaurer un cadre ouvert de lecture, générant une protéine dystrophine raccourcie mais fonctionnelle (**Figure 15**). Deux produits induisant chacun le saut de l'exon 51 mais basés sur différentes modifications chimiques du squelette phosphodiester de l'OA ont été récemment testés en clinique chez des patients DMD par injection systémique : le Drisapersen<sup>®</sup> (PRO-051, [Goemans 2011](#), [Voit 2014](#)) et l'Eteplirsén<sup>®</sup> (AVI-4658, [Cirak 2011](#), [Mendell 2013](#)). Malgré le développement d'une protéinurie chez certains patients (signe d'une potentielle toxicité rénale),

l'administration de Drisapersen<sup>®</sup> a permis d'observer une restauration de l'expression de la dystrophine dans une majorité de fibres musculaires ([Goemans 2011](#)). En revanche un essai clinique de phase III mené sur plus de 300 patients suivis pendant près d'un an n'a pas entraîné d'amélioration significative, potentiellement à cause de cohortes initiales trop hétérogènes (notamment en termes d'âge). Un autre essai de phase IIb mené en parallèle à partir de groupes de patients plus homogènes s'est toutefois révélé plus prometteur ([Voit 2014](#)).



**Figure 15** : Mécanisme d'action d'un OA optimisé pour le saut de l'exon 51 du gène *DMD* (Drisapersen<sup>®</sup> ou Eteplirsen<sup>®</sup> par exemple). a) Situation rencontrée chez un patient avec une délétion de l'exon 52, provoquant une rupture du cadre de lecture par accolement des exons 51 et 53. L'ARNm muté est rapidement dégradé par des mécanismes détaillés dans la **partie 4.2.5**. b) L'antisens vient masquer des séquences activatrices de l'épissage au niveau de l'exon 51, provoquant finalement une réaction d'épissage entre le site donneur (SD) de l'intron 50 et le site accepteur (SA) de l'intron 52, et donc le saut de l'exon 51. c) L'ARNm après saut d'exon est en phase par accolement des exons 50 et 53. La traduction de cet ARNm aboutit à une protéine dystrophine plus courte, mais fonctionnelle.

L'Eteplirsen<sup>®</sup> n'a pas connu ces difficultés, et la dernière étude en date démontre un bénéfice thérapeutique significatif après 48 semaines de traitement par voie intraveineuse (IV) chez un petit nombre de patients ([Mendell 2013](#)). Une étude visant à tester son efficacité à plus

long terme et sur un plus grand nombre de patients est actuellement en cours, et sera potentiellement suivie d'une demande de mise sur le marché auprès des agences réglementaires.

Enfin, signalons l'émergence récente d'une nouvelle chimie apparemment plus efficace que celles du Drisapersen<sup>®</sup> et de l'Eteplirsén<sup>®</sup> : les tricyclo-ADN ([Goyenvalle 2015](#)). De par leur faculté à former spontanément des nanoparticules et leur plus forte affinité pour l'ARN, ces oligonucléotides semblent avoir un pouvoir correctif plus important sur le messager de la dystrophine (à quantités de matières équivalentes). De plus, 20 semaines de traitement chez la souris *mdx/utr<sup>-/-</sup>* ont permis d'observer des améliorations structurales et fonctionnelles majeures. Leur efficacité thérapeutique chez des patients DMD reste désormais à démontrer.

### 3.1.3. Les vecteurs viraux de thérapie génique

Les virus sont des agents biologiques capables naturellement d'infecter des cellules spécifiques et d'y délivrer leur matériel génétique. Il est donc tout naturel que les scientifiques se soient rapidement tournés vers eux dans une optique de transfert de gène à visée thérapeutique. En fonction de l'application et de la nature des cellules cibles, des virus tels que les rétro/lentivirus, les adénovirus ou encore le virus *Herpes Simplex* ont pu être modifiés par génie génétique et utilisés dans plusieurs essais cliniques. Le terme « transduction » désignera par la suite l'aptitude de ces vecteurs recombinants à pénétrer dans les cellules cibles et à y délivrer le transgène qu'ils véhiculent.

#### a. Thérapie génique *ex vivo* et vecteurs rétro/lentiviraux

Le premier franc succès de thérapie génique virale concerne probablement l'essai thérapeutique destiné à traiter l'immunodéficience combinée sévère liée à l'X (X-SCID) débuté vers la fin des années 1990. Pour ce faire, les chercheurs ont employé une approche par thérapie génique dite *ex vivo*. Après ponction de cellules souches hématopoïétiques et apport du gène thérapeutique par un vecteur rétroviral dérivé du *Moloney Murine Leukemia Virus* (MMLV), ces cellules transformées ont été réinjectées aux patients ([Hacein-Bey-Abina 2002](#)). L'avantage sélectif conféré par le transfert de gène leur a permis de recoloniser et reconstruire le système immunitaire des patients. Peu de temps après injection, les médecins ont toutefois noté l'apparition de leucémies chez certains d'entre eux, dues à la transactivation de proto-oncogènes après insertion non-aléatoire du provirus dans le génome cellulaire ([Hacein-Bey-Abina 2003](#)).

Par la suite, les vecteurs rétroviraux ont été optimisés afin de limiter ces trans-activations, et d'autres patients ont pu être traités efficacement ([Hacein-Bey-Abina 2014](#)).

Concernant la DMD, l'utilisation d'un rétrovirus ne semble *a priori* pas la plus pertinente compte tenu de la nature post-mitotique du muscle squelettique. En l'absence de dystrophine cependant, le muscle n'est plus totalement post-mitotique étant donné les cycles successifs de nécrose et régénération qui s'opèrent chez la souris mdx comme chez les patients DMD. Suivant cette hypothèse, une équipe a créé un vecteur dérivé du MMLV pour qu'il exprime une mini-dystrophine et l'a injecté par voie IM chez des souris mdx ([Dunckley 1993](#)). Même si certaines cellules satellites ont apparemment pu être transduites, le pourcentage de fibres positives obtenu n'a jamais excédé 10 %, même après accentuation des dommages musculaires. Une autre étude utilisant un lentivirus dérivé du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) a permis d'augmenter considérablement cette efficacité chez des souris mdx4Cv, mais en se basant sur un protocole d'injection néonatal à deux jours d'âge, lorsque le muscle squelettique est en plein développement ([Kimura 2010](#)). Enfin, la thérapie génique *ex vivo* combinée à la thérapie cellulaire utilisant des progéniteurs musculaires pourrait également être une option intéressante. Une équipe a ainsi transduit une population de progéniteurs issus de patients DMD avec un vecteur lentiviral permettant un saut d'exon. L'implantation des cellules transduites chez des souris mdx immunodéficientes a permis d'améliorer partiellement la structure et la fonction musculaire ([Benchaouir 2007](#)). Ce type d'approche est toutefois davantage à classer dans la catégorie des thérapies cellulaires. Au vu de ces différentes études, les vecteurs rétro/lentiviraux semblent donc relativement inefficaces pour délivrer et exprimer un transgène au sein des cellules musculaires post-mitotiques.

## **b. Les promesses des vecteurs adénoviraux**

Par opposition, les vecteurs issus de l'adénovirus sont capables de transduire efficacement les cellules musculaires ([Quantin 1992](#)). De plus, leur génome présente la particularité de rester à l'état d'épisomes et ne présente donc *a priori* pas les risques liés à l'intégration dans le génome cellulaire hôte ([Ehrhardt 2003](#)). Ils ont donc rapidement attiré l'attention, notamment dans le cadre de la DMD. Plusieurs études ont ainsi montré que l'injection d'un vecteur adénoviral exprimant une mini-dystrophine pendant les 10 premiers jours de vie d'une souris mdx permettait une transduction de 6 à 64% des fibres musculaires ([Ragot 1993](#)). Cependant, le traitement de souris adultes ne présentait pas la même efficacité

([Vincent 1993](#)). De plus, une réaction immunitaire potentiellement dirigée contre la capsid adénovirale a parfois été observée, et pourrait expliquer la diminution au cours du temps du nombre de fibres musculaires corrigées ([Acsadi 1996](#)). Cette immunotoxicité est par ailleurs l'inconvénient majeur des vecteurs adénoviraux et a entraîné l'arrêt prématuré d'un essai clinique visant à traiter des patients atteints de déficience en ornithine transcarbamylase. Suite à l'injection du vecteur thérapeutique, l'un des patients a rapidement montré des signes d'une sur-activation du système immunitaire inné, provoquant brutalement son décès par défaillance multiviscérale ([Raper 2003](#)). Ainsi, même s'ils restent intéressants pour leur efficacité de transduction et leur persistance *in situ*, les vecteurs adénoviraux présentent un profil immunologique risqué et susceptible de faire pencher du mauvais côté la balance bénéfices / risques pour les patients. Dans le cadre de la DMD, les efforts se sont alors tournés vers des vecteurs plus sécuritaires et caractérisés plus récemment : les vecteurs dérivés du virus AAV.

## 3.2. Essor des vecteurs AAV recombinants

### 3.2.1. Le virus AAV sauvage

Avec l'avènement du microscope électronique dans les années 1960, les scientifiques ont pu examiner de près l'ultrastructure cellulaire, ainsi que les suspensions de virus obtenues à partir de lysats de cellules infectées. C'est ainsi qu'ils ont pu noter la présence d'un virus « satellite », de taille réduite (26 nm) et incapable de se répliquer seul, dans des préparations d'adénovirus ([Melnick 1965](#)) ou de *Simian Virus* SV15 ([Atchison 1965](#)). D'abord considéré comme un contaminant ou une sous-unité dérivée de l'adénovirus, le nouvel *Adeno-Associated Virus* (AAV) a ensuite été identifié comme un membre de la famille des *Parvoviridae*. Bien que retrouvé dans une large proportion de la population humaine, ce virus non autonome n'est apparemment pas associé à une quelconque pathogénicité ([Blacklow 1967](#)). La structure et la séquence du génome de l'AAV ont été déterminées quelques années plus tard ([Berns 1970](#), [Srivastava 1983](#)) : il s'agit d'une molécule d'ADN simple brin d'environ 4,7 kb, contenant deux segments codants majeurs : *Rep* et *Cap*, dédiées à la répllication et à l'encapsidation du génome viral. Deux autres protéines ont été caractérisées plus récemment à partir du génome de l'AAV comme participant à l'encapsidation (*assembly-activated protein*, AAP, [Sonntag 2010](#)) ou à la

réplication du virus (gène X, [Cao 2014](#)). Ce génome est encadré par deux répétitions terminales inversées (*Inverted Terminal Repeats*, ou ITR) multi-palindromiques, servant notamment d'origine de réplication et de signal d'encapsidation (**Figure 16**).

Suite au clonage du génome de l'AAV, plusieurs équipes ont essayé de transformer ce virus en outil de transfert de gène. Notamment, deux équipes ont simultanément publié des résultats obtenus après transduction de lignées cellulaires par des AAV modifiés codant pour la néomycine ([Hermonat 1984](#)) ou pour l'acétyltransférase du chloramphénicol ([Tratschin 1984](#)). Ces AAV, produits en remplaçant une partie du génome viral par le transgène d'intérêt et en apportant les fonctions nécessaires à l'encapsidation en *trans*, permirent une expression de ce transgène dans 1 à 10 % des cellules en culture. Les vecteurs AAV recombinants (AAVr) étaient nés, et leur potentiel pour la thérapie génique des maladies génétiques s'imposa naturellement face aux limites rencontrées avec les autres catégories de vecteurs ([Flotte 2013](#)). Les méthodes de production des vecteurs AAVr en cellules mammifères (*human embryonic kidney*, HEK293 dans la plupart des cas) font appel à une double transfection avec le plasmide portant le transgène d'intérêt et le plasmide portant les fonctions nécessaires à la formation des particules recombinantes (**Figure 17**).

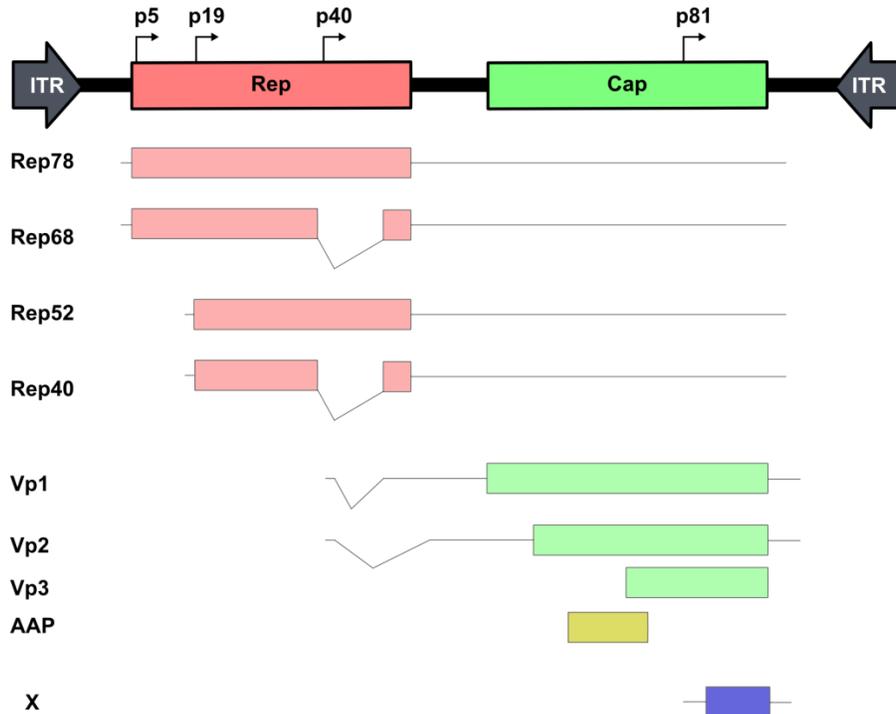
### 3.2.2. Les caractéristiques générales des vecteurs AAVr

Ces vingt-cinq dernières années, les nombreuses études visant à étudier la biologie des vecteurs AAVr ont permis de préciser certaines de leurs caractéristiques, confirmant et étendant leur potentiel pour un grand nombre de maladies monogéniques :

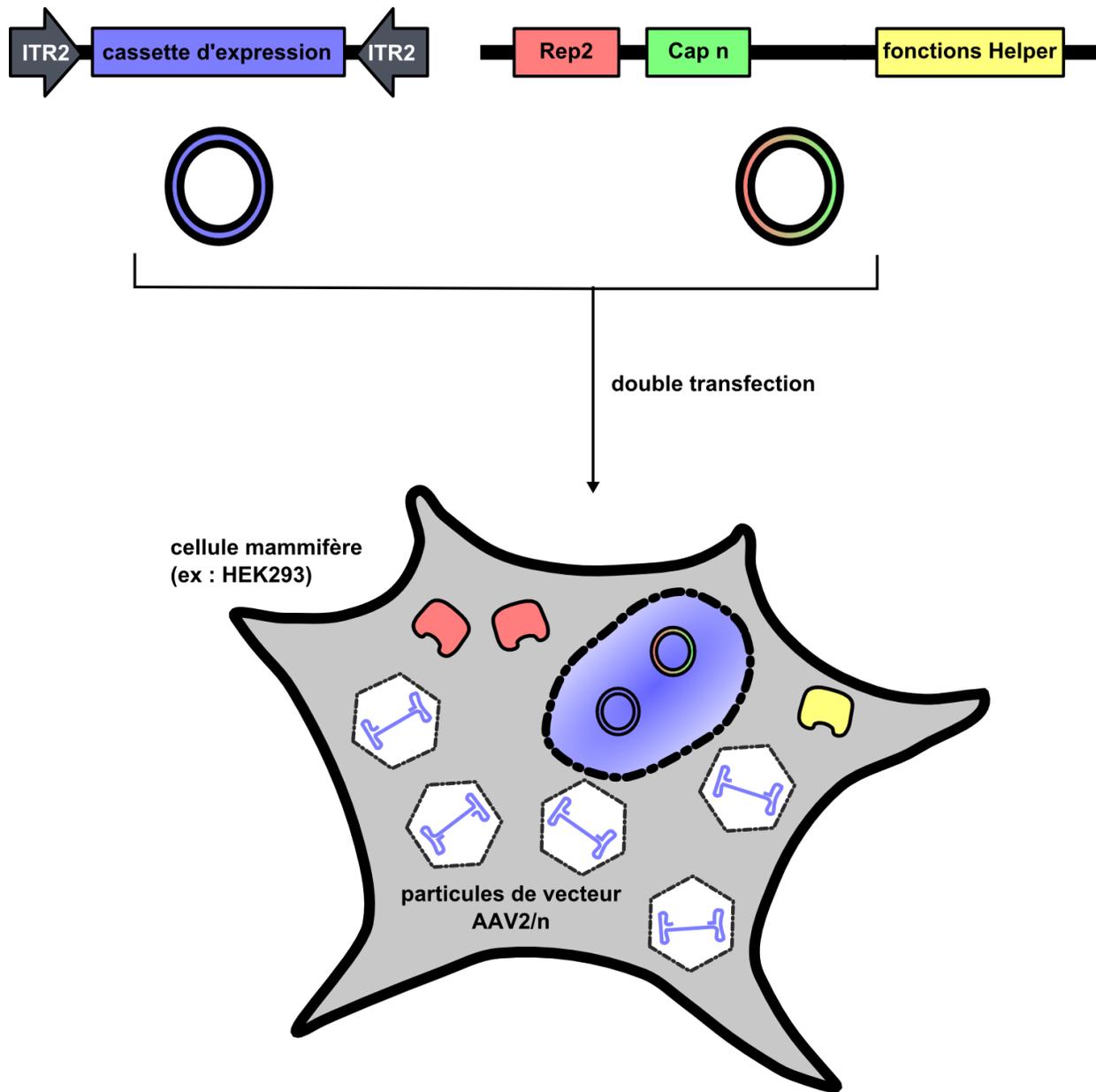
#### a. Tropisme étendu grâce à l'existence de différents sérotypes

Il existe plusieurs variants naturels du cadre ouvert de lecture *Cap*, aboutissant à plusieurs versions des protéines de capsid et donc plusieurs sérotypes pour le virus AAV. Chaque sérotype de capsid interagit avec des récepteurs et co-récepteurs différents à la surface des cellules cibles, ce qui leur confère un profil de transduction plus ou moins spécifique (tropisme). De manière intéressante, chacun de ces variants est capable d'encapsider un génome recombinant formé à partir des ITR de l'AAV2 et contenant un transgène d'intérêt, et peut donc être utilisé pour produire des vecteurs avec un tropisme souhaité (AAVr2/n pour le sérotype n, **Figure 17**, [Rabinowitz 2002](#)). Une étude comparative publiée en 2008 a permis de détailler le

profil de biodistribution des sérotypes 1 à 9 de vecteurs AAVr après injection IV chez la souris ([Zincarelli 2008](#), **Figure 18**, **Tableau 5**). Cette étude et de nombreuses autres publiées à la même période ont mis en évidence l'efficacité avec laquelle certains sérotypes d'AAV étaient capables de transduire des tissus pertinents pour la thérapie génique. Concernant les applications potentielles pour les dystrophies, les sérotypes les plus efficaces pour transduire les muscles squelettiques semblent être les AAV1, 6, 8 et 9 ([Gregorevic 2004](#), [Wang 2005](#)), alors que l'AAV9 apparaît le plus efficace pour cibler le cœur, au moins chez le rongeur ([Inagaki 2006](#), [Zincarelli 2008](#)). D'autres paramètres ont toutefois également une influence importante sur l'efficacité de transduction, notamment la dose injectée, la voie d'administration ou encore le promoteur utilisé. Plus de détails seront donnés dans la **partie 3.3**.



**Figure 16** : Schéma représentatif du génome de l'AAV. Entre les deux ITR, les unités codantes *Rep* et *Cap* codent respectivement pour les protéines servant à la réplication et à la formation de la capsid. Rep78 et Rep 68 sont générées par le promoteur p5 puis épissage alternatif, tandis que Rep52 et Rep40 le sont par le promoteur p19. Vp1, Vp2 et Vp3 sont générées à partir du promoteur p40, épissage alternatif et initiation alternative de la traduction. Ces trois protéines s'assemblent selon un ratio (Vp1:Vp2:Vp3) de 1:1:10 pour former la capsid virale. La protéine AAP est formée par initiation alternative de la traduction du transcrite *Cap*. Le gène X est situé en 3' du génome et potentiellement généré à partir du promoteur p81. Figure adaptée de [Grieger 2012](#) et [Dismuke 2013](#).



**Figure 17** : Principe de production de vecteurs AAV-2/n recombinants en cellules de mammifères. Les deux plasmides transfectés portent respectivement le transgène d'intérêt encadré des deux ITR de l'AAV2 et les gènes *Rep* de l'AAV2, *Cap* de l'AAV du sérotype désiré (n) ainsi que les fonctions *Helper* (adénovirales par exemple). Après double transfection, les cellules produisent de grandes quantités de particules de vecteurs AAVr2/n portant la cassette d'expression et la capside d'intérêt. Les particules seront ensuite récoltées environ 72h après transfection et purifiées selon différentes méthodes ([Ayuso 2010](#), [Ayuso 2014](#)).

**Tableau 4 : Tropisme des principaux sérotypes naturels d'AAV recombinants**

sérotipe	récepteur / co-récepteur	tropisme
AAV1	acide sialique N-lié / ?	muscles, cœur, SNC, rétine, poumons
AAV2	HSPG / FGFR1 ou HGFR ou LamR	tropisme étendu mais faible efficacité
AAV3	HSPG / FGFR1 ou HGFR ou LamR	hépatocarcinome cellulaire
AAV4	acide sialique O-lié / ?	rétine, poumons
AAV5	acide sialique N-lié / PDGFR	rétine, SNC, poumons
AAV6	acide sialique N-lié ou HSPG / EGFR	muscles, cœur, poumons
AAV7	? / ?	foie, rétine, muscles
AAV8	? / LamR	foie, rétine, muscles, SNC
AAV9	galactose N-lié / LamR	muscles, cœur, SNC
AAV.rh10	? / ?	SNC, poumons

HSPG : *heparan sulfate proteoglycan*

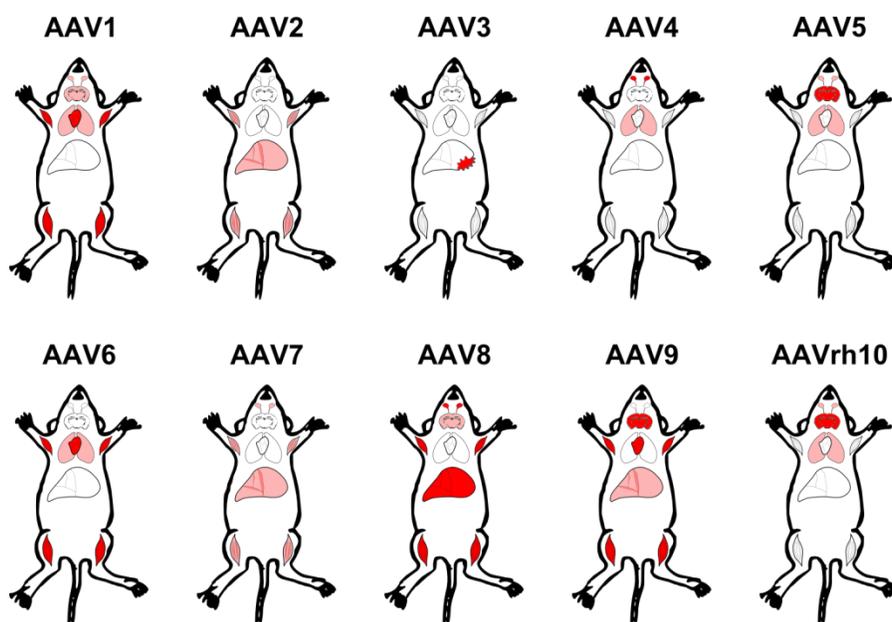
FGFR : *fibroblast growth factor receptor*

HGFR : *hepatocyte growth factor receptor*

LamR : *laminin receptor*

PDGFR : *platelet-derived growth factor receptor*

EGFR : *epidermal growth factor receptor*



**Figure 18 :** Tropisme des principaux sérotypes d'AAV recombinants. Les organes dans lesquels ces sérotypes sont principalement utilisés sont indiqués en rouge. Les organes supplémentaires qu'ils peuvent transduire efficacement sont indiqués en rose. La voie d'administration peut être différente d'un sérotipe à l'autre. En suivant l'axe antéro-postérieur, les différents organes représentés schématiquement sont : les 2 rétines / le système nerveux central (cerveau et moelle épinière) / les muscles des membres antérieurs / les voies respiratoires / le cœur / le foie (ou, dans le cas de l'AAV3, les carcinomes hépto-cellulaires) / les muscles des membres postérieurs. Références : [Zincarelli 2008](#), [Asokan 2012](#), [Nonnenmacher 2012](#).

## b. Biosécurité des vecteurs AAVr

À l'heure actuelle, les effets secondaires à l'injection de vecteurs AAVr sont sans comparaison avec ceux des vecteurs rétroviraux et adénoviraux. Concernant leur potentiel immunogénique, il est clairement établi qu'une réponse peut être montée contre des peptides dérivés de la capsid AAV ([Manno 2006](#)) ou de la protéine transgénique ([Mendell 2010](#)) pouvant dans certains cas aboutir à la destruction des cellules transduites. Néanmoins, cette réaction immunitaire a toujours pu être contenue (au moins jusqu'à aujourd'hui), et n'a jamais été accompagnée de symptômes majeurs tels que ceux décrits dans le cas de l'adénovirus.

Concernant leur potentiel tumorigénique, nous verrons dans le paragraphe suivant que les vecteurs AAVr sont principalement maintenus sous forme d'épisomes extra-chromosomiques, et ne s'intègrent que très rarement dans le génome cellulaire ([Nowrouzi 2012](#), [Kaepfel 2013](#)). Toutefois, une étude publiée en 2007 a rapporté l'apparition de tumeurs hépatiques après injection d'un AAVr chez des souris nouveaux-nés ([Donsante 2007](#)). Même si ces résultats restent controversés ([Li 2011](#)), une étude plus récente a été en mesure de les confirmer et a permis de relier l'apparition de ces tumeurs avec l'intégration du vecteur AAVr à proximité du locus murin *Rian* (*RNA-imprinted and accumulated in nucleus*) ([Chandler 2015](#)). Ce locus comprend un ensemble d'ARN non-codants dont la dérégulation pourrait être à l'origine de la tumorigénèse. Ceci indique que certaines conditions expérimentales et / ou certains phénotypes pathologiques peuvent révéler le potentiel tumorigénique des vecteurs AAVr, même si celui-ci n'a pour l'instant jamais été observé chez l'Homme.

## c. Persistance des génomes d'AAVr et expression à long terme du transgène

Les vecteurs AAVr présentent l'avantage majeur de pouvoir persister à long terme *in vivo*. Chez certains animaux, il est possible de détecter l'expression du transgène pendant plusieurs années après l'administration du vecteur. Cela a été vérifié chez différentes espèces et dans différents organes tels que le muscle squelettique ([Rivera 2005](#), [Toromanoff 2008](#)), le foie ([Nathwani 2011](#)) ou la rétine ([Stieger 2006](#)). *In situ*, l'expression durable du transgène se traduit par une persistance des génomes de vecteur (vg) dans le noyau des cellules transduites ([Nathwani 2011](#)). Dans la rétine, une précédente étude menée au laboratoire a même détecté des particules de vecteur intactes au sein de structures confinées à l'intérieur des cellules transduites plus de 6 ans après injection ([Stieger 2009](#)).

Les vecteurs AAVr apparaissent donc comme des agents très prometteurs pour la thérapie

génique *in vivo* dans des cellules post-mitotiques. Ils ont été utilisés avec succès lors d'essais cliniques pour différentes maladies monogéniques, notamment l'hémophilie de type B ([Nathwani 2014](#)) ou l'amaurose congénitale de Leber ([Bennett 2012](#)). Dans le cas de l'hémophilie, l'expression du transgène thérapeutique est toujours détectable plus de trois ans après une unique injection d'AAVr et a permis aux patients concernés de réduire considérablement l'usage de facteurs de coagulation recombinants ([Nathwani 2014](#)). Ainsi la persistance des vecteurs AAVr dans le noyau des cellules hôtes est l'une de leurs propriétés les plus attractives. Le paragraphe suivant vise à comprendre les mécanismes moléculaires de cette persistance et de l'expression à long terme du transgène.

### 3.2.3. Les étapes de la transduction des vecteurs AAVr

#### a. Internalisation et trafic cytoplasmique

Une fois injectés et au contact des tissus cibles, les vecteurs AAVr doivent encore franchir plusieurs barrières physiques et réaliser plusieurs étapes de leur « cycle cellulaire » avant d'établir une expression persistante du transgène qu'ils véhiculent. En premier lieu, les particules de vecteurs sont parfois séparées des cellules cibles par des tissus conjonctifs liquides ou interstitiels, par lesquels ils doivent transiter. Ces transitions peuvent avoir un impact non négligeable sur l'efficacité de transduction, en fonction de la composition de ces tissus. Ainsi, une injection IV met directement les vecteurs AAVr au contact du sang circulant et des nombreuses protéines qu'il comporte. Il est fort probable que certains facteurs circulants soient capables d'interagir avec les capsides d'AAVr et aient un impact positif ou négatif sur la transduction, comme cela a déjà été montré dans le cas du sérotype 6 ([Denard 2012, 2013](#)). De la même manière, les matrices extra-cellulaires interstitielles sont un point de passage obligatoire pour les vecteurs. Chez des souris ayant reçu un vecteur AAVr2/2 couplé à un fluorochrome par injection IM, la pénétration des vecteurs à l'intérieur des fibres semble être précédée d'une phase de plusieurs heures pendant laquelle les particules de vecteur diffusent au sein de l'endomysium entre les fibres musculaires ([Xiao 2012](#)). Une fois au niveau des cellules cibles, les vecteurs AAVr interagissent avec des récepteurs et des co-récepteurs membranaires différents en fonction du sérotype considéré, et récapitulés dans le **Tableau 4.** ([Nonnenmacher 2012](#)).

L'interaction des capsides avec ces différents récepteurs entraîne l'internalisation des

particules, un phénomène faisant intervenir des processus d'endocytose. Le détail des voies empruntées pour cette étape a été vivement débattu ces dernières années. Alors que les premières études semblaient impliquer des processus dépendant de la clathrine et de la cavéoline ([Duan 1999](#)), ou la macropinocytose ([Sanlioglu 2000](#)), un article paru en 2011 est allé à l'encontre de ces résultats. Selon les auteurs, les vecteurs AAVr emploieraient plutôt une voie alternative dépendant notamment du cholestérol membranaire et de l'actine, baptisée CLIC/GEEC (*clathrin-independent carriers / GPI-enriched endocytic compartment*) et notamment impliquée dans l'internalisation d'endotoxines bactériennes ou de protéines à ancre GPI ([Nonnenmacher 2011](#)). Toutefois, seuls des vecteurs AAVr2/2 ont été analysés dans cette étude, et il est fort probable que les mécanismes d'internalisation diffèrent dans le cas d'autres sérotypes et dans d'autres types cellulaires.

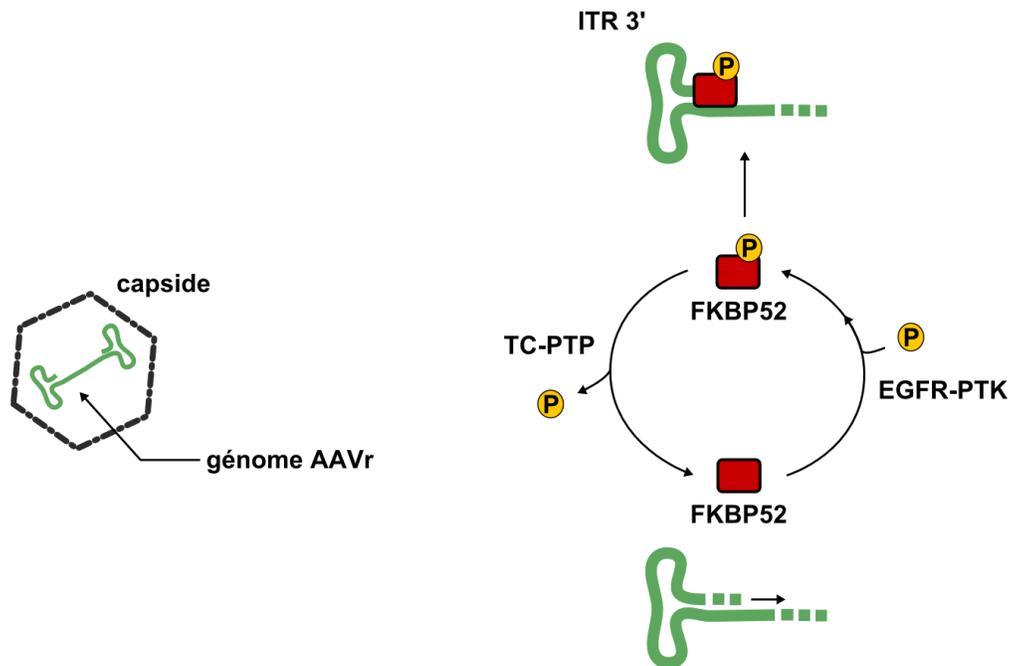
Les vésicules endocytées contenant les vecteurs voyagent ensuite de façon rétrograde à travers le système endomembranaire. Les mécanismes à l'œuvre ne sont pas encore tous précisés, et ont également nourri le débat durant ces dernières années. Des particules d'AAVr ont notamment été suspectées de transiter par les endosomes précoces, tardifs, ou de recyclage ([Douar 2001](#), [Ding 2006](#)). Une étude récente réalisée *in vitro* stipule que les vecteurs AAVr empruntent ici aussi une route alternative à celles déjà décrites, et dépendant de l'expression de la syntaxine-5, une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire vers l'appareil de Golgi ([Nonnenmacher 2015](#)). Quelles que soient les études, le passage par cet organite semble faire l'unanimité ([Bantel-Schaal 2002](#), [Pajusola 2002](#), [Nonnenmacher 2011](#)). Les concentrations importantes en ions  $Ca^{2+}$  au sein de cet organite seraient susceptibles d'activer l'activité phospholipase située dans le domaine N-terminal de la protéine de capsid VP1 ([Nonnenmacher 2015](#)). Ce domaine est initialement situé à l'intérieur de la capsid et n'est extériorisé que lors du passage des particules dans l'environnement acide des vésicules endosomales ([Sonntag 2006](#)). Son activation permet aux particules d'AAVr de sortir des vésicules endomembranaires en périphérie du noyau, où elles s'accumulent ([Sonntag 2006](#), [Stahnke 2011](#), [Nonnenmacher 2015](#)). Comme pour tout trafic vésiculaire, il semble que ce transport rétrograde dépende d'éléments du cytosquelette. En effet, une étude indique que dans des cellules HeLa, la destruction du réseau de microtubules par du nocodazole diminue l'accumulation péri-nucléaire des vecteurs AAVr et l'efficacité de transduction ([Xiao 2012](#)).

L'étape d'import nucléaire a elle aussi été longuement controversée. Toutefois, plusieurs

études ont pu localiser des capsides d'AAVr à l'intérieur du noyau ([Sanlioglu 2000](#), [Xiao 2012](#)), et même des particules capables de transduire de nouvelles cellules après récupération par fractionnement cellulaire ([Johnson 2009](#)). Ceci suggère qu'au moins une fraction des vecteurs AAVr intacts entrent dans les noyaux et y délivrent leur génome recombinant.

### b. Remaniements génomiques intranucléaires

Une fois l'ADN recombinant libéré de la capside, des événements complexes vont permettre la formation des formes génomiques persistantes à long terme dans le noyau des cellules cibles. En premier lieu, le génome de l'AAVr passe d'un état simple brin à un état double brin, soit par hybridation entre brins de polarité inverse, soit par synthèse directe grâce aux polymérase endogènes ([Nash 2007](#)). Cette étape est influencée *in vivo* par l'état de phosphorylation de la protéine de liaison au tacrolimus (*FK506-Binding Protein 52*) FKBP52 ([Qing 1997](#), [2001](#)), lequel dépend lui-même de l'activité d'une kinase et d'une phosphatase endogènes ([Mah 1998](#), [Qing 2003](#), **Figure 19**).



**Figure 19 :** Contrôle de la synthèse du second brin des vecteurs AAV recombinants par la protéine *FK506-binding protein* (FKBP52). Sous forme phosphorylée, FKBP52 se lie à l'ITR en 3' du génome de l'AAVr et inhibe la synthèse du second brin. La phosphorylation / déphosphorylation de FKBP52 font intervenir respectivement la kinase *epidermal growth factor receptor - protein tyrosine kinase* (EGFR-PTK) et la phosphatase *T cell - protein tyrosine phosphatase* (TC-PTP). Figure adaptée de [Zhao 2007](#).

Les monomères linéaires d'ADN double brin résultant de cette synthèse ne semblent pas être les formes majoritaires responsables de la persistance des vecteurs à long terme. Après injection IM chez des souris saines, plusieurs études ont montré que les génomes d'AAVr adoptent une configuration circulaire monomérique puis, à plus long terme, concatémérique de haut poids moléculaire ([Snyder 1997](#), [Vincent-Lacaze 1999](#), [Schnepp 2003](#)). Contrairement aux vecteurs rétroviraux, l'intégration du génome AAVr dans le génome des cellules hôtes semble être un phénomène minoritaire en comparaison avec la persistance extra-chromosomique ([Schnepp 2003](#)). La rareté des événements intégratifs (fréquences d'environ 1 génome recombinant pour 10000) a pu être confirmée chez le primate non humain et chez certains patients injectés ([Nowrouzi 2012](#), [Kaepfel 2013](#)). À ce jour, il semble donc accepté que les formes persistantes majoritaires des génomes AAVr dans les noyaux des tissus transduits sont des épisomes circularisés, sous forme de monomères ou de concatémères.

La formation de ces structures génomiques fait intervenir des mécanismes de recombinaison inter- et intra-moléculaires entre les génomes d'AAVr. Les protéines impliquées sont notamment celles intervenant dans la réponse aux dommages à l'ADN, que ce soit par recombinaison homologue ou par *non-homologous end joining* (NHEJ) ([Adachi 2011](#)). En effet, de par leur structure en épingle à cheveux, les ITR de l'AAV sont susceptibles d'être reconnues comme des dommages à l'ADN. C'est ce qu'ont suggéré plusieurs études en démontrant l'interaction entre ces ITR et différentes protéines recrutées en cas de dommages à l'ADN, notamment Ku86 et Rad52 ([Zentilin 2001](#)), *ataxia telangiectasia-mutated* (ATM, [Cataldi 2010, 2013](#)) ou le complexe Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN, [Cervelli 2008](#)). Le rôle de ces différents acteurs dans les processus de recombinaison génomique des vecteurs AAVr est difficile à évaluer car il dépend probablement de la nature du tissu ou des lignées cellulaires considérées.

Dans les tissus post-mitotiques comme le muscle squelettique murin différencié, et en l'absence de pathologie, la circularisation des génomes d'AAVr semble dépendre de mécanismes de réparation par recombinaison non-homologue de type NHEJ et de son acteur principal, la protéine *DNA-dependent protein kinase* (DNA-PK, [Song 2001](#)). L'effet de cette voie de réparation sur la concatémérisation est moins évident.

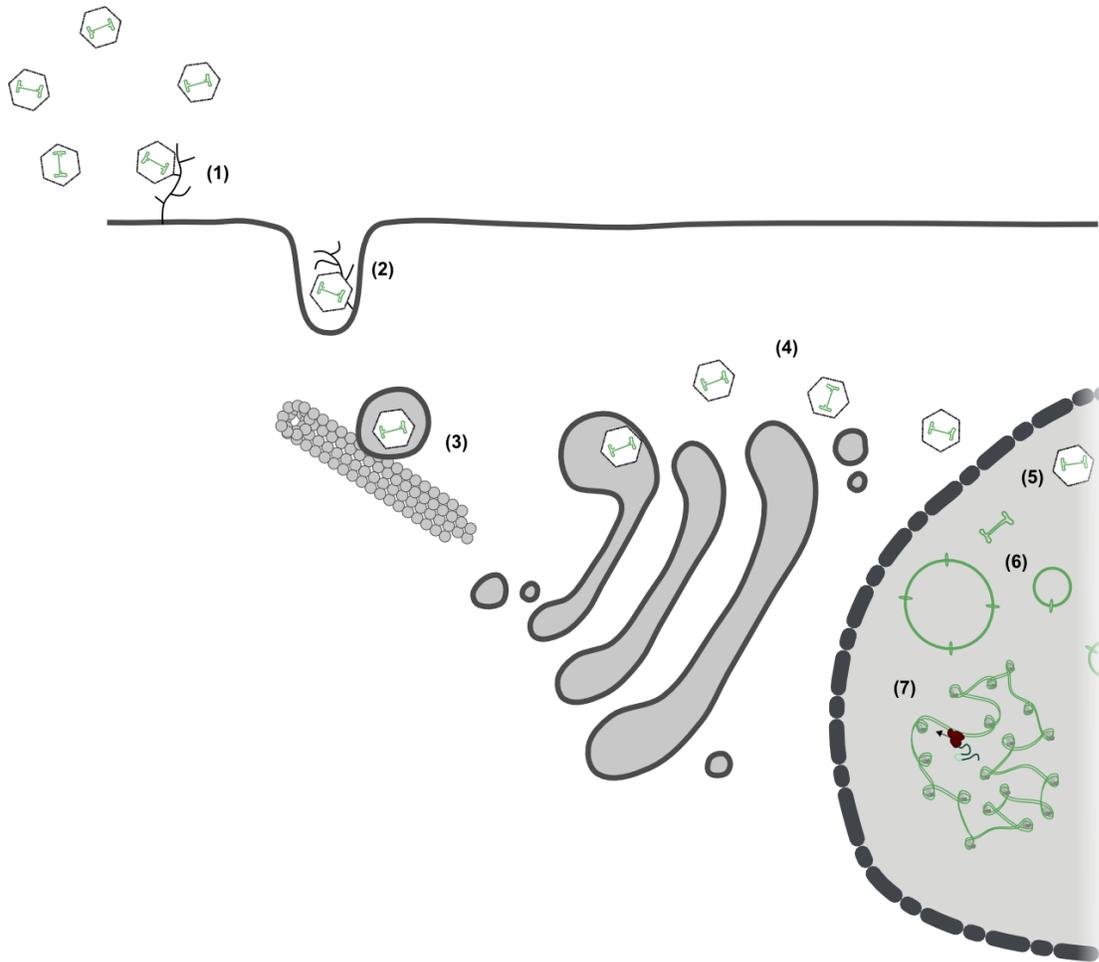
À l'inverse, la réparation de l'ADN par recombinaison homologue, principalement présente dans les tissus en prolifération, semble avoir un impact négatif sur l'efficacité de transduction. Une étude conduite chez la souris saine âgée de 2 à 3 semaines a montré que la

différentiation terminale des cardiomyocytes s'accompagne d'une diminution de l'expression des gènes du complexe MRN, impliqué dans la détection des cassures double-brin ([Lovric 2012](#)). Les auteurs ont corrélé cette diminution avec une nette augmentation de l'efficacité de transduction par un vecteur AAVr. De même, la protéine ATM recrutée au niveau des cassures par le complexe MRN semble aussi avoir un effet inhibiteur sur la transduction, potentiellement par des effets épigénétiques ([Cataldi 2010, 2013](#)). Dans ce cadre, une précédente étude menée au laboratoire avait démontré que dans le muscle de primate non humain, le génome des vecteurs AAVr s'associe avec des histones cellulaires et adopte une structure se rapprochant de celle de la chromatine endogène (**partie 4.1**, [Penaud-Budloo 2008](#)). Même si cette « chromatinisation » participe probablement à la stabilité des génomes dans les noyaux hôtes, elle engendre aussi la possibilité de régulations épigénétiques de l'expression du transgène (**partie 4.1.3**)

À l'issue de ce paragraphe, nous pouvons constater que de nombreuses études ont déjà cherché à détailler la vectorologie fondamentale des vecteurs AAVr (**Figure 20**). Toutefois, ces études sont généralement menées *in vitro* ou en l'absence de phénotype pathologique. Il demeure possible que les étapes décrites dans les paragraphes précédents se produisent différemment dans un tissu malade, notamment les muscles déficients en dystrophine. Ces aspects et leur impact potentiel sur les études précliniques menées dans des modèles animaux de la DMD seront détaillés dans la **Synthèse** de cette introduction.

### **3.3. Optimisation des vecteurs AAVr pour le ciblage du muscle**

La première difficulté se posant lors du traitement par thérapie génique du système musculaire réside dans l'étendue de la zone à traiter. Pour obtenir un bénéfice thérapeutique optimal, les vecteurs devront transduire avec le maximum d'efficacité environ 30 à 50 % de la masse corporelle répartie dans les muscles squelettiques des quatre membres, des ceintures, ainsi que le diaphragme et le myocarde. Ainsi, de nombreuses études ont travaillé à l'optimisation des voies d'administration des vecteurs, de leur spécificité et de l'efficacité d'expression du transgène dans ces différents muscles, et étudié l'impact de ces paramètres sur la réponse immunitaire.



**Figure 20** : Schéma simplifié des étapes de transduction d'une cellule par un vecteur AAVr. (1) : fixation aux récepteurs membranaires ; (2) : endocytose ; (3) : transport rétrograde via le réseau de microtubules ; (4) : passage par le système endomembranaire (notamment l'appareil de Golgi) et accumulation périnucléaire ; (5) : import nucléaire et décapsidation ; (6) : synthèse du second brin et recombinaison inter- et intra-moléculaire ; (7) : association avec histones cellulaires : formation des formes persistantes des génomes d'AAVr.

### 3.3.1. Différentes voies d'administration des vecteurs AAVr

La manière la plus directe d'atteindre un muscle donné consiste *a priori* à injecter les vecteurs AAVr directement dans le muscle cible (voie IM). Chez le primate non-humain, ce type d'injection aboutit à une transduction importante du muscle injecté, mais à une diffusion quasi-inexistante aux muscles voisins ([Toromanoff 2008](#)). Elle peut donc s'avérer intéressante pour des stratégies visant à utiliser le tissu musculaire comme site de fabrication d'un facteur

thérapeutique diffusible (facteur de coagulation, érythropoïétine, lipoprotéine lipase) ce qui est notamment le cas en clinique pour le Glybera<sup>®</sup> ([Gaudet 2013](#)). De plus, elle peut être utilisée pour l'établissement de preuves de concept, ou lors de phases précoces d'essais thérapeutiques, comme cela a été le cas pour la DMD ([Bowles 2012](#)). Néanmoins, elle paraît difficilement applicable à une approche systémique ciblant l'ensemble des muscles.

Afin d'obtenir une diffusion plus importante du vecteur, par exemple dans un membre entier, une voie dite « loco-régionale » (LR) par injection intraveineuse sous pression a été développée ([Su 2005](#)). Elle consiste en l'isolation du membre de la circulation systémique au moyen d'un garrot, puis en une injection du vecteur dans une veine périphérique entraînant son extravasation et une transduction plus homogène du membre injecté ([Toromanoff 2008](#)). Ce mode d'injection a notamment fait ses preuves chez le chien GRMD, lors d'une étude utilisant un vecteur AAVr2/8 entraînant un saut d'exon de l'ARNm *DMD* ([Le Guiner 2014](#)). En plus d'avoir un profil de diffusion plus étendu, la voie LR n'a manifestement pas le même impact immunitaire que la voie IM. Après injection IM, l'induction d'une réponse immune dirigée contre les cellules exprimant le transgène a été observée à plusieurs reprises, notamment lors de l'essai clinique mentionné ci-dessus ([Mendell 2010](#)). En revanche, une injection LR chez le primate non-humain ne semble pas entraîner de réponse cytotoxique ([Toromanoff 2010](#)) et pourrait même induire une immunomodulation ([Gernoux 2015](#), manuscrit en préparation).

Même si l'injection LR apparaît prometteuse et permettrait potentiellement d'apporter un bénéfice thérapeutique à un membre entier, la transduction homogène de l'ensemble des muscles de l'organisme n'est possible que par injection IV systémique. Cette approche a déjà été employée chez la souris mdx et le chien GRMD avec des vecteurs AAVr de sérotype 6, 8 et 9, les plus à même de transduire les muscles striés squelettiques et cardiaque par ce type d'injection ([Zincarelli 2008](#), **Figure 18**). Même si des résultats prometteurs ont été obtenus dans les modèles murins (voir par exemple [Gregorevic 2004](#), [2006](#), [2008](#)), les études publiées à ce jour utilisant des modèles canins n'ont été réalisées qu'à des stades foetaux ([Hayashita-Kinoh 2015](#)) ou néonataux ([Kornegay 2010](#)). Une étude est actuellement menée au laboratoire afin d'évaluer l'efficacité d'un vecteur AAVr2/8 exprimant une version optimisée de la micro-dystrophine, après injection IV chez des chiens GRMD juvéniles ([Le Guiner et al.](#), manuscrit en préparation). Elle devrait documenter le potentiel de cette voie d'injection pour une future application chez les patients DMD.

### 3.3.2. Création de sérotypes artificiels d'AAVr

Même si certains sérotypes d'AAV transduisent efficacement les muscles squelettiques et le coeur après injection IV, leur accumulation dans des organes périphériques tels que le foie, les reins ou les gonades est un inconvénient important ([Zincarelli 2008](#)). Outre la possibilité d'une détection par le système immunitaire, ceci peut entraîner une diminution importante de la quantité de vecteurs disponible pour la transduction des tissus cibles. Pour tenter de limiter cette accumulation « hors cible », des sérotypes artificiels d'AAVr ayant moins d'affinité pour ces organes périphériques ont été générés par différentes méthodes. Certains auteurs ont créé des sérotypes chimères mêlant les capsides d'AAV2 et 1 (AAVr2.5, [Bowles 2012](#)) ou d'AAV2 et 8 (AAVr2i8, [Asokan 2010](#)) par des approches rationnelles et des études comparatives de la structure des capsides de différents sérotypes. Ces capsides présentent des propriétés spécifiques comme une diminution de la transduction hépatique (AAV2i8) ou un échappement à la réponse immunitaire neutralisante (AAV2.5). Un autre type d'approche par évolution dirigée peut également permettre de sélectionner *in vivo* un tropisme d'intérêt, à partir d'un mélange de capsides chimères générées aléatoirement après fragmentation et réassemblage des gènes *Cap* d'AAV sauvages ([Li 2008](#)). Ces variants artificiels présentent des propriétés intéressantes car ils pourraient permettre d'augmenter l'indice thérapeutique des vecteurs AAVr, et donc éventuellement, de diminuer la dose injectée *in vivo*.

### 3.3.3. Optimisation des cassettes d'expression

Après avoir optimisé la voie d'administration et le tropisme, la cassette d'expression portée par le vecteur doit être en mesure de s'exprimer efficacement et spécifiquement une fois délivrée dans le noyau des cellules cibles. Dans cette optique, plusieurs éléments du génome d'AAVr peuvent être modifiés afin d'améliorer l'expression du transgène au niveau transcriptionnel, post-transcriptionnel et traductionnel.

#### a. Promoteurs ubiquitaires et muscle-orientés

Tout d'abord, le choix du promoteur peut s'avérer déterminant. En fonction des facteurs de transcription s'y fixant, le transgène s'exprimera dans des cellules spécifiques et à des niveaux plus ou moins importants. Les promoteurs issus de génomes viraux ont rapidement suscité l'intérêt, de par leur taille restreinte, leur force et leur capacité à s'exprimer dans la

majorité des types cellulaires. Les plus utilisés sont probablement le promoteur issu du cytomégalovirus (CMV) ou celui du *Rous sarcoma virus* (RSV). Lorsqu'ils sont inclus dans des vecteurs de thérapie génique, ils entraînent une expression robuste du transgène dans la majorité des tissus observés, notamment les muscles squelettiques et le cœur ([Bostick 2007](#), [Chen 2008](#)). Toutefois, l'expression du transgène dans des organes périphériques tels que le foie ou la rate ([Bostick 2007](#), [Chen 2008](#)) et certaines cellules immunitaires ([Gernoux 2015](#)) est susceptible d'entraîner des dysfonctionnements cellulaires par l'expression d'une protéine normalement absente, ou une réponse immunitaire dirigée contre le transgène. De tels effets ont notamment été observés chez des souris déficientes en sarcoglycane- $\alpha$  après injection d'un vecteur AAVr2/1 exprimant le gène manquant sous le contrôle du promoteur CMV ([Dressman 2002](#), [Fougerousse 2007](#)). Le fait que ce même promoteur soit présent dans le premier vecteur AAVr injecté chez des patients DMD pourrait peut-être également avoir favorisé la réponse immune observée dans ce contexte ([Mendell 2010](#)).

Pour des questions de biosécurité et d'efficacité thérapeutique, une expression plus spécifique du transgène semble donc indispensable. Dans le cas du muscle squelettique, certains promoteurs naturels peuvent être utilisés à cet effet, tels que les promoteurs des gènes codant pour la desmine ou la *muscle creatin kinase* (MCK) ([Li 1993](#), [Dunant 2003](#), [Rodino-Kaplan 2008](#)). Toutefois, les éléments de régulation génique endogènes sont parfois d'une taille relativement importante (plus d'1 kb pour les deux promoteurs cités ci-dessus), susceptible de poser problème dans le cas d'un vecteur AAVr pouvant empaqueter un génome de taille inférieure ou égale à 4,7 kb. Ainsi, des promoteurs artificiels plus courts ont été construits par ligation aléatoire d'éléments de régulation endogènes ([Li 1999](#), [Salva 2007](#)). Après criblage, les candidats les plus intéressants ont pu être caractérisés et évalués *in vivo*. Par exemple, le promoteur artificiel SPc5-12 (c5-12) possède une taille réduite à environ 400 paires de base (pb) et entraîne une expression importante du transgène dans les cellules musculaires. À l'inverse, ce promoteur ne présente qu'une faible activité dans des tissus tels que le foie ou la rate ([Li 1999](#)) et ne semble pas induire d'immunotoxicité en comparaison avec un promoteur CMV ([Fougerousse 2007](#)). Même si l'activité de ces promoteurs dans les organes non-cibles n'est pas nécessairement nulle mais peut-être inférieure à la limite de détection des méthodes employées, leur tropisme peut être caractérisé de « muscle-orienté ».

## b. Optimisations des séquences codantes

Dans le cadre de la thérapie génique des dystrophies musculaires se pose parfois le problème de la taille du transgène. De nombreux gènes impliqués dans ces maladies, même dépourvus de leurs séquences non-codantes, dépassent les capacités d'encapsulation des vecteurs AAVr. C'est notamment le cas du gène *DMD*, dont les 79 exons atteignent une taille d'environ 14 kb. Certaines équipes, souhaitant tout de même exploiter les avantages des vecteurs AAVr malgré leurs capacités d'encapsulation réduites à 4,7 kb ont développé différentes stratégies :

- la miniaturisation du transgène : en supprimant des domaines particuliers de la protéine dystrophine, les mini- et micro-dystrophines obtenues sont plus courtes mais partiellement fonctionnelles ([Wang 2000](#), [Harper 2002](#), [Fabb 2002](#)) ;
- la fragmentation du transgène : en mettant à profit les capacités des vecteurs AAVr à former spontanément des concatémères au sein du noyau des cellules hôtes, plusieurs équipes ont créé un système de vecteurs double ou triple en scindant la cassette d'expression et en incorporant les fragments obtenus dans plusieurs vecteurs AAVr ([Zhang 2013](#), [Koo 2014](#)). La reconstitution du transgène dans le noyau des cellules hôtes peut se faire par recombinaison homologue, trans-épissage, ou une combinaison de ces deux mécanismes.

La séquence codante peut également être optimisée de manière intrinsèque, en sélectionnant par exemple des codons utilisés préférentiellement pour la traduction au sein des cellules hôtes. Ceci a été réalisé pour une version de la micro-dystrophine, et a abouti à une augmentation significative de l'efficacité thérapeutique chez la souris ([Foster 2008](#)).

Au sein du noyau, la transcription à partir du promoteur entraîne la formation d'un ARN pré-messager qui va ensuite être exporté vers le cytoplasme (**partie 4.2.1**). Dans le domaine de la transgénèse chez la souris, il est connu que l'inclusion d'un intron en amont du transgène permet d'augmenter le nombre de souriceaux transgéniques obtenus ([Choi 1991](#), [Palmiter 1991](#)). Appliqués aux vecteurs AAVr, ces mêmes introns entraînent une nette augmentation du niveau d'ARNm présent dans les tissus transduits ([Wu 2008](#)). Le mécanisme en jeu n'est pas très clair, mais pourrait faire intervenir des motifs introniques recrutant des facteurs de transcription, une stabilité accrue de l'ARN, ou un export plus efficace de cet ARN dans le cytoplasme.

Ces optimisations du mode d'injection, de la capsidie et de la cassette d'expression des vecteurs AAVr ont été combinées à de nombreuses reprises et de différentes façons dans les

études pré-cliniques de thérapie génique chez la souris mdx et le chien GRMD. La sous-partie suivante récapitule ces études et en dresse les conclusions.

### 3.4. Études pré-cliniques dans les modèles animaux DMD

Le **Tableau 5** liste les détails des principales publications utilisant des vecteurs AAVr chez la souris mdx et le chien GRMD. De la même manière que pour les traitements pharmacologiques, il est difficile de comparer ces études, à cause des différents sérotypes, transgènes et promoteurs utilisés ainsi que de la variabilité des doses injectées et des voies d'administration. Plusieurs enseignements importants peuvent toutefois être tirés :

- de manière générale, les résultats reportés sont positifs. Les vecteurs injectés permettent dans la majorité des cas une amélioration structurale des muscles déficients en dystrophine, plus ou moins spécifique d'un phénotype particulier (régénération, fibrose, inflammation, *etc.*). Elle s'accompagne dans certains cas d'améliorations fonctionnelles, avec augmentation de la force ou de la résistance musculaire ;
- les doses de vecteur injectées pour obtenir de tels bénéfices sont très élevées : en moyenne  $4,3E+12$  vg par souris mdx injectée par voie IV, c'est à dire *grosso modo* du même ordre que le nombre de cellules présentes chez ces animaux, qui plus est souvent traités seulement quelques semaines après leur naissance ;
- l'expression du transgène, même avec ces doses massives, concerne rarement l'intégralité des cellules. De plus, l'analyse des niveaux d'expression et de l'efficacité du traitement est réalisée en moyenne 3 mois après injection. Le recul à plus d'un an n'est que rarement rapporté, aussi bien chez la souris mdx que chez le chien GRMD.

L'une des études citées dans le **Tableau 5** s'est justement intéressée à la persistance et l'efficacité de différents vecteurs AAVr un an après injection chez des souris mdx et des souris mdx/*utr*<sup>-/-</sup> ([Le Hir 2013](#)). Les auteurs ont tout d'abord démontré que les génomes d'un vecteur non thérapeutique n'étaient pas capables de persister dans les cellules musculaires mdx, et que l'expression du transgène y était progressivement perdue. Ils ont ensuite étendu cette observation à un vecteur thérapeutique qui, administré en trop faible quantité, est presque indétectable 3

semaines après injection. Chez des souris *mdx/utr<sup>-/-</sup>* présentant un phénotype plus sévère, le phénomène est encore plus marqué. Ces observations rejoignent celles d'une autre étude publiée en 2010, comparant l'expression de deux transgènes, l'un thérapeutique et l'autre non, chez des souris *mdx* et C57BL/10 ([Moulay 2010](#)).

Il semble donc qu'en comparaison avec un tissu musculaire sain où les vecteurs AAVr sont connus pour persister plusieurs années après injection ([Rivera 2005](#), [Toromanoff 2008](#)), le muscle déficient en dystrophine ne soit pas un environnement favorable à une expression à long terme du transgène. Les hypothèses avancées par les études mentionnées au paragraphe précédent impliquent une perte « passive » des génomes d'AAVr causée par la nécrose des fibres transduites ([Le Hir 2013](#)), ou une réponse immunitaire dirigée contre le transgène ([Moulay 2010](#)). Mais il reste tout à fait possible que d'autres étapes de la transduction soient impactées négativement dans cet environnement tissulaire particulier. Dans ces mêmes études, les niveaux d'expression du transgène sont également mesurés plus faibles en l'absence de dystrophine. Il est étonnant de constater que les mécanismes régulant ces niveaux d'expression restent peu documentés, et n'aient jamais été comparés entre un muscle sain et un muscle déficient en dystrophine. Avant de synthétiser cette revue bibliographique et de présenter les études expérimentales réalisées lors de cette thèse, il convient donc de rappeler quelques éléments de régulation de l'expression des gènes chez les mammifères. Cette dernière partie sera illustrée par des exemples tirés de l'étude de la myogenèse ou de la DMD, afin d'anticiper quels pourraient être les mécanismes impactant l'expression du transgène en l'absence de dystrophine.

**Tableau 5 : Principales études pré-cliniques utilisant un vecteur AAVr chez la souris mdx et le chien GRMD/CXMDJ**

modèle animal	vecteur (sérotipe/promoteur/transgène)			dose	voie d'injection	âge à l'injection	âge à l'euthanasie	Réf.
<b>thérapie génique de substitution</b>								
mdx	AAVr2/2	CK6	microdys	5,0E+9 vg	IM (gastroc)	1 mois	6 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/6	CK6	microdys	1,0E+12 à 1,0E+13 vg	IV (veine caudale)	6 à 8 sem.	16 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx/utr <sup>-/-</sup>	AAVR2/6	CMV	microdys	3,0E+12 vg	IV (veine caudale)	1 mois	5,5 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/6	CMV	microdys	1,0E+13 vg	IV (veine caudale)	20 mois	24 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx4Cv	AAVr2/6	CMV	minidys	2,0E+12 vg	IV (veine caudale)	3 sem.	6 à 19 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/5	CMV	microdys	5,0E+09 vg	IM (EDL)	1,5 à 9 mois	4,5 à 12 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/9	CMV	microdys	1,0E+12 vg	IV (veine fasciale)	1 jour	4 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/9	CMV	microdys	5,0E+12 vg	IV (veine caudale)	21 à 22 mois	24 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx4Cv	AAVr2/9	CMV	minidys	5,0E+12 vg	IV (veine caudale)	1 mois	5 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/9	CMV	microdys	6,5E+12 vg	IV (veine caudale)	5 sem.	13 sem.	<a href="#">Réf.</a>
GRMD	AAVr2/9	CMV	microdys	2,6E+13 vg	IM (ECU)	13 à 15 mois	15 à 17 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/2	CMV / MCK	minidys	5,0E+10 vg	IM (gastroc)	10 à 50 jours	2 à 6 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/2	MCK	minidys	2,5E+11 vg	IM (TA)	2 mois	10 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx mdx/utr <sup>-/-</sup>	AAVr2/1	CMV / MCK	minidys	3,0E+11 vg	IP	10 jours	3,5 à 6,5 mois	<a href="#">Réf.</a>
GRMD	AAVr2/9	CMV	minidys	1,5E+14 vg/kg	IV (veine jugulaire)	4 jours	4 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx nude	AAVr2/2	CMV	microdys	1,2E+10 vg	IM (TA)	12 jours	20 semaines	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/8	c5-12	microdys	3,0E+11 vg	IV (veine caudale)	10 semaines	22 semaines	<a href="#">Réf.</a>
CXMDJ	AAVr2/8	c5-12	microdys	1,0E+12 à 2,0E+13 vg	IM	9 semaines	17 semaines	<a href="#">Réf.</a>

Tableau 5 (suite)

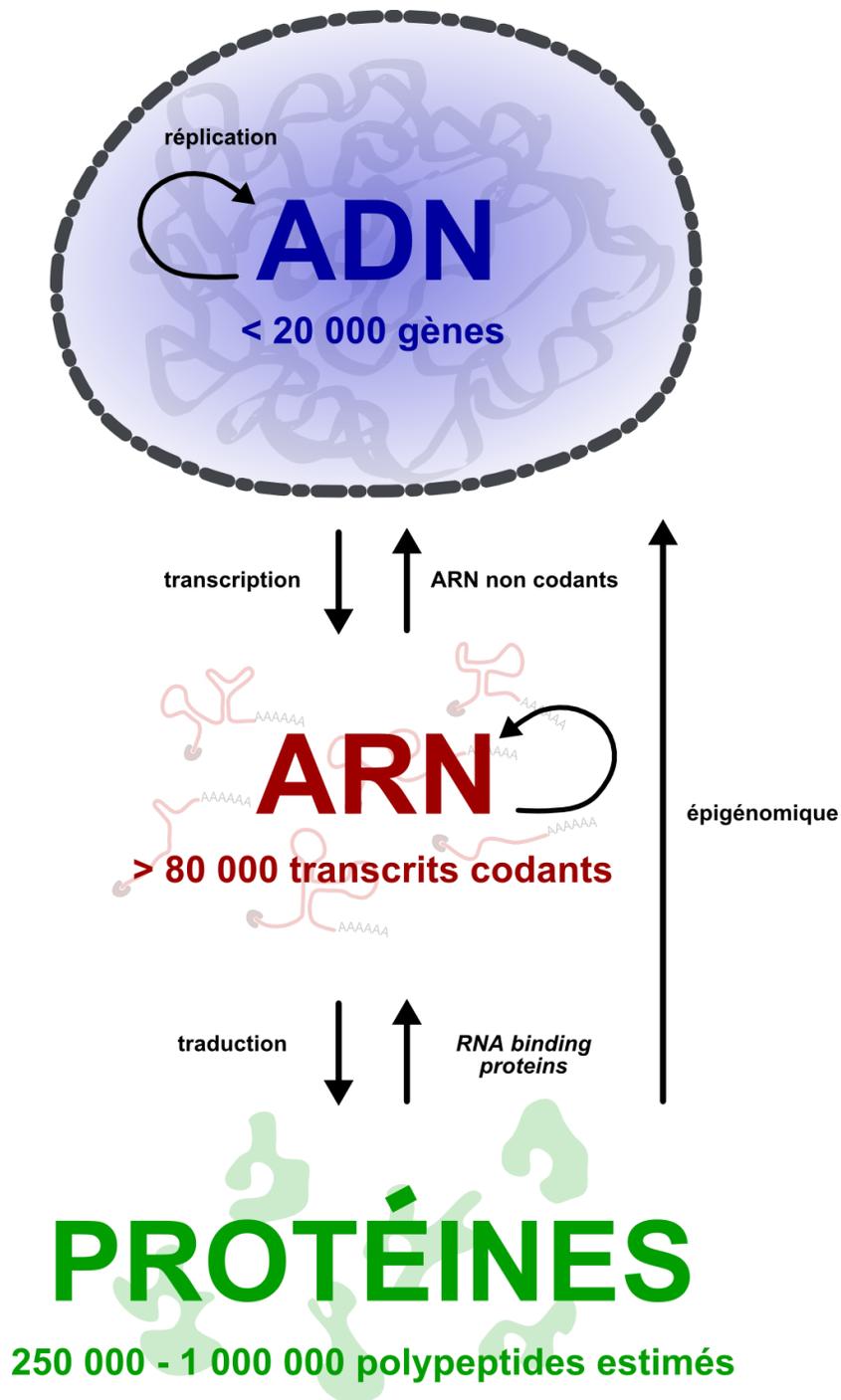
modèle animal	vecteur (sérotype/promoteur/transgene)		dose	voie d'injection	âge à l'injection	âge à l'euthanasie	Réf.	
<b>thérapie génique de correction</b>								
mdx	AAVr2/1	U7	U7ex23	0,2 à 1,0E+12 vg	IM (TA)	6 sem.	8 à 19 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/1	CMV	U1#23	3,0 à 4,0E+12 vg	IV (veine caudale)	6 sem.	18 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx/utr <sup>-/-</sup>	AAVr2/9	U7	U7ex23	1,0E+13 vg	IV (veine caudale)	3 sem.	12 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/1	U7	U7ex23	7,5E+09 à 1,2E+11 vg	IM (TA)	3 sem.	6 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx/utr <sup>-/-</sup>	AAVr2/1	U7	U7ex23	1,0E+13 vg	IV (veine caudale)	3 sem.	3 mois ou 1 an	
GRMD	AAVr2/6	U7	U7E6/8	5,0E+11 à 1,4E+13 vg/kg	endocarde	5 à 13 mois	18 à 26 mois	<a href="#">Réf.</a>
GRMD	AAVr2/1	U7	U7E6/8	5,0E+10 à 3,5E+12 vg	IM	0,6 à 15 mois	0,5 à 56 mois	<a href="#">Réf.</a>
GRMD	AAVr2/8	U7	U7E6/8	5,0E+12 à 5,0E+13 vg/kg	LR	3 à 4 mois	7 mois	<a href="#">Réf.</a>
<b>thérapie génique de compensation</b>								
mdx	AAVr2/1 ou 2/2	CMV	Galgt2	1,0E+09 à 1,0E+10 vg	IM (TA ou Gastroc.)	1 sem. à 15 mois	4 à 12 semaines	<a href="#">Réf.</a>
mdx/utr <sup>-/-</sup>	AAVr2/6	CMV	micro-utr	3,0E+12 vg	IV (veine caudale)	1 mois	5 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/8	CAG	MPRO (myostatine)	1,0E+12 vg	IV (veine caudale)	4 mois	8 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/6	CMV	TNF-R	2,0E+08 à 2,0E+09 vg	IM (TA)	8 à 10 sem.	13 à 15 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/8	AAT/A poE	ActIIB-R	1,0E+12 vg	IP	6 sem.	5 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/9	CMV	SERCA2a	1,0E+12 vg	IV (veine caudale)	12 mois	20 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/6	CMV	PGC-1 $\alpha$	1,0E+11 vg	IM	néonat.	4 à 6 semaines	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/9	U6	shRNA NF- $\kappa$ B	3,5E+11 vg	IM (Gastroc.)	1 à 4 mois	2 à 5 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/8 (rh.74)	MCK	ITGA7 (intégrine)	1,0E+12 vg	LR	4 sem.	10 sem.	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/9 (Tyr)	c5-12	nNOS delta(PDZ)	1,0E+13 vg	IV (veine caudale)	14 mois	21 mois	<a href="#">Réf.</a>
mdx	AAVr2/8	actine $\alpha$	Jazz (activateur utr)	7,5E+11 vg	IP	5 jours	20 jours	<a href="#">Réf.</a>

## **4. Régulation de l'expression des gènes chez les mammifères**

Le dogme central de la biologie moléculaire, représentant une vision linéaire de l'expression des gènes depuis l'ADN jusqu'aux protéines *via* l'ARNm, s'est considérablement complexifié ces dernières années (**Figure 21**). La caractérisation de modifications chimiques covalentes sur la molécule d'ADN ou sur ses protéines associées est à la base d'un niveau épigénétique de régulation de l'expression des gènes, sans changement de la séquence nucléotidique. De plus, les avancées récentes en matière de séquençage à haut débit jettent peu à peu la lumière sur le monde de l'ARN, d'une immensité et d'une complexité jusqu'ici insoupçonnées. En témoignent notamment les nombreuses familles d'ARN non codants qui semblent tenir un rôle majeur dans la régulation de l'expression du génome ([Pennisi 2012](#)). L'épigénétique et l'épitranscriptomique sont aujourd'hui des disciplines qui s'évertuent à expliquer comment un individu adulte peut exprimer, à partir d'un même génome initial, un nombre important de programmes transcriptionnels et traductionnels spécifiques à chaque type cellulaire. De plus, elles permettent de comprendre certains des phénotypes de nombreuses pathologies, parmi lesquelles la DMD où différentes dérégulations ont été mises en évidence ces dernières années. L'objectif de cette dernière partie est de spécifier quelques uns des niveaux de régulation de l'expression des gènes, en les illustrant par des exemples tirés de la physiologie musculaire et de la DMD.

### **4.1. Organisation de la chromatine et régulation de la transcription**

La molécule d'ADN est le support chimique de notre patrimoine génétique. De par sa séquence, les protéines qui lui sont associées et son organisation au sein du noyau, elle est également porteuse d'informations permettant la régulation de l'expression spatio-temporelle du génome. Ce premier paragraphe détaille deux niveaux permettant de réguler l'expression des gènes sans modifier la séquence de la molécule d'ADN : la méthylation des cytosines des dinucléotides CpG (**partie 4.1.1**) et les modifications post-traductionnelles des protéines histones (*histone post-translational modifications*, ou HPTM, **partie 4.1.2**).



**Figure 21** : Dogme central de la biologie moléculaire, décrivant la vision linéaire du flux de l'information génétique depuis l'ADN génomique au sein du noyau jusqu'aux protéines produites dans le cytoplasme, en passant par l'ARN, intermédiaire moléculaire faisant office de messager. Des flèches en sens inverse peuvent aujourd'hui également être ajoutées, indiquant les différents niveaux de régulation, et les influences réciproques des protéines (épigénétique, **partie 4.1**) et de l'ARN (ARN non codants, **partie 4.2.1**) sur l'ADN, ainsi que des protéines sur l'ARN (*RNA binding proteins* (RBP), **partie 4.2.3**). Les nombres indiqués sont valables pour le génome humain.

### 4.1.1. Méthylation de l'ADN au niveau des dinucléotides CpG

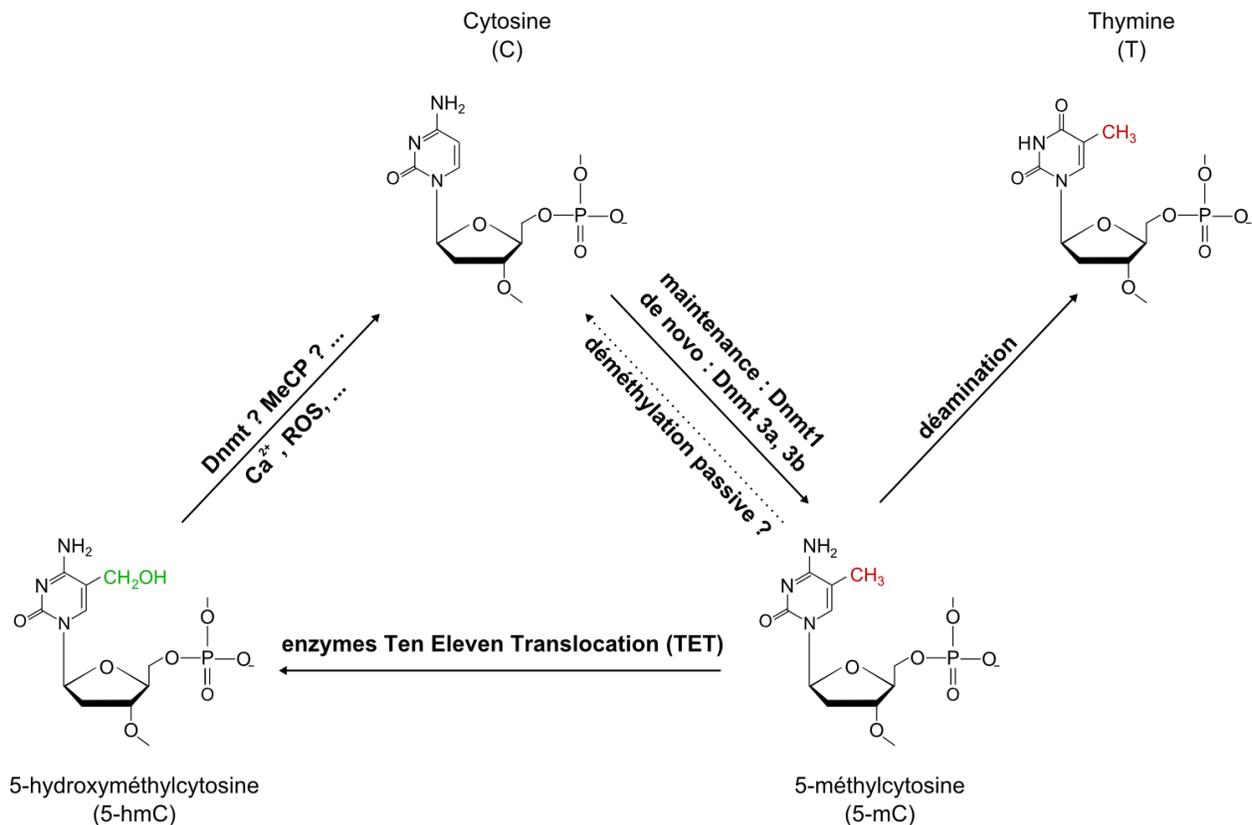
#### a. Concepts de base

La méthylation de l'ADN cible en majorité les cytosines des dinucléotides CpG et elle est classiquement considérée comme une modification inhibitrice de l'expression génique lorsqu'elle est retrouvée au niveau d'un promoteur. Cette réaction chimique s'effectue par ajout d'un groupement -CH<sub>3</sub> en position 5 des cytosines (5-mC) et est catalysée par une famille d'enzymes appelées *DNA methyltransferases* (DNMT, [Bestor 2000](#)). La réaction inverse de déméthylation des CpG est moins bien caractérisée. Elle pourrait se dérouler de manière passive ou faire intervenir des intermédiaires réactionnels. Notamment, les 5-mC peuvent être transformées en 5-hydroxyméthylcytosines (5-hmC) par l'action de l'enzyme *Ten Eleven Translocation 1* (TET1) ([Guo 2011](#)). L'étape réactionnelle permettant de revenir à des cytosines non méthylées à partir de cet intermédiaire est peu caractérisée ; elle pourrait faire intervenir les DNMT elles-mêmes ou des protéines se liant aux 5-mCpG (*Methyl-CpG binding proteins*, MeCP), et être facilitée par les ions Ca<sup>2+</sup> ou les ROS ([Chen 2013](#)) (**Figure 22**).

Spontanément, la méthylation des cytosines entraîne leur transformation en thymines par déamination, ce qui mène à une déplétion globale des dinucléotides CpG chez les vertébrés ([Bird 1980](#)). Au sein du génome, on note tout de même la présence de régions d'environ 1000 pb demeurées enrichies en CpG : les îlots CpG ([Bird 1985](#)). Chez l'Homme et la Souris, environ la moitié de ces îlots ont pu être associés avec le promoteur d'un gène codant ([Illingworth 2008, 2010](#)). En fonction de leur densité en CpG, ils vont avoir une influence plus ou moins importante sur l'expression du gène associé. Les promoteurs riches en CpG sont majoritairement dans un état non-méthylé et à ce niveau, des analyses d'immunoprécipitation ont démontré la présence de l'ARN Polymérase II (Pol II) et de transcrits naissants ([Bird 1986, Weber 2007](#)). D'autres, moins denses en CpG, sont méthylés de manière tissu-spécifique et permettent le contrôle spatio-temporel de l'expression des gènes associés ([Weber 2007, Illingworth 2008](#)).

#### b. Exemples tirés de la myogenèse et de la DMD

Le gène codant pour le régulateur transcriptionnel MyoD, dont le rôle lors de la myogenèse a été souligné dans la **Partie 1.4**, possède une séquence *enhancer* distale méthylée dans des lignées cellulaires non musculaires mais déméthylée dans des lignées musculaires ([Brunk 1996](#)). Au cours du développement du mésoderme somitique chez la souris, les auteurs



**Figure 22 :** Méthylation et déméthylation des cytosines de l'ADN. L'ajout d'un groupement méthyl- en position 5 du cycle pyrimidique est effectué par DNMT1 (méthylation de maintenance lors de la réplication de l'ADN) ou DNMT3a/b (méthylation *de novo* dans les cellules post-mitotiques). Spontanément cette méthylation peut mener à une déamination et la formation de thymine. Le mécanisme de déméthylation et les protéines impliquées sont moins connus. Une réaction passive pourrait se produire, mais l'hypothèse favorisée aujourd'hui fait appel à un intermédiaire réactionnel de type 5-hmC et les enzymes TET puis potentiellement DNMT ou MeCP.

ont observé une déméthylation séquentielle de cet *enhancer* précédant l'expression de MyoD. Il en va de même pour le gène *Myog*, codant pour la myogénine, et dont l'induction lors de la différenciation de cellules musculaires s'accompagne d'une déméthylation au niveau du promoteur (Palacios 2010).

De manière intéressante, la voie de signalisation Notch, impliquée notamment dans la prolifération des cellules satellites (Figure 8), est régulée de manière moins dichotomique. Même si différents acteurs de cette voie possèdent bien des régions régulatrices déméthylées dans les progéniteurs et les lignées cellulaires musculaires, ce n'est pas le cas au sein des muscles squelettiques adultes (Terragni 2014). Dans les fibres musculaires différenciées, les auteurs ont plutôt mesuré des niveaux importants de 5-hmC, un intermédiaire réactionnel généré

lors du processus de déméthylation (**Figure 22**). Il est donc tentant d'émettre l'hypothèse qu'au sein des muscles différenciés, les *enhancers* des gènes de la voie Notch sont hydroxyméthylés, et que certains stress cellulaires (rupture de l'homéostasie calcique, stress oxydatif, etc.) mènent à une déméthylation des 5-hmC, l'activation de cette voie de signalisation et la prolifération des cellules satellites (**Figure 23**). Toutefois, d'autres facteurs semblent impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes de la voie Notch par des processus épigénétiques, notamment le TNF- $\alpha$ , par l'intermédiaire de la voie NF- $\kappa$ B et de DNMT3 ([Acharyya 2010](#)).

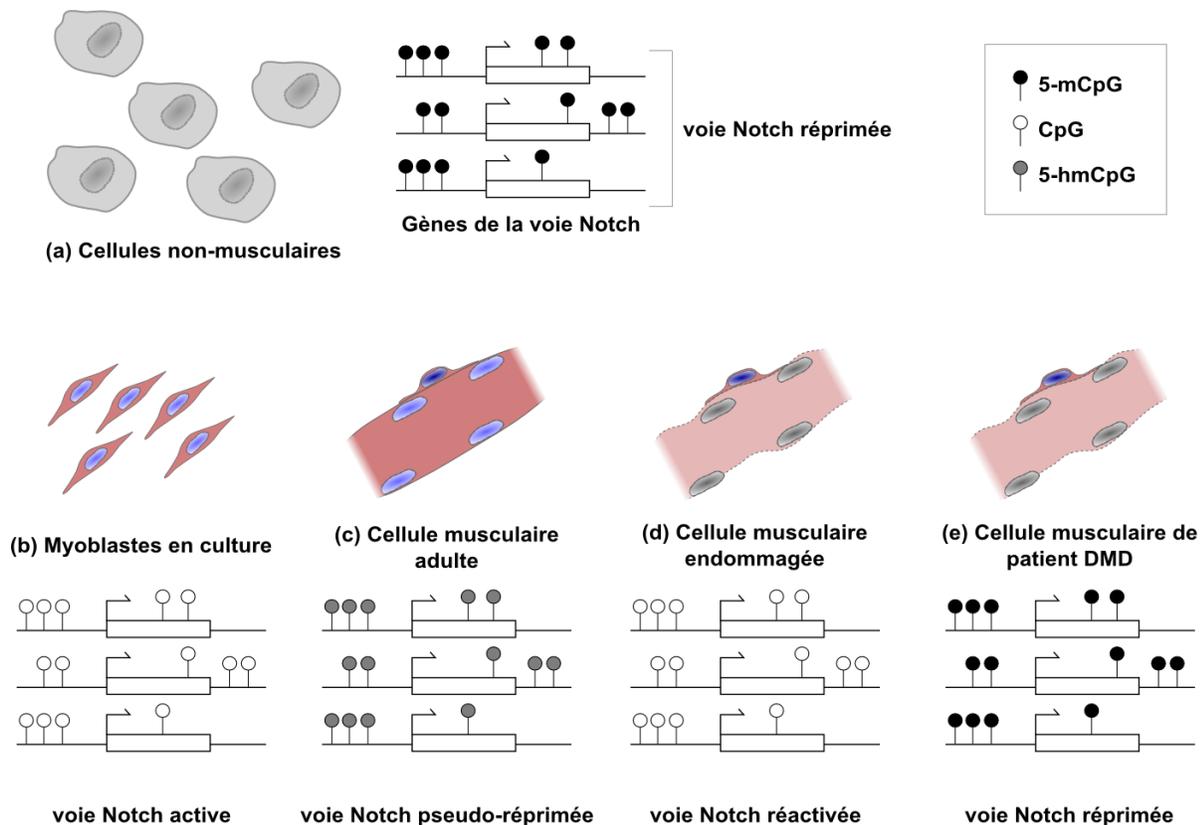
Dans les muscles des patients DMD soumis à un contexte inflammatoire particulier, une rupture de l'homéostasie calcique et un stress oxydatif important (**partie 2.4**), il y a fort à parier que ces processus épigénétiques sont perturbés et entraînent la dérégulation de l'expression de gènes spécifiques, notamment ceux de la voie Notch.

#### 4.1.2. Modifications post-traductionnelles des histones

##### a. Concepts de base

Au pH cellulaire, les fonctions acides phosphoriques de la molécule d'ADN sont déprotonées, lui conférant une charge fortement négative, répartie le long du squelette phosphodiester. L'instabilité électrostatique qui en résulte est compensée par l'association de la double hélice avec des protéines basiques appelées histones. Ces protéines assemblées en octamères de 2x4 histones coeur (H2A, H2B, H3 et H4) sont réparties de manière régulière le long de la molécule d'ADN, qu'elles organisent en un enchaînement de nucléosomes où la double hélice s'enroule autour de l'octamère ([Luger 1997](#)). On parle alors de la chromatine pour désigner cette organisation.

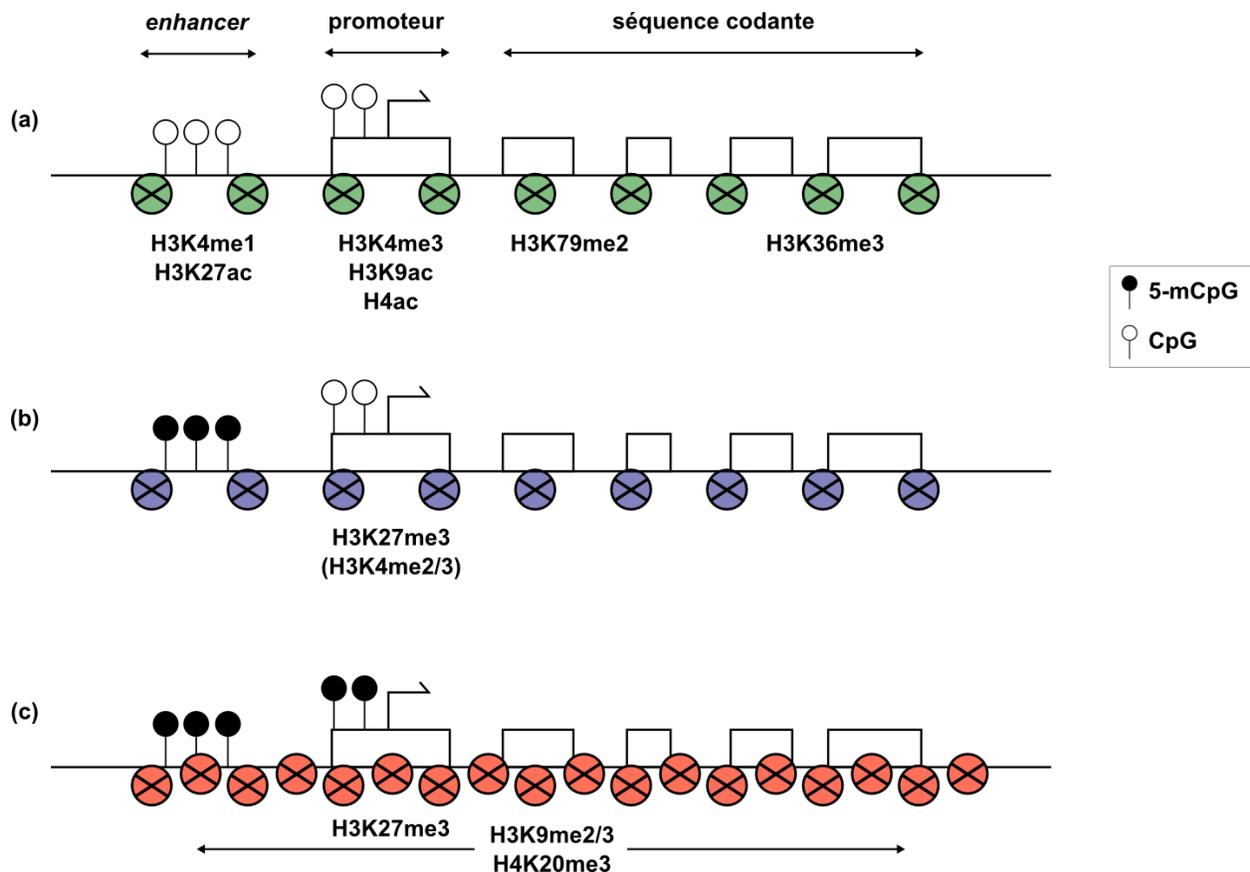
Certains résidus de ces protéines histones peuvent être modifiés chimiquement une fois leur traduction achevée, par l'ajout de groupements spécifiques ([Bannister 2011](#), [Rothbart 2014](#)). Ces HPTM peuvent aussi bien concerner les parties N-terminales des histones qui dépassent de l'octamère protéique que leurs régions C-terminales plus internes ([Tessarz 2014](#)). En N-terminal, elles vont notamment permettre le recrutement de protéines effectrices spécifiques ([Zhou 2011](#), [Rothbart 2014](#)); en C-terminal, elles vont plutôt modifier les interactions entre monomères d'histones ([Tessarz 2014](#)). À l'heure actuelle, de très nombreuses



**Figure 23 :** Hypothèse de régulation épigénétique de l'activation de la voie Notch durant un dommage musculaire dans un muscle sain, et dans un muscle DMD. Trois gènes quelconques appartenant à la voie de signalisation Notch sont représentés avec leurs éléments régulateurs. L'état de méthylation des dinucléotides CpG change en fonction du type cellulaire et de l'état de différenciation : la voie Notch est inactive dans les cellules non-musculaires et le taux de méthylation des CpG est important (a). Dans les myoblastes non différenciés, la voie Notch est en revanche activée et le taux de méthylation des CpG est faible (b). Lors de la différenciation, une hydroxyméthylation des CpG (c), pourrait permettre une réponse rapide par déméthylation et réactivation de la voie Notch lors d'un dommage (d). Dans les cellules DMD, le contexte inflammatoire et oxydatif pourrait entraîner une inhibition plus durable de la voie Notch par reméthylation (e).

HPTM ont été décrites sur les 4 histones de l'octamère, et il est probable que certaines restent encore à découvrir. De plus, leurs fonctions exactes sont plus ou moins bien caractérisées, de même que l'influence qu'elles peuvent avoir les unes sur les autres. De manière simplifiée, la **Figure 24** et le **Tableau 6** récapitulent quelques HPTM parmi les plus souvent décrites et les mieux caractérisées au niveau de régions génomiques spécifiques.

L'ensemble de ces HPTM va permettre de réguler le degré de compaction de la chromatine et son accessibilité aux différents acteurs impliqués dans l'expression génique.



**Figure 24 :** Modifications épigénétiques au niveau d'une région exprimée du génome (a), d'une région réprimée de manière facultative (b) ou constitutive (c). (a) Au niveau d'un gène actif, les CpG sont déméthylés et l'on retrouve des HPTM caractéristiques au niveau de l'*enhancer* (H3K4me1 et H3K27ac), du promoteur (H3K4me3, H3K9ac et H4ac) et de la région codante (H3K79me2 et H3K36me3). (b) Au niveau d'un gène non exprimé de manière tissu-spécifique, ou exprimé uniquement dans certaines conditions, une méthylation des CpG est observée surtout au niveau des enhancers (les promoteurs peuvent rester déméthylés), tandis que la chromatine est souvent marquée par H3K27me3 (une HPTM répressive), accompagnée parfois de H3K4me2/3 (chromatine bivalente). (c) Au niveau d'une région réprimée de manière constitutive, les CpG sont méthylés et les HPTM présentes sont H3K9me2/3, H4K20me3, avec parfois H3K27me3 au niveau du promoteur. Figure adaptée de [Barth 2010](#) et [Zhou 2011](#).

## b. Exemples tirés de la myogenèse

La réparation du tissu musculaire grâce à l'activation, la prolifération et la différenciation des cellules satellites fait appel à l'action coordonnée de différents facteurs de transcription myogéniques : les *Myogenesis Regulatory Factors* (MRF, **Figure 8**). Mais de nombreuses études publiées ces dernières années ont mis en évidence que ces MRF agissent de concert avec des protéines participant au remodelage de la chromatine des cellules satellites ([Giordani 2013](#)). Tout

comme pour les cellules souches embryonnaires, l'une des caractéristiques de ces cellules est la bivalence de certains promoteurs ([Bernstein 2006](#), [Liu 2013](#)). Des études d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) suivies de séquençage à haut débit ont mis en évidence la présence de deux marques épigénétiques antagonistes au niveau de ces séquences : une tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me3) associée avec H3K27me3. Alors que la première est associée avec les promoteurs des gènes activés, la deuxième est quant à elle synonyme d'extinction transcriptionnelle ([Bannister 2011](#), [Rothbart 2014](#)). Cette bivalence, déjà présente à l'état quiescent, augmente lors de l'activation des cellules satellites, de manière concomitante avec l'expression de l'enzyme *Enhancer of Zeste Homolog 2* (EZH2), responsable de l'ajout de H3K27me3 ([Liu 2013](#)). La suppression conditionnelle d'EZH2 dans les cellules satellites quiescentes entraîne une diminution de leur nombre et un défaut de régénération musculaire, prouvant son implication dans ces processus ([Juan 2011](#)). Pendant la phase proliférative, EZH2 va en effet se lier aux promoteurs des gènes musculaires par l'intermédiaire du facteur Yin Yang 1 (YY1) et inhiber leur expression (**Figure 25**, [Caretto 2004](#)).

Tableau 6 : HPTM associées avec différentes régions génomiques

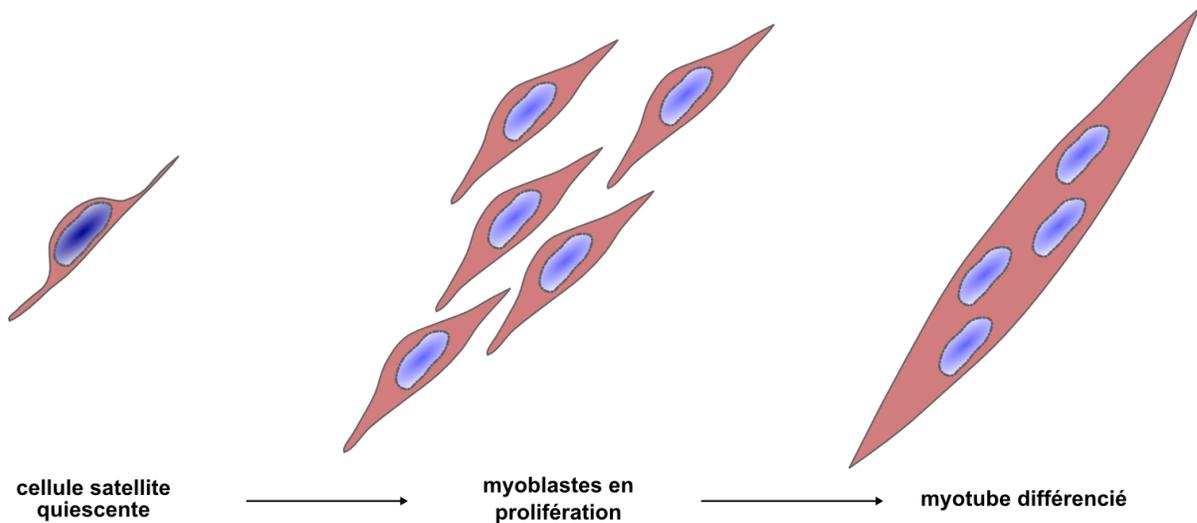
région génomique exprimée				
HPTM	localisation	enzymes d'ajout	enzymes de retrait	protéines de lecture
Acétylation H3 (K4, K9, K14, etc)	promoteur	Histone Acétyltransférases (HAT)	Histone Déacétylases (HDAC)	protéines BRD, TAF
Acétylation H4 (K5, K16)				
H3K4me2/3	promoteur	MLL1-4, SET1A/B	LSD, JARID1	TAF, CHD1, NURF, JMJD2A
H3K4me1	<i>enhancer</i>	MLL	LSD	Tip60
H3K27ac	<i>enhancer</i>	p300/CBP	HDAC	protéines BRD, TAF
H3K36me1-3	région codante	SETD2, NSD1-3	JMJD2	Pol II (élongation), NSD3-LSD2, PRC, DNMT3A
H3K79me3	région codante	DOT1L	?	?
région génomique non-exprimée				
HPTM	localisation	enzymes d'ajout	enzymes de retrait	protéines de lecture
H3K9me2/3	hétérochromatine constitutive	Suv3-9H, G9a	JMJD1/2	HP1
H3K27me3	hétérochromatine facultative	EZH2 (PRC2)	JMJD3, UTX	PRC1
H4K20me3	hétérochromatine constitutive	Suv4-20H	?	?

De manière intéressante, le gène *DMD* possède un site de fixation à YY1, et ce dernier est connu pour inhiber son expression dans les myoblastes en prolifération ([Galvagni 1998](#)). Même si cela n'a jamais été démontré de manière formelle, il est fort probable que l'enzyme EZH2 soit responsable de ce phénomène.

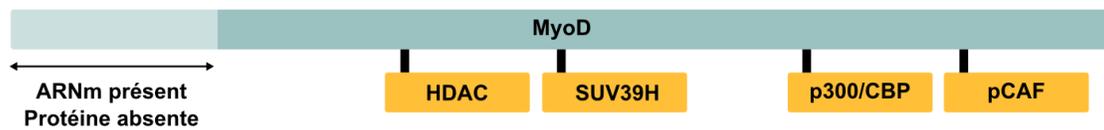
Le régulateur transcriptionnel MyoD est lui aussi connu pour exercer une partie de ses fonctions *via* des régulations épigénétiques. Son association avec certaines HDAC dans le noyau des cellules musculaires en prolifération inhibe l'expression des gènes myogéniques ([Puri 2001](#)). En revanche, lors de la différenciation, MyoD coopère avec l'histone acétyltransférase (HAT) *p300/CBP-Associated Factor* (PCAF) avec qui il active la transcription de ces mêmes gènes ([Puri 1997](#)). De la même manière, lors de la prolifération des myoblastes, MyoD s'associe avec l'enzyme *suppressor of variegation* (SUV) 3-9 homolog (SUV39H), responsable de la triméthylation de H3K9 (H3K9me3), qui entraîne l'extinction du promoteur du gène *Myog* ([Mal 2006](#)). L'induction de la différenciation s'accompagne de l'expression de l'enzyme *Jumonji domain* JMJD2A capable de déméthyliser H3K9, permettant l'expression de la myogénine et par conséquent celle du programme myogénique ([Verrier 2011](#)) (**Figure 25**).

Enfin, il est intéressant de noter que contrairement à la majorité des cellules, les fibres musculaires sont des syncytia composés de noyaux fonctionnellement différents, n'exprimant pas tous le même programme transcriptionnel (voir à ce sujet la **partie 1.2.3.2**). Les noyaux sous-synaptiques, par opposition aux noyaux extra-synaptiques, sont agrégés en regard de la jonction neuro-musculaire sous la plaque motrice, et expriment les gènes codant pour le récepteur AchR ([Simon 1992](#)). Cette spécialisation fonctionnelle dépend de l'activité neurale motrice, convertie dans les noyaux sous-synaptiques en signaux épigénétiques ([Méjat 2005](#), [Ravel-Chapuis 2007](#)). Dans un premier temps, l'activité électrique du nerf moteur se propage à l'ensemble de la fibre musculaire et y active l'enzyme HDAC9, qui inhibe l'expression des gènes codant pour AchR ([Méjat 2005](#)). Mais certains facteurs neuraux impliqués dans la formation de la jonction neuro-musculaire (agrine et neuréguline) induisent ensuite une hyperacétylation des histones spécifiquement dans les noyaux sous-synaptiques, permettant l'expression de AchR dans ces noyaux ([Ravel-Chapuis 2007](#)). Ainsi, même dans les muscles post-mitotiques, des signaux épigénétiques sont maintenus actifs et permettent le partitionnement spatial de la transcription.

(a) étapes successives de la myogenèse



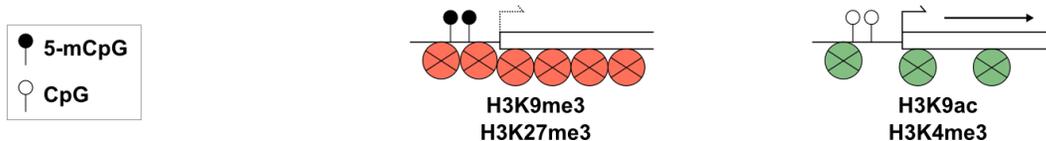
(b) partenaires protéiques du facteur de transcription MyoD



(c) niveau de protéine EZH2



(d) profil épigénétique au niveau du promoteur d'un gène musculaire



**Figure 25 :** Aperçu de la régulation épigénétique de la myogenèse. (a) Comme montré sur la Figure 8, les cellules satellites activées passent d'abord par une phase proliférative, puis se différencient en myotubes plurinucléés ou fusionnent avec des myotubes pré-existant. Pendant ces différentes phases, MyoD n'interagit pas avec les mêmes partenaires protéiques (b), le niveau de la protéine EZH2 évolue (c), entraînant une évolution du profil épigénétique au niveau des promoteurs myogéniques (d).

### c. HDACs et muscles déficients en dystrophine

Même si les exemples pourraient être multipliés, l'étude précise de la régulation épigénétique de la myogenèse sort du cadre de cette introduction. En revanche, son devenir en

l'absence de dystrophine pourrait permettre d'élucider quelques-uns des mécanismes physiopathologiques à la base des défauts de régénération observés dans ce contexte.

Il existe plusieurs classes d'HDAC ayant des structures, propriétés, localisations cellulaires et cibles différentes ([Haberland 2009](#) et **Tableau 7**). De nombreuses molécules, naturelles ou artificielles, sont capables d'inhiber leur activité et certaines d'entre elles sont déjà utilisées en médecine humaine ([Haberland 2009](#), [Seto 2014](#)). Concernant la DMD, une équipe a publié en 2006 des résultats encourageants rapportant le traitement de souris mdx par différents inhibiteurs d'HDAC ([Minetti 2006](#) et **Tableau 3**). Les auteurs ont montré dans chaque cas une amélioration du phénotype des souris malades, qu'ils ont pu corréler avec une dé-répression du gène codant pour la follistatine ([Minetti 2006](#)). Cette protéine est notamment connue pour contrer l'action de la myostatine, un inhibiteur de la myogenèse. Par la suite, cette même équipe s'est intéressée à la régulation de l'activité de différentes HDAC dans les muscles des souris mdx, et a mis en lumière plusieurs perturbations :

- la sur-expression et sur-activation de HDAC2 ([Colussi 2008](#)) : la perte de nNOS consécutive à l'absence de dystrophine entraîne un défaut de nitrosylation de HDAC2, menant à sa sur-activation et à l'inhibition de l'expression de la follistatine ;
- la délocalisation et la phosphorylation aberrante de HDAC5 ([Colussi 2009](#)) : la diminution du taux de NO semble également responsable de l'inhibition de l'activité de la protéine phosphatase 2A(PP2A) et de sa rétention cytoplasmique. En conséquence, HDAC5 demeure phosphorylée et est également retenue dans le cytoplasme, où son action sur la chromatine ne peut être effectuée.

À l'échelle des noyaux individuels, ces dérégulations aboutissent à un profil épigénétique plus acétylé, et donc probablement à une chromatine moins compacte dans les muscles des souris mdx et des patients DMD ([Colussi 2009](#)). De manière intéressante, ces phénomènes se reflètent sur les profils d'expression de gènes spécifiques impliqués notamment dans la prolifération cellulaire ou l'inflammation. Certains phénotypes classiquement observés dans les muscles dystrophiques peuvent donc s'expliquer, au moins en partie, par ces perturbations épigénétiques. Alors que différents inhibiteurs d'HDAC plus ou moins spécifiques ont déjà fait leurs preuves chez la souris mdx ([Minetti 2006](#), [Colussi 2010](#), [Consalvi 2013](#)), un essai clinique de phase I/II utilisant le givinostat est en cours chez des patients DMD ambulants ([lien](#)).

Tableau 7 : Récapitulatif des différentes classes d'HDACs  
(d'après [Haberland 2009](#), [Seto 2014](#))

classe d'HDAC	identité HDAC	localisation	expression
classe I	HDAC 1	majoritairement nucléaire	relativement ubiquitaire
	HDAC 2		
	HDAC 3		
	HDAC 8		
classe IIa	HDAC 4	nucléaire ou cytoplasmique	cerveau
	HDAC 5		muscle, cerveau, cœur
	HDAC 7		cellules endothéliales, thymocytes
	HDAC 9		muscle, cerveau, cœur
classe IIb	HDAC 6	majoritairement cytoplasmique	cœur, foie, rein, pancréas
	HDAC 10		foie, rein, rate
classe III	Sirtuines	noyau, cytoplasme et/ou mitochondrie	relativement ubiquitaire
classe IV	HDAC 11	nucléaire ou cytoplasmique	muscle, cerveau, cœur, rein, testicules

#### 4.1.3. L'épigénétique des vecteurs AAVr

De manière simplifiée, la chromatine endogène que l'on trouve au sein du noyau des cellules est traditionnellement séparée en deux états de compaction différents (**Figure 24**) :

- l'euchromatine : cet état désigne la chromatine dans un état faiblement compacté, accessible à la machinerie transcriptionnelle, et donc associé avec des marques épigénétiques « actives » (H3 et H4 acétylés, H3K4me1-3, *etc.*) ;
- l'hétérochromatine : à l'inverse, cet état désigne une chromatine plus compacte, moins accessible à la machinerie d'expression, et associée avec des marques épigénétiques « inactives ». Cette inactivation peut être transitoire (hétérochromatine facultative, plutôt riche en H3K27me3), ou durable (hétérochromatine constitutive, enrichie en H3K9me3 et 5-mCpG) (**Figure 24**).

Cette vision dichotomique ne représente probablement pas fidèlement la réalité de

l'organisation de la chromatine, et se complexifie par l'intervention d'autres facteurs épigénétiques non mentionnés dans les paragraphes précédents (variants d'histone, asymétrie des nucléosomes, compartimentalisation nucléaire). Quoiqu'il en soit, tous ces mécanismes ont été principalement étudiés pour l'ADN génomique, long de plusieurs mégabases et comprenant des domaines fonctionnels définis structuralement (centromères et télomères notamment). Comme mentionné précédemment (**partie 3.2.3.b**), les génomes épisomaux des vecteurs AAVr sont également capables de s'associer avec des protéines histones endogènes, adoptant une structure dite « pseudo-chromatinienne » ([Penaud-Budloo 2008](#)). La « chromatinisation » du génome recombinant est probablement un facteur permettant aux vecteurs AAVr de persister à long terme dans le noyau des cellules transduites, comme c'est également le cas pour de nombreux virus ([Lieberman 2008](#), [Knipe 2013](#)). Par conséquent, cela expose ces vecteurs à des régulations épigénétiques semblables à celles décrites ci-dessus dans un contexte chromatinien endogène. Néanmoins, compte tenu de l'état extra-chromosomique dans lequel persistent les génomes AAVr, il est probable que ces régulations prennent un visage différent.

Dans ce cadre, une étude *in vitro* a montré qu'il était possible d'augmenter l'expression d'un transgène porté par un vecteur AAVr en co-traitant les cellules avec un inhibiteur d'HDAC ([Okada 2006](#)). Toutefois, le traitement de primates injectés par un AAVr à l'aide de phénylbutyrate, un autre inhibiteur d'HDAC, n'a pas donné de résultats probants ([Penaud-Budloo 2008](#)). Ces résultats apparemment divergents peuvent être aisément expliqués par les nombreuses différences entre ces deux études (espèces différentes, vecteurs différents, inhibiteurs d'HDAC différents). Alternativement, il est possible que certains génomes d'AAVr soient maintenus dans le muscle de primate sous forme d'hétérochromatine et portent des marques épigénétiques répressives (H3K9me3, H3K27me3 ou 5-mCpG), les rendant insensibles aux inhibiteurs d'HDAC. Une étude ultérieure menée au laboratoire a tenté de répondre à cette question en mesurant le pourcentage de méthylation du promoteur RSV inclus dans le vecteur administré à ces primates ([Léger 2011](#)). Dans les muscles transduits, où l'expression du transgène est détectée plus de 3 ans après injection du vecteur, la méthylation du promoteur RSV reste inférieure au seuil de détection dans la majorité des cas. De manière surprenante, cette observation est aussi valable dans le foie, où malgré la présence de génomes de vecteur, l'expression du transgène est presque indétectable ([Léger 2011](#)). Toutefois, les HPTM associées avec ces génomes n'ont pas été documentées.

Pour conclure, il convient de signaler que les études précédentes ont été réalisées soit *in vitro*, soit dans un contexte tissulaire exempt de toute perturbation pathologique. Or, nous avons constaté dans les paragraphes précédents que l'absence de dystrophine dans les fibres musculaires engendrait un ensemble de perturbations épigénétiques par la dérégulation d'enzymes spécifiques. Dans ce contexte, il est donc probable que les modifications épigénétiques associées avec les génomes AAVr diffèrent de celles rencontrées dans un muscle sain.

## 4.2. Métabolisme de l'ARN et régulations post-transcriptionnelles

La molécule d'ADN et les protéines associées portent ensemble les informations requises pour la synthèse d'ARNm à partir des unités de transcription, dans chaque tissu et à chaque stade du développement. Mais avant de servir de patron pour la synthèse des protéines, ces molécules d'ARNm peuvent elles-mêmes être sujettes à régulation, aussi bien à l'intérieur du noyau qu'une fois exportées dans le cytoplasme. Cette dernière partie a pour but de détailler certains de ces mécanismes de régulation, qui mettent en jeu aussi bien des protéines que des ARN particuliers ne codant pas pour des protéines (ARN non-codants). Ces champs disciplinaires émergents élargissent notre vision de la régulation de l'expression des gènes, sans la restreindre à la molécule d'ADN confinée au sein du noyau.

### 4.2.1. Processus transcriptionnel et génèse d'un ARN messager mature

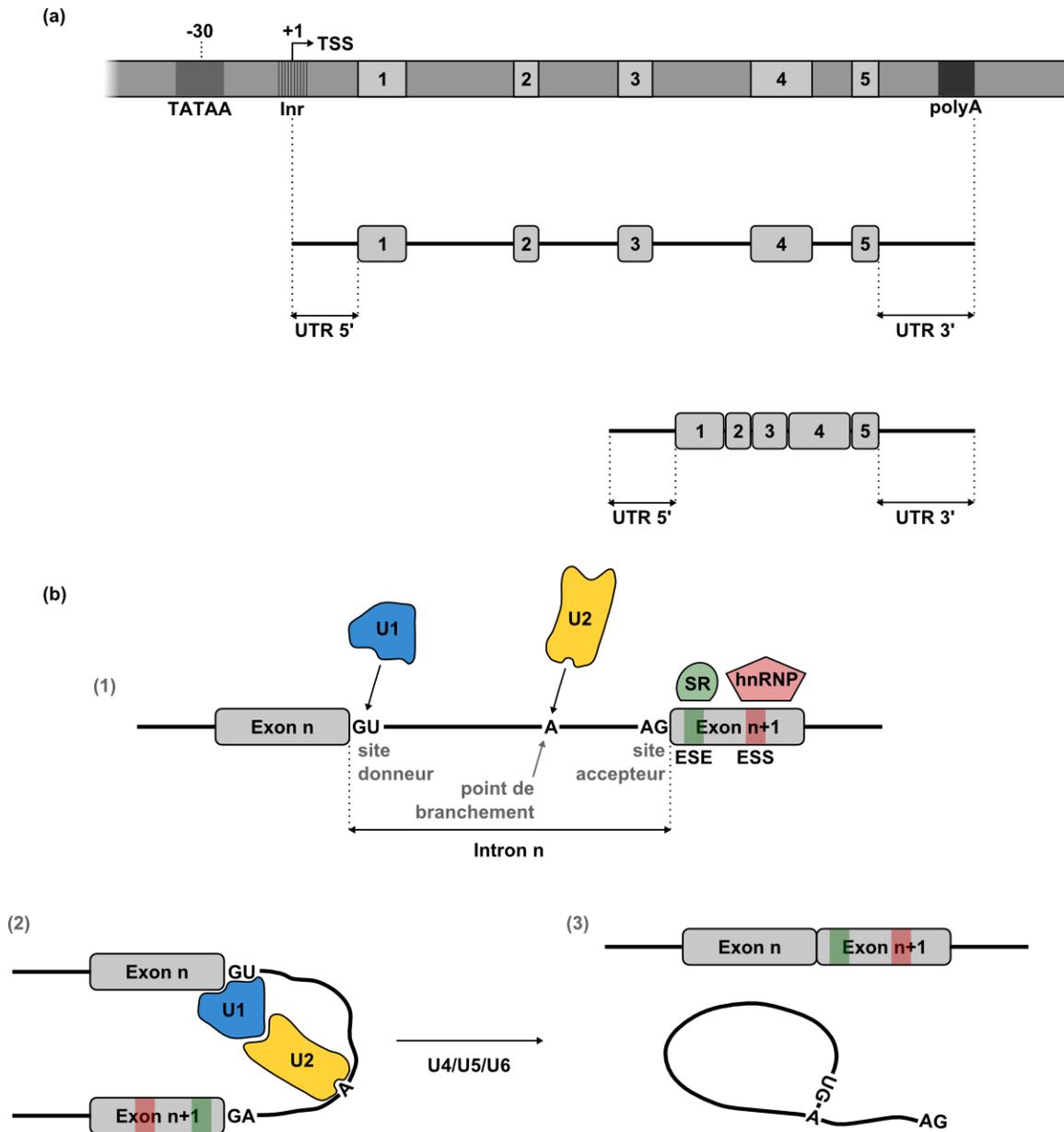
#### a. Concepts de base

Chez les eucaryotes, la production d'ARNm à partir des gènes codant pour des protéines est un processus assuré par la Pol II. Au niveau des promoteurs de ces gènes, elle s'associe avec des facteurs généraux de la transcription (TFII A/B/D/E/F/H) et forme le complexe de pré-initiation de la transcription ([Sainsbury 2015](#)). Outre le recrutement et la stabilisation de la Pol II, les facteurs TFII permettent notamment l'ouverture de la molécule d'ADN, et la reconnaissance du site d'initiation de la transcription (*transcription start site*, TSS). Suite à l'ancrage de ce complexe au niveau du promoteur, l'initiation de la transcription à partir du TSS a lieu sur

quelques dizaines de nucléotides, jusqu'à ce que la Pol II s'arrête et reste en « pause » ([Krumm 1995](#)). Ce n'est qu'après l'activation du facteur P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*) par des co-activateurs spécifiques que l'élongation de la transcription peut se poursuivre ([Marshall 1995](#)). Ceci montre comment les cellules peuvent dans un premier temps préparer l'expression d'un gène en recrutant le complexe d'initiation au niveau du promoteur, mais ne l'activer que sous certaines conditions. Cette « pause » de la Pol II après la synthèse des premiers nucléotides pourrait notamment favoriser l'ajout de la coiffe de 7-méthylguanosine en 5' de l'ARN néoformé (5'-m7G, [Rasmussen 1993](#)). Ce nucléotide modifié va jouer ensuite plusieurs rôles, protégeant notamment les ARNm de la dégradation par les exonucléases ou favorisant leur export nucléaire et leur traduction ([Topisirovic 2011](#)).

Suite à l'activation de P-TEFb et la libération de la Pol II, l'élongation transcriptionnelle peut avoir lieu, et aboutir à la synthèse de l'ARN pré-messager. La phase de terminaison de la transcription est loin d'être complètement élucidée chez les mammifères, mais dépend d'un signal de polyadénylation (polyA, pA) rencontré à la fin des unités de transcription, et qui mène à la formation d'une « queue polyA » en 3' des molécules d'ARN néo-formées ([Porrua 2015](#)). La **Figure 26a** schématise les grandes régions fonctionnelles d'une unité transcriptionnelle dans son contexte génomique, et celles du transcrit pour lequel elle code.

Dès le début de l'élongation transcriptionnelle, l'épissage de l'ARN pré-messager néoformé peut également se produire, grâce auquel les introns sont éliminés et les exons liés entre eux. Cette étape dépend de plusieurs facteurs régulateurs, certains exerçant leur action en *cis* (sites donneurs et accepteurs du transcrit), et d'autres en *trans* (facteurs protéiques d'épissage comme les protéines SR ou les *heterogenous ribonucleoproteins* (hnRNP) ([Douglas 2011](#), [Matera 2014](#) et **Figure 26b**). Plusieurs modèles d'épissage peuvent exister pour un même ARN pré-messager, aboutissant à plusieurs ARNm matures ayant parfois des fonctions différentes. Dans le génome humain, des études de séquençage à haut débit ont montré que ces événements alternatifs concernent plus de 90% des gènes codant pour des protéines ([Pan 2008](#)).



**Figure 26 :** Transcription et épissage chez les eucaryotes. (a) Schéma d'une région génomique comprenant un gène long de 5 exons numérotés. Le promoteur en amont comprend notamment une boîte consensus TATAA où s'assemble le complexe d'initiation de la transcription. Celle-ci débute au niveau du TSS et se termine aux alentours du signal de polyA. L'ARN produit comporte à ses extrémités les régions transcrites non traduites (*untranslated*, UTR). (b) Détails du mécanisme d'épissage. (1) Différentes séquences consensus sont reconnues par les *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP) U1 et U2 au niveau du site donneur et du point de branchement, respectivement. Des protéines SR et hnRNP peuvent aussi reconnaître des séquences favorisant (*Exon Splicing Enhancer*, ESE) ou inhibant (*Exon Splicing Silencer*, ESS) l'épissage de l'exon les portant. (2) L'interaction U1-U2 permet le rapprochement des deux exons et le recrutement des complexes ribonucléoprotéiques U4, U5 et U6. (3) Ces derniers permettent l'épissage de l'intron, libéré sous forme de "lasso".

Enfin, les ARN matures sont exportés dans le cytoplasme par les complexes des pores nucléaires. La réalisation de cette étape semble dépendre de la liaison de protéines spécifiques au niveau des différentes régions fonctionnelles des ARNm, notamment le complexe de jonction exon-exon, le complexe protéique de liaison à la coiffe (*cap-binding complex*, CBC), ou la protéine se liant à la queue polyA (*polyA-binding protein*, PABP) ([Le Hir 2001](#), [Moore 2009](#), [Katahira 2015](#)). Ainsi ne peuvent être exportés dans le cytoplasme que les ARNm coiffés, polyadénylés et correctement épissés.

Pour conclure ce paragraphe, il semble indispensable de mentionner les récents travaux publiés suite au projet ENCODE. Celui-ci a en effet mis en lumière l'existence d'environ 15000 longs ARN non codants dans le génome humain, dont les fonctions exactes commencent tout juste à émerger ([Derrien 2012](#)). Il semble que ces ARN soient particulièrement impliqués dans des processus de différenciation cellulaire, que ce soit pendant l'embryogenèse ou à l'âge adulte. Mécanistiquement, ils pourraient participer à la régulation de la plupart des étapes de l'expression génique, notamment au niveau épigénétique, de l'épissage ou de la stabilité des ARNm. Réaliser un tel inventaire sortirait du cadre de cette introduction. Toutefois, cela nous permet de constater que les processus régulant l'expression des gènes, à quelque étape que ce soit, ne sont encore que partiellement compris et que les acteurs y jouant un rôle ne sont pas encore tous identifiés.

## **b. Exemples tirés de l'étude de la myogenèse et de la DMD**

Comme nous l'avons vu dans la **partie 2.2**, le gène *DMD* possède plusieurs promoteurs qui dirigent l'expression d'isoformes spécifiques dans les différents tissus de l'organisme (**Figure 10**). L'expression des isoformes les plus longs à partir des promoteurs Dp427 est un processus long et complexe d'une durée estimée *in vitro* à environ 16 heures ([Tennyson 1995](#)). Tout comme les gènes musculaires dont l'expression n'est induite que durant la phase de différenciation, la protéine dystrophine n'apparaît pas avant l'étape de fusion des myoblastes *in vitro* ([Nudel 1988](#)). De plus, le gène *DMD* contient également des séquences régulatrices caractéristiques telles que les boîtes CArG (CC(A/T)nGG), les séquences consensus Muscle-CAT ou les boîtes E ([Klamut 1989](#), [1997](#), [Gilgenkrantz 1992](#)). Celles-ci permettent le recrutement de coactivateurs musculaires spécifiques et l'expression de l'isoforme musculaire de l'ARN *DMD* dans les myotubes différenciés.

Cet ARN n'est cependant pas le seul à être généré à partir du locus *DMD*. Une étude

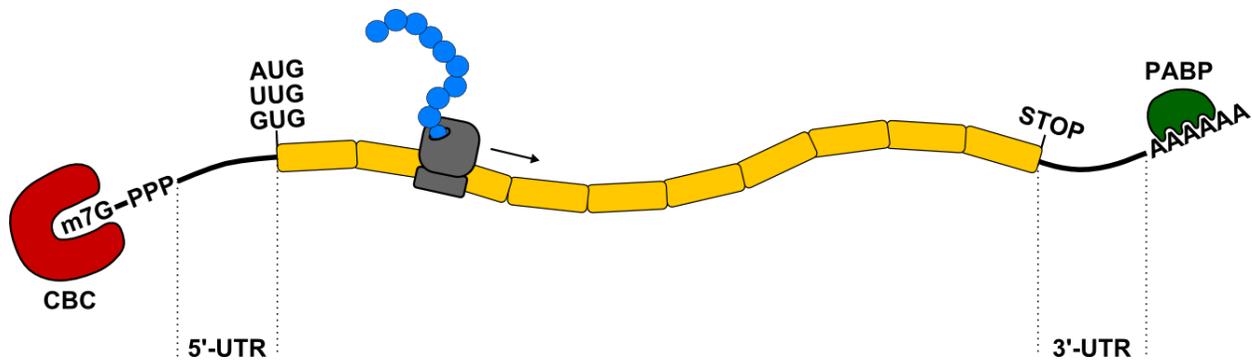
récente a montré la genèse de longs ARN non-codants à partir de certaines séquences introniques ([Bovolenta 2012](#)), dont la fonction reste pour l'instant hypothétique. Toutefois, leur proximité avec les différents promoteurs du gène *DMD* suggère qu'ils pourraient permettre de réguler l'expression des différents isoformes de la dystrophine. De manière générale, il semble de plus en plus évident que la régulation de la myogenèse repose sur ce type de régulation et fasse intervenir de nombreux autres longs ARN non codants ([Neguembor 2014](#)).

Les processus d'épissage tiennent une place de choix dans l'étude de la génétique et de la thérapie génique de la DMD. Environ 2,8 % des mutations recensées à ce jour chez les patients DMD touchent des sites importants pour l'épissage du gène ([http://umd.be/TREAT\\_DMD/](http://umd.be/TREAT_DMD/)), tout comme la mutation présente chez le modèle canin GRMD ([Sharp 1992](#)). De plus, l'une des options thérapeutiques les plus avancées à l'heure actuelle vise à modifier artificiellement l'épissage du transcrit *DMD* muté par un saut d'exon (**partie 3.1.2**). Avec ses 78 introns, le gène *DMD* s'étale sur plus de 2 millions de paires de bases d'ADN. Pour l'isoforme musculaire, l'ARN pré-messager aurait donc une longueur finale de 2.2 mégabases. Toutefois, son épissage a été détecté de manière co-transcriptionnelle ([Tennyson 1995](#)). Par ailleurs, l'épissage de cet ARN aboutit à la formation de multiples transcrits alternatifs comprenant un ensemble d'exons spécifiques ([Sironi 2002](#), [Nishida 2015](#)). La fonction exacte de ces variants reste à déterminer, mais plusieurs d'entre eux semblent être particulièrement enrichis dans certains tissus, suggérant un rôle fonctionnel important.

## 4.2.2. Traduction de l'ARNm dans le cytoplasme par les ribosomes

### a. Concepts de base

Suite à leur export dans le cytosol, les ARNm correctement coiffés, épissés et porteurs d'une queue polyA vont pouvoir servir de substrat pour la traduction (**Figure 27**). Cette étape fait intervenir les ribosomes et se déroule soit au niveau du réticulum endoplasmique granuleux (protéines sécrétées ou membranaires), soit dans le cytoplasme ([Mandon 2013](#)). Elle débute au niveau du premier codon initiateur rencontré en 5' du transcrit (AUG, GUG ou UUG) et se termine au premier codon stop rencontré en phase (UAG, UAA ou UGA). Toutefois, cette vision assez simpliste s'est récemment complexifiée avec l'émergence des techniques récentes de séquençage à haut débit des ARN en cours de traduction (*ribosome profiling*, [de Klerk 2015a](#)).



**Figure 27** : Schéma d'un ARN messager épissé en cours de traduction dans le cytosol. Les exons sont représentés par des boîtes jaunes, et les régions UTR par des lignes noires. En 5', une guanosine méthylée en position 7 (m7G) constitue la coiffe, à laquelle se lie le complexe protéique CBC. En 3', une chaîne d'adénine constitue la queue polyA, à laquelle se lie la protéine PABP. Les ribosomes (en gris) scannent l'ARNm depuis le codon initiateur en 5' (AUG, UUG ou GUG) jusqu'au codon STOP (UAA, UAG, UGA) et synthétisent une chaîne polypeptidique.

L'avènement de ces techniques a mis en évidence l'envergure insoupçonnée des régulations traductionnelles et la variabilité qu'elle peut générer. C'est ainsi qu'ont été caractérisés des phénomènes répandus d'initiation alternative de la traduction, parfois au niveau de codons initiateurs non-AUG (UUG ou GUG), ou encore la synthèse de peptides régulateurs potentiels en 5' du cadre de lecture principal ([Ingolia 2011](#), [Lee 2012](#), [de Klerk 2015b](#)).

#### b. Exemples tirés de l'étude de la myogenèse et de la DMD

Concernant l'étude de la myogenèse, l'importance de ces régulations au niveau traductionnel n'est pas à sous-estimer. Une étude récente a montré qu'elles concernaient plus de 300 gènes lors de la différenciation de myoblastes C2C12 ([de Klerk 2015b](#)). Chez l'Homme, une étude récente a démontré l'existence d'un site d'initiation interne de la traduction (*Internal Ribosome Entry Site*, IRES) au niveau de l'exon 5 du gène *DMD* (**Figure 10**), permettant la traduction de la dystrophine chez des patients porteurs de mutations spécifiques ([Wein 2014](#)).

#### 4.2.3. Régulation de la stabilité de l'ARNm par des protéines spécifiques

Nous venons de voir que les molécules d'ARNm sont des intermédiaires moléculaires dont la fonction principale est de délivrer dans le cytoplasme le message servant à la production des protéines par les ribosomes. Afin d'assurer cette fonction, les molécules d'ARNm sont prises en charge par une famille de protéines possédant des domaines de liaison spécifiques. Ces

protéines sont capables d'assurer la localisation correcte et la stabilité des molécules d'ARNm, mais aussi parfois leur dégradation. Cette partie explore quelques uns des mécanismes mis en jeu lors de ces régulations post-transcriptionnelles.

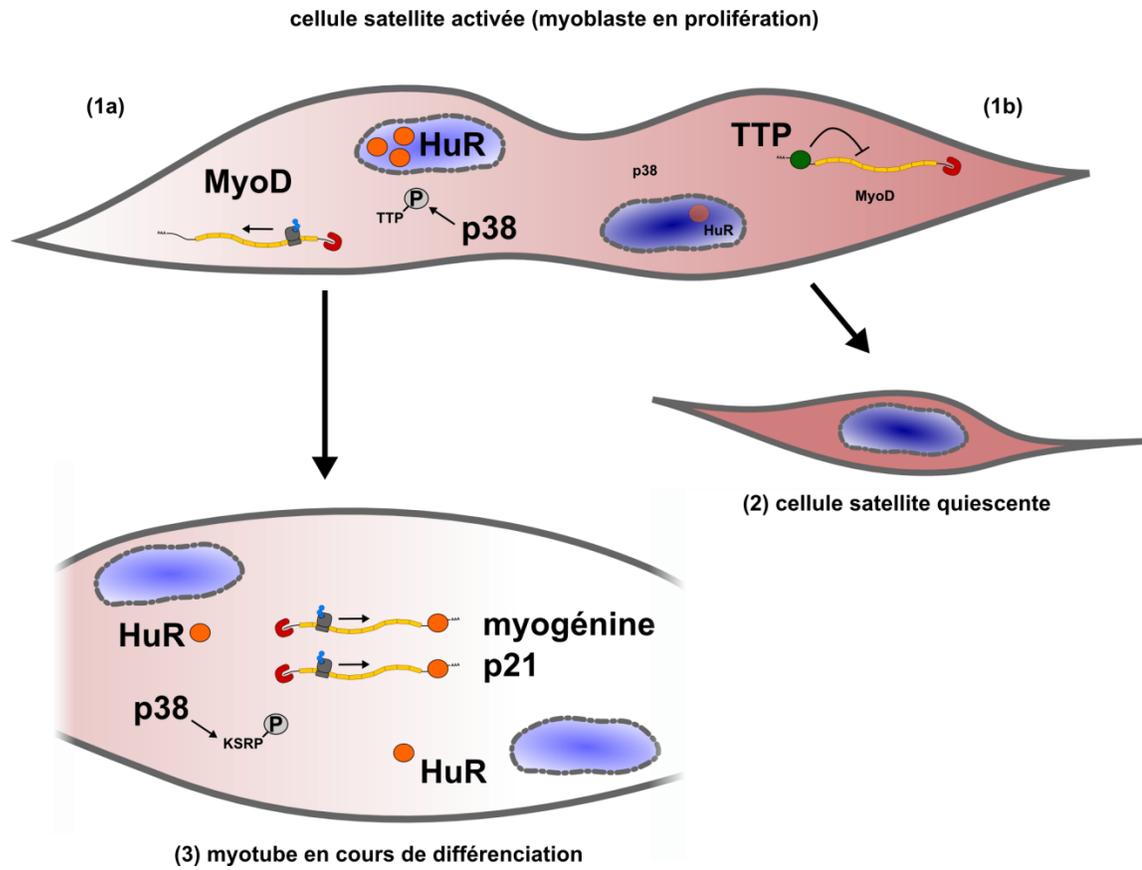
### a. Concepts de base

Ces dernières années, un ensemble de techniques combinant la précipitation de complexes ARN - protéines (soit au moyen d'anticorps ou d'oligonucléotides spécifiques) au séquençage à haut débit ou à la spectrométrie de masse ont permis d'augmenter notre compréhension du métabolisme des ARN. Ceux-ci établissent de nombreuses interactions avec des protéines spécifiques, les *RNA Binding Proteins* (RBP, [de Klerk 2015a](#)). Le nombre de RBP caractérisées ne cesse de croître et est estimé aujourd'hui chez l'Homme à plus de 800 ([Castello 2012](#)). Les RBP se fixent sur des séquences spécifiques des ARNm, notamment des séquences riches en nucléotides adénine ou uracile (*AU-rich elements*, ou ARE).

### b. Exemples tirés de l'étude de la myogenèse et de la DMD

Pendant la prolifération ou la différenciation des myoblastes, les ARNm de certains régulateurs myogéniques peuvent être la cible des RBP HuR (*human antigen R*) et KSRP (*K-homology splicing regulator protein*) ([Figueroa 2003](#), [Briata 2005](#)). Ces deux protéines semblent posséder des rôles antagonistes, étant capables de stabiliser (HuR) ou de déstabiliser (KSRP) les ARNm codant pour MyoD, myogénine ou encore le régulateur du cycle cellulaire p21 (**Figure 28**). De la même manière, la protéine tristétraproline (TTP) se lie aux séquences ARE et recrute un complexe impliqué dans la déadénylation et la dégradation des ARNm ([Hau 2007](#)). Dans les cellules satellites quiescentes, l'ARNm *Myod* est ciblé et dégradé par l'intermédiaire de sa liaison avec TTP. Mais l'activation de la voie p38 / MAPK lors de l'activation de ces cellules entraîne la phosphorylation de TTP et inhibe sa liaison à l'ARNm *Myod*, favorisant ainsi la traduction de cet ARN et l'expression de ce régulateur ([Hausburg 2015](#)).

D'un point de vue plus translationnel, une étude a montré que KSRP déstabilisait également l'ARNm de l'utrophine, mais que ce processus était inhibé lorsque la RBP était phosphorylée par la kinase p38 ([Amirouche 2013](#)). Les auteurs ont donc administré à des souris mdx de l'héparine, un activateur de la voie p38, et observé une augmentation de l'expression de l'utrophine dans le diaphragme, potentiellement à même d'apporter un bénéfice thérapeutique.



**Figure 28 :** Aperçu de la régulation de la myogenèse au niveau post-transcriptionnel, par l'intervention de protéines RBP. L'activation des cellules satellites s'accompagne de la répartition asymétrique de p38, entraînant la phosphorylation de TTP dans une seule cellule fille. Sous forme phosphorylée, TTP perd son affinité pour l'ARNm *Myod*, permettant sa stabilisation et sa traduction (1a). Dans la partie gauche de la cellule, TTP demeure déphosphorylée et déstabilise l'ARNm *Myod* par déadénylation (1b). La cellule fille résultante retourne à l'état quiescent (2). L'induction de la différenciation s'accompagne de l'export de la protéine HuR dans le cytoplasme, permettant la stabilisation de différents ARNm (*Myog*, *p21*, et *Myod* lui-même). Dans le même temps, p38 phosphoryle KSRP, diminuant son affinité pour l'ARN et donc la déstabilisation induite par cette protéine (3).

En plus d'être contrôlée par des mécanismes épigénétiques, la myogenèse est donc également régulée de manière précise au niveau post-transcriptionnel. Par la liaison à des protéines spécifiques présentes à certains moments lors des phases de quiescence, prolifération ou différenciation, les ARNm des principaux régulateurs myogéniques sont stabilisés ou déstabilisés, modifiant la durée durant laquelle ils peuvent servir de substrat pour les ribosomes.

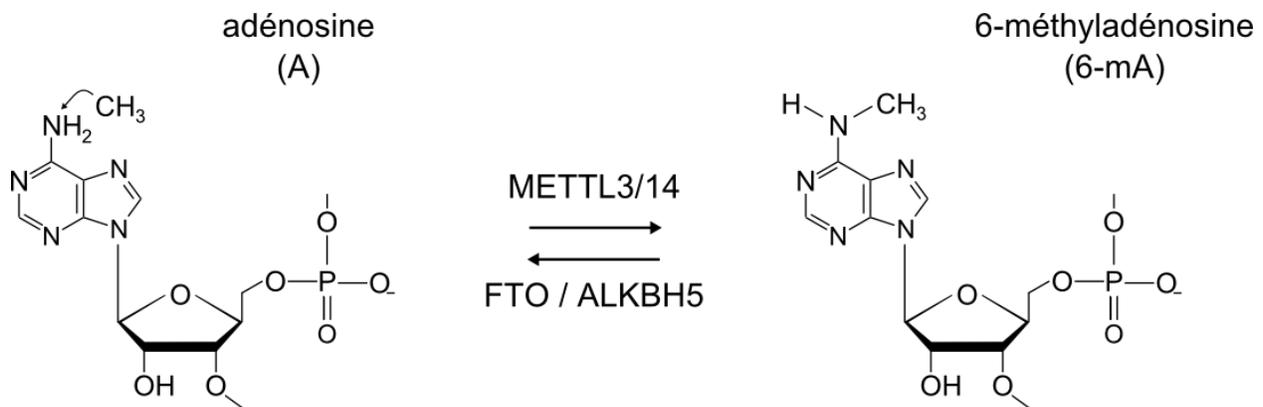
#### 4.2.4. Modifications chimiques de l'ARN

La régulation de la stabilité et de la traduction des ARNm semble donc dépendre à la fois de protéines spécifiques, mais aussi de la présence de séquences particulières permettant leur fixation au sein même des ARNm. La modification de ces séquences par addition de groupements chimiques sur les nucléotides *in situ* est donc à même de perturber les interactions entre les ARNm et ces protéines et donc leur prise en charge dans le cytosol.

##### a. Concepts de base

À l'heure actuelle, plus d'une centaine de modifications ont été décrites sur l'ARN, dont une dizaine touchant les ARNm eucaryotes (<http://mods.rna.albany.edu/home>, <http://modomics.genesilico.pl/>). Parmi elles, la méthylation de l'atome d'azote N°6 de l'adénine (6-mA, **Figure 29**) est la plus fréquemment retrouvée, et par conséquent la plus couramment étudiée ([Meyer 2014](#)). Comme pour la méthylation des CpG de l'ADN, des enzymes spécifiques sont capables d'ajouter ou d'ôter ce groupement méthyl, impliquant des phénomènes actifs ([Liu 2014](#)). À l'échelle du transcriptome humain ou murin, cette modification est particulièrement présente dans la région entourant les codons STOP et dans une moindre mesure, au niveau des TSS ([Dominissini 2012](#)). Fonctionnellement, la présence de 6-mA sur les ARNm semble être plutôt un facteur déstabilisateur, affectant notamment les ARNm des gènes contrôlant la pluripotence au sein des cellules souches embryonnaires murines. En effet, en l'absence de méthylation, les transcrits de certains régulateurs de pluripotence sont stabilisés et les cellules embryonnaires perdent leurs capacités de différenciation ([Geula 2015](#)). La méthylation de l'ARNm, et plus généralement l'épitranscriptome dans lequel elle s'inscrit, restent toutefois des domaines d'études émergents dont les implications restent à déterminer. Néanmoins, ces études confirment que la présence de modifications chimiques sur les molécules d'ARNm est susceptible de modifier leur stabilité.

À l'inverse de ce phénomène régulé de manière active, les molécules d'ARNm peuvent aussi endurer des modifications chimiques causées par des conditions environnementales particulières. L'un des événements les plus étudiés se produit lorsque les ARNm sont métabolisés dans un environnement cellulaire soumis à un stress oxydatif. L'étude de l'oxydation de l'ARN a été presque exclusivement focalisée sur l'hydroxylation des guanines en position 8 (8-OHG, mécanisme similaire à celui rapporté sur la **Figure 13**). La guanine étant la



**Figure 29 :** Méthylation des ribonucléotides adénosines monophosphate de l'ARN. Les enzymes impliquées sont les suivantes : le complexe multiprotéique *Methyltransferase-like* (METTL) 3 et 14 ; *Fat mass obesity-associated protein* (FTO) ; *Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase homolog 5* (ALKBH5).

base azotée possédant le potentiel oxydant le plus fort, il est possible qu'*in vivo*, cette modification soit la plus favorisée en présence de ROS ([Steenken 1997](#)). À l'aide d'un anticorps monoclonal, plusieurs équipes ont pu détecter la présence d'ARNm oxydé dans différents tissus pathologiques. Le tissu cérébral de patients atteints par la maladie d'Alzheimer présente par exemple des taux d'ARN oxydé importants ([Shan 2003, 2006](#)). Cette oxydation semble même être sélective et ne toucher que des transcrits spécifiques en lien avec le développement de la maladie ([Shan 2003, 2006](#)). D'autres maladies neurodégénératives présentent un phénomène similaire, notamment la sclérose latérale amyotrophique ([Chang 2008](#)), la maladie de Parkinson ([Zhang 1999](#)) ou encore la schizophrénie ([Jorgensen 2013](#)).

### b. Exemples tirés des maladies touchant le système musculaire

Concernant les maladies musculaires, l'oxydation de l'ARNm est un phénomène moins décrit, et a simplement été étudié dans des cas de myopathies à corps d'inclusion ([Tateyama 2003](#)). Cependant, dans le contexte du vieillissement cellulaire, une équipe a observé que les muscles de rats âgés présentaient des taux de 8-OHG plus élevés que les muscles de rats jeunes ([Hofer 2008](#)). Dans la mesure où certains phénotypes de la DMD se rapprochent de ceux observés dans un muscle vieillissant (notamment le stress oxydatif), il n'est pas exclu que l'oxydation de l'ARN soit également particulièrement élevée dans les muscles déficients en dystrophine.

#### 4.2.5. Contrôle qualité des ARNm

La traduction fait intervenir la complémentarité entre les codons de l'ARNm et les bases des ARN de transfert (ARNt) portant les acides aminés. Ceci n'a lieu que grâce à l'établissement de paires de Watson-Crick A-U et G-C entre les deux molécules d'ARN, et donc grâce aux liaisons hydrogènes établies spécifiquement entre les paires de bases. Dans ce cadre, toute modification de structure de l'ARNm empêchant l'établissement de ces liaisons est à même de perturber l'action des ribosomes et la traduction. Les cellules ont donc évolué de façon à détecter de telles modifications et réguler le devenir des ARNm les présentant.

##### a. Concepts de base : NMD, NGD et SMD

Le *nonsense-mediated decay* (NMD) est un mécanisme bien caractérisé, permettant notamment la dégradation des ARNm portant des codons STOP prématurés ([Kervestin 2012](#)). Toutefois, d'autres familles d'ARNm peuvent aussi emprunter cette voie de dégradation, notamment ceux possédant une longue région UTR 3' ([Yepiskoposyan 2011](#)). Le processus de NMD met en jeu différentes familles de protéines, parmi lesquelles les protéines Upf et les protéines Smg, associées en un complexe protéique au niveau du ribosome. Ces différents facteurs sont capables de désengager et recycler le ribosome de l'ARNm et de la chaîne polypeptidique, tout en dégradant ces deux derniers ([Kervestin 2012](#)). Le mécanisme grâce auquel ces protéines distinguent un codon STOP prématuré d'un codon STOP normal reste toutefois peu documenté. L'hypothèse privilégiée est que les complexes protéiques autour du ribosome ont leur importance, notamment ceux formés en amont des jonctions exon-exon, ou au niveau de la région UTR 3' ([Celik 2015](#)).

Lorsque le ribosome se trouve confronté à une structure secondaire, une conformation particulière ou un codon auquel il ne peut pas associer d'ARNt, il se bloque sur l'ARNm, ce qui enclenche la voie du *no-go decay* (NGD) ([Doma 2006](#)). Ce mécanisme mis en évidence chez la levure fait appel à un clivage endonucléolytique de l'ARNm au niveau du ribosome, suivi d'une dégradation des deux fragments depuis le site de clivage. Chez la levure, ces dégradations sont effectuées par l'exosome (dégradation 3' → 5') et par l'exonucléase Xrn1 (5' → 3') ([Doma 2006](#), [Tsuboi 2012](#)). Le NGD est notamment activé en présence d'ARNm oxydé, c'est à dire lorsque le ribosome scanne un résidu 8-OHG ([Shan 2007](#)). Ceci entraîne l'arrêt de la traduction, le désengagement du ribosome, la genèse de peptides tronqués et probablement détruits, et la

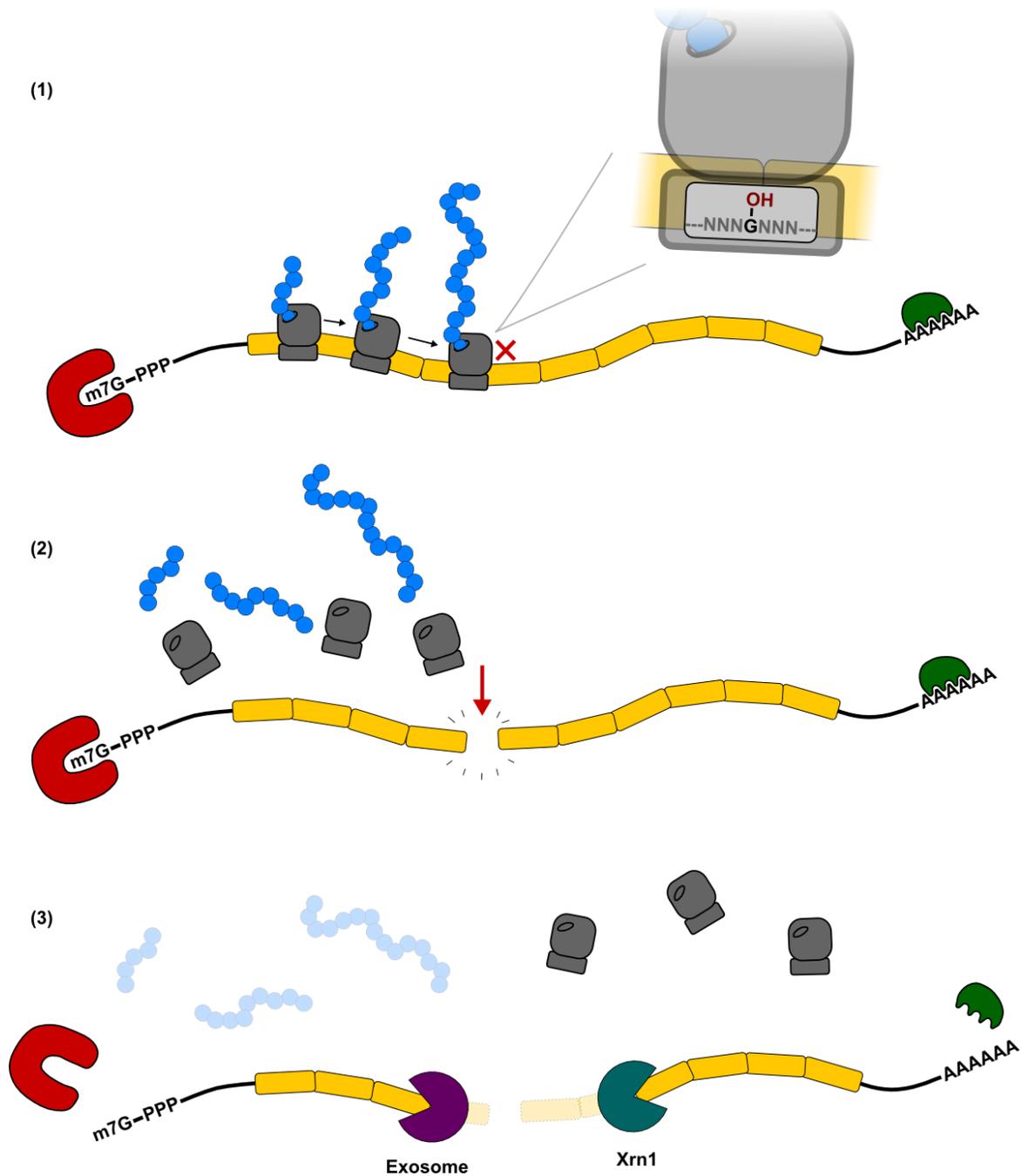
dégradation de l'ARNm oxydé ([Tanaka 2007](#), [Simms 2014](#)) (**Figure 30**).

La dégradation des ARNm n'est pas toujours causée par des phénomènes accidentels comme la présence de codons STOP prématurés (qui peuvent avoir été induits par des mutations ou des erreurs d'épissage) ou de dommages oxydatifs. Certaines voies de régulation physiologiques font appel à une dégradation contrôlée de populations d'ARNm spécifiques à certains moments de la vie cellulaire. Par exemple, la protéine Stau1 est capable de se fixer sur des sites de liaison spécifiques dans les régions UTR 3' de certains ARNm et peut entraîner leur dégradation par *Staufen-mediated decay* (SMD). Ce mécanisme fait aussi appel à la protéine Upf1 ([Kim 2005](#)). Cette dernière est donc impliquée à la fois dans le NMD et le SMD, de manière mutuellement exclusive ([Gong 2009](#)).

### **b. Exemples tirés de l'étude de la myogenèse et de la DMD**

De manière intéressante, la protéine Upf1 est régulée par phosphorylation / déphosphorylation, notamment grâce à la phosphatase PP2A ([Ohnishi 2003](#)). Or, nous avons vu dans la **partie 4.1.2.c** que l'activité et la localisation de cette enzyme est dérégulée chez des souris mdx ([Colussi 2009](#)). De plus, une étude récente a montré que le NMD était inhibé par de fortes concentrations en ions  $Ca^{2+}$  cytoplasmiques ([Nickless 2014](#)), que l'on sait également être l'une des conséquences de l'absence de dystrophine ([Geissinger 1990](#), [Mallouk 2000](#)). Même si aucune étude formelle ne semble avoir étudié ce phénomène en détail, ces deux observations suggèrent que le NMD pourrait être dérégulé dans les muscles déficients en dystrophine.

L'expression d'un gène dépend de nombreux facteurs. L'efficacité de la Pol II à synthétiser un ARN messager à partir du substrat chromatinien est affectée à la fois par les modifications épigénétiques portées par l'ADN ou les protéines histones, et par certaines classes d'ARN non-codants. Des études récentes tendent d'ailleurs à montrer l'interdépendance de ces deux facteurs de variabilité. De plus, la molécule d'ARN pré-messager néo-formée subit ensuite un épissage pouvant aussi être régulé de manière différentielle. Enfin, des régulations de type épitranscriptomiques peuvent aussi avoir lieu dans le cytoplasme, de manière directe ou par l'intermédiaire de protéines dédiées. Enfin, la traduction est une étape supplémentaire pendant laquelle une diversité de peptides peut être générée à partir de l'ARNm. Tous ces niveaux de régulation permettent la coordination de l'expression des gènes lors du processus de développement cellulaire. Dans ce cadre, la myogenèse est sans doute l'une des disciplines les



**Figure 30 :** Devenir moléculaire d'un ARNm oxydé. (1) Au niveau d'un résidu 8-OHG, le ribosome est bloqué sur l'ARNm. (2) Ceci enclenche le mécanisme de NGD, dont la première étape entraîne un clivage endonucléolytique de l'ARNm et le désengagement du ribosome. (3) Les ribosomes sont recyclés, les chaînes polypeptidiques tronquées finissent vraisemblablement par être détruites, tandis que l'ARNm oxydé est dégradé par deux machineries protéiques : l'exosome (dégradation dans le sens 3' → 5') et Xrn1 (dégradation dans le sens 5' → 3').

plus étudiées. Comme nous l'avons mentionné à de multiples reprises, le muscle déficient en dystrophine est affecté par de nombreuses perturbations épigénétiques et potentiellement épitranscriptomiques, à même d'avoir un impact sur l'expression de transgènes thérapeutiques véhiculés par des vecteurs de thérapie génique, notamment des AAVr.

## **5.Synthèse**

Au terme de cette étude bibliographique, nous pouvons dégager plusieurs observations générales sur la thérapie génique du muscle déficient en dystrophine :

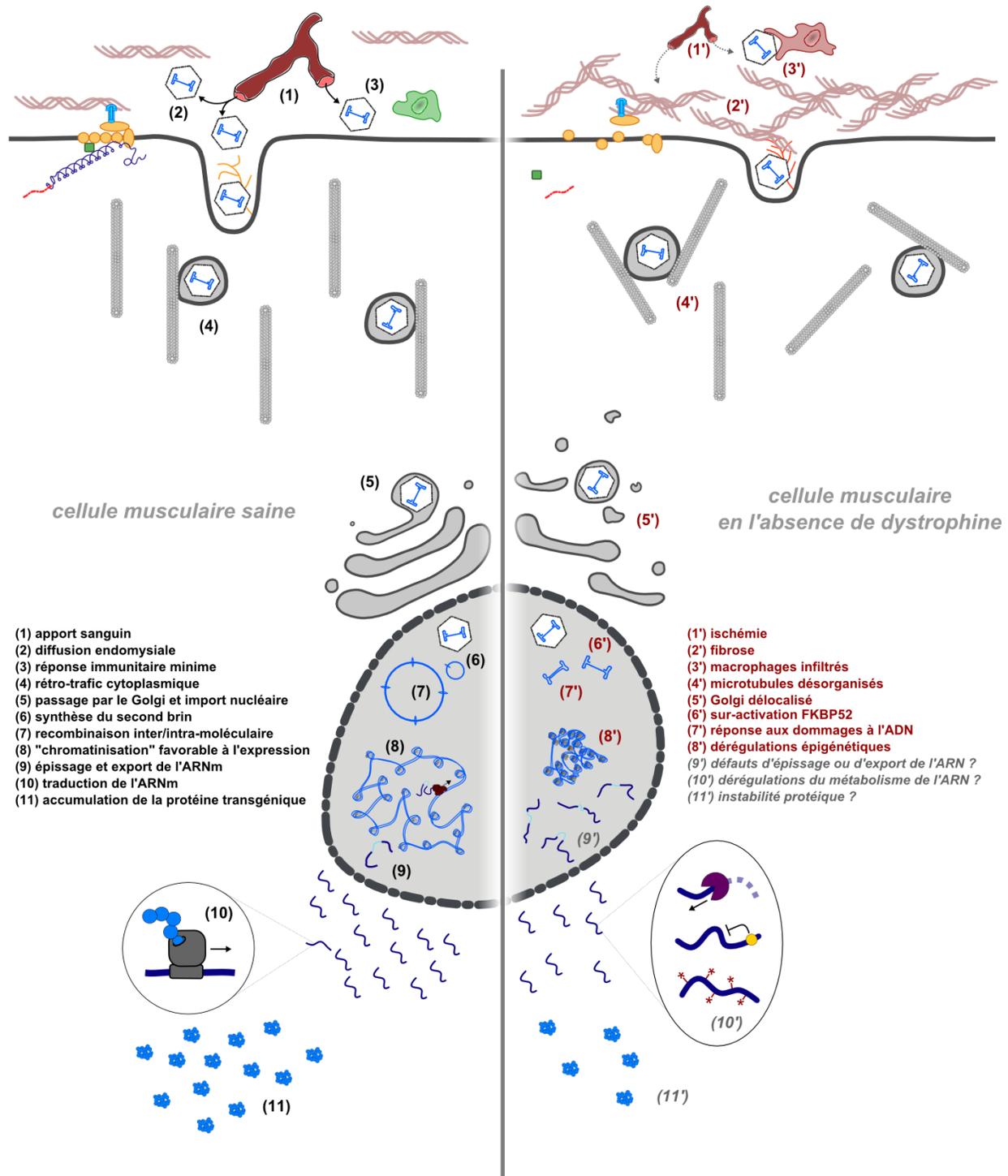
- Le muscle déficient en dystrophine est un tissu à part entière. Aussi bien par son architecture cellulaire que son métabolisme ou son état prolifératif, il présente de nombreuses différences avec un muscle sain, en situation d'homéostasie.
- Les vecteurs AAV recombinants sont probablement les outils biologiques les plus efficaces pour transférer un fragment d'ADN exogène dans des cellules musculaires *in vivo*. Leur capacité à y persister et y établir une expression durable du transgène a permis la mise sur le marché du premier médicament de thérapie génique autorisé par les agences réglementaires européennes.
- Pour persister à long terme *in situ*, les vecteurs AAVr sont dépendants des machineries cellulaires des cellules hôtes. Si ces mécanismes sont à l'heure actuelle assez bien décrits dans un tissu musculaire sain, aucune étude ne les a étudiés de manière formelle dans un muscle déficient en dystrophine.
- Pourtant, presque toutes les étapes de la transduction d'une cellule musculaire par un vecteur AAVr peuvent potentiellement être affectées dans ce contexte. (**Figure 31**).

Les différences mises en lumière dans la **Figure 31** (et reprises en détails dans la **Discussion**) sont peut-être à même d'expliquer pourquoi les doses de vecteurs nécessaires à l'obtention d'un bénéfice thérapeutique sont si importantes chez les modèles animaux de la DMD. Une fraction des particules de vecteur injectées pourrait en effet mener à des événements de transduction abortifs et ne pas participer à l'expression du transgène. L'une des solutions possibles pour pallier à ce défaut d'efficacité pourrait consister à encore augmenter les quantités de vecteurs injectées, dans l'espoir de dépasser une « dose seuil » fictive au-delà de laquelle l'expression du transgène est maintenue à long terme. Même si les vecteurs AAVr sont

d'ordinaire considérés comme sécuritaire tant du point de vue immunogénique que carcinogénique, des études récentes suggèrent que certaines situations sont à même d'augmenter leur dangerosité. À cause de son contexte immunologique particulier et de son instabilité génomique à long terme, le muscle déficient en dystrophine pourrait représenter une telle situation. Ceci ajouté à la difficulté et au coût de la production de quantités si importantes de vecteurs, et à l'absence de caractérisation exhaustive des lots d'AAVr produits, nous laisse à penser qu'augmenter davantage la dose injectée n'est probablement pas la solution la plus pertinente.

Une autre option pourrait consister à agir non pas sur les vecteurs eux-mêmes, mais plutôt sur les cellules cibles au sein des muscles atteints. En effet, améliorer le contexte tissulaire dans lequel seront amenés à évoluer les vecteurs AAVr et le rendre plus similaire à un tissu musculaire sain (dans lequel l'efficacité des vecteurs AAVr n'est plus à prouver) pourrait permettre de diminuer cette « dose seuil » à injecter. Ceci pourrait être réalisé par un traitement pharmacologique transitoire utilisant une molécule efficace pour améliorer le phénotype musculaire. Néanmoins, comme le montre le Tableau 3, les solutions pharmacologiques à disposition chez les souris mdx sont très nombreuses, ciblent des manifestations différentes de l'atteinte musculaire et n'auront probablement pas le même impact sur la transduction des vecteurs AAVr.

Avant de penser à la mise au point d'une telle stratégie, il est donc nécessaire d'étudier en détail le devenir moléculaire des vecteurs AAVr et du transgène qu'ils expriment dans un muscle déficient en dystrophine. L'identification de facteurs de restriction ayant un impact négatif sur la transduction est un prélude indispensable à la sélection d'un composé pharmacologique pertinent qui pourra dans un second temps servir de base pour l'élaboration d'un protocole innovant combinant thérapie génique et pharmacologie.



**Figure 31 :** Devenir moléculaire des vecteurs AAVr dans une cellule musculaire saine (gauche) ou déficiente en dystrophine (hypothèse, droite). Les numéros indiquent les différentes étapes de la transduction dans une cellule saine et les facteurs potentiels pouvant les inhiber dans les cellules déficientes en dystrophine. Les hypothèses appuyées par des éléments bibliographiques sont indiquées en rouge. Certaines de ces hypothèses seront également mentionnées dans la **Discussion**.

## Étude I

**Étude du devenir moléculaire des génomes de vecteur AAVr et de l'ARNm du transgène dans le muscle squelettique déficient en dystrophine**

## Objectifs

La première partie de ce travail de thèse a consisté en une étude exploratoire menée à l'aide de modèles animaux de dystrophie musculaire de Duchenne, dont les résultats ont été publiés dans la revue scientifique *Molecular Therapy - Methods & Clinical Development* en Avril 2015. Dans ce manuscrit, ils seront donc présentés directement dans leur version publiée. Ce premier projet avait deux objectifs principaux :

- comparer de manière précise et quantifiée l'efficacité des vecteurs AAVr dans les muscles déficients en dystrophine par rapport à leur équivalent tissulaire sain ;
- identifier au besoin un ou plusieurs facteurs de restriction, c'est à dire des mécanismes moléculaires pathologiques ayant potentiellement un impact négatif sur une ou plusieurs étapes de la transduction de l'AAVr.

## Stratégie expérimentale

### Modèle animal et période d'étude

Pour cette première étude, clairement à visée exploratoire et mécanistique, nous souhaitons quantifier et comparer nos résultats de manière précise, afin de pouvoir évaluer l'influence respective des différents facteurs de restriction que nous avons examinés. Par conséquent, nous avons besoin de groupes d'animaux de taille raisonnable, permettant de détecter des effets mineurs entre deux conditions expérimentales par des tests statistiques. Dans un premier temps, il n'était donc pas envisageable ni pertinent d'utiliser un modèle gros animal, pour des raisons logistiques, financières et éthiques. Nous nous sommes donc tournés vers un modèle murin de la DMD. Bien que la souris mdx soit plus classiquement utilisée (mutation dans l'exon 23 du gène *Dmd* murin, **Figure 10**), nous nous sommes plutôt tournés vers un variant de ce modèle généré artificiellement par mutagenèse chimique, la souris mdx4Cv ([Chapman 1989](#)). Dans ce modèle, la mutation dans le gène *Dmd* est portée par l'exon 53, transformant un codon CAA (Gln) en TAA (STOP) ([Im 1996](#)). Les différences phénotypiques entre ces deux modèles sont minimales, exception faite du nombre de fibres révertantes, mesuré environ 10 fois plus faible chez la souris mdx4Cv à l'âge de 2 et 6 mois ([Danko 1992](#)). Ces dernières auront donc moins de

fibres ré-exprimant spontanément la dystrophine, susceptibles d'introduire un biais dans nos résultats. Concernant les souris saines employées comme contrôles, nous avons utilisé des souris C57BL/6J (B6), compte tenu du fond génétique des souris mdx4Cv (nom complet : C57BL/6Ros.Cg-Dmd<sup>mdx-4cv</sup>/J), et selon les indications du *Jackson Laboratory* (<http://jaxmice.jax.org/strain/002378.html>).

La caractérisation du phénotype des souris mdx montre que la pathologie débute par une vague de nécrose à l'âge de 3 semaines, et se poursuit de manière stable par des cycles de régénération / nécrose jusqu'à l'âge d'au moins 1 an ([Bulfield 1984](#), [Tanabe 1986](#)). À 120 jours, il a été estimé qu'à peu près chaque fibre musculaire des muscles des membres postérieurs était issue d'un épisode de nécrose post-natal ([Tanabe 1986](#)). Pour notre étude, nous nous sommes placés approximativement entre 5 et 14 semaines d'âge, après le premier épisode de nécrose et pendant une période où la pathologie dystrophique évolue de manière relativement stable. Cette partie d'expérimentation animale a été réalisée en collaboration avec le département de bioexpérimentation et le département d'histologie de Généthon (Évry).

Une fois l'identification d'un ou plusieurs facteurs de restriction, il nous a paru indispensable de tester leur validité dans un modèle plus pertinent du point de vue clinique. Dans cette optique, notre laboratoire mène plusieurs projets de recherche translationnelle chez le modèle canin GRMD, qui reproduit plus fidèlement l'atteinte musculaire de la DMD humaine comme nous l'avons mentionné dans l'introduction (**partie 2.3.2.a**). Notamment, 4 chiens ont été injectés par voie LR avec un vecteur AAVr2/8 exprimant une forme miniaturisée et optimisée de la dystrophine canine (cMD1, [Koo 2011](#)) sous le contrôle du promoteur c5-12. Ce projet collaboratif implique non seulement notre laboratoire, mais aussi le Généthon (Dr. Fulvio Mavilio), l'institut de myologie (Pr. Thomas Voit) et le Royal Holloway (Pr. George Dickson). Avec l'accord de l'ensemble des collaborateurs, nous avons pu récupérer et analyser des échantillons de muscles provenant des pattes injectées et non injectées de ces 4 chiens.

### **Vecteur AAVr utilisé et voie d'administration**

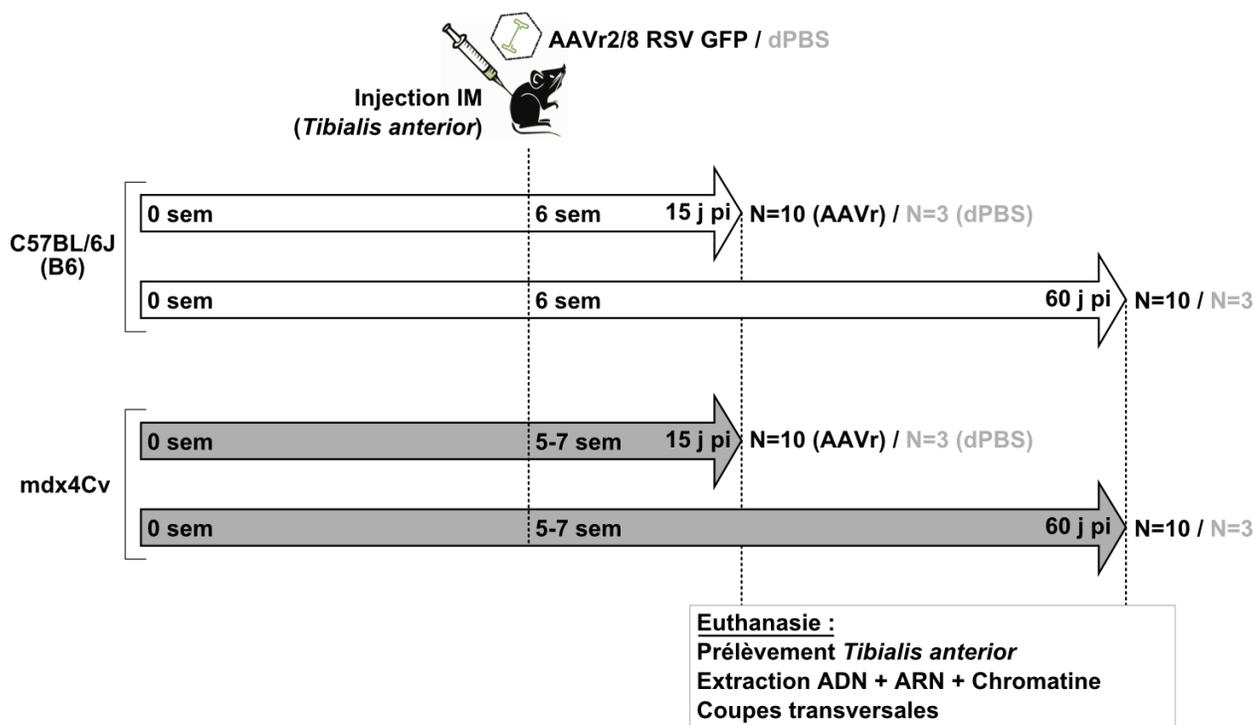
Comme mentionné précédemment, l'objectif de cette première étude était d'étudier l'impact du phénotype des souris mdx4Cv sur l'issue d'un protocole d'injection par un vecteur AAVr. Nous avons cherché à identifier des facteurs de restriction résultant plus ou moins

directement de l'absence de dystrophine, en interférant le moins possible avec le phénotype des souris. C'est pourquoi nous avons construit un génome de vecteur AAVr exprimant le transgène rapporteur codant pour la *green fluorescent protein* (GFP), n'apportant aucun bénéfice thérapeutique aux souris injectées. Même si l'expression de cette protéine exogène est susceptible d'entraîner une réponse immunitaire dans plusieurs espèces et lignées murine, ce ne semble pas être le cas chez la souris C57BL/6 ([Skelton 2001](#), [Mays 2009](#)). Enfin, la facilité de détection du signal GFP et de sa quantification par microscopie à fluorescence en font un transgène de choix pour notre étude.

Pour diriger l'expression de ce transgène dans le tissu musculaire, nous avons opté pour un promoteur RSV, similaire à celui utilisé lors de notre étude précédente chez le primate non-humain ([Léger 2011](#)). Sa robustesse dans les cellules musculaires a déjà été mise en évidence par notre équipe ainsi que dans d'autres études menées aussi bien chez le primate que chez la souris ([Salva 2007](#), [Chen 2008](#), [Toromanoff 2008](#), [Léger 2011](#)).

Entre notre promoteur et notre transgène, nous avons inséré un intron synthétique appartenant au plasmide pCI-Neo commercialisé par Promega, compte-tenu des études démontrant une efficacité supérieure des vecteurs contenant ce type de séquence en *cis* ([Lai 2006](#), [Wu 2008](#)). La présence de cet intron, situé en 3' du site d'initiation de la transcription du promoteur RSV ([Moblely 1998](#)), nous a également permis d'étudier séparément les ARNm *gfp* totaux et non épissés grâce à des PCR quantitatives dédiées.

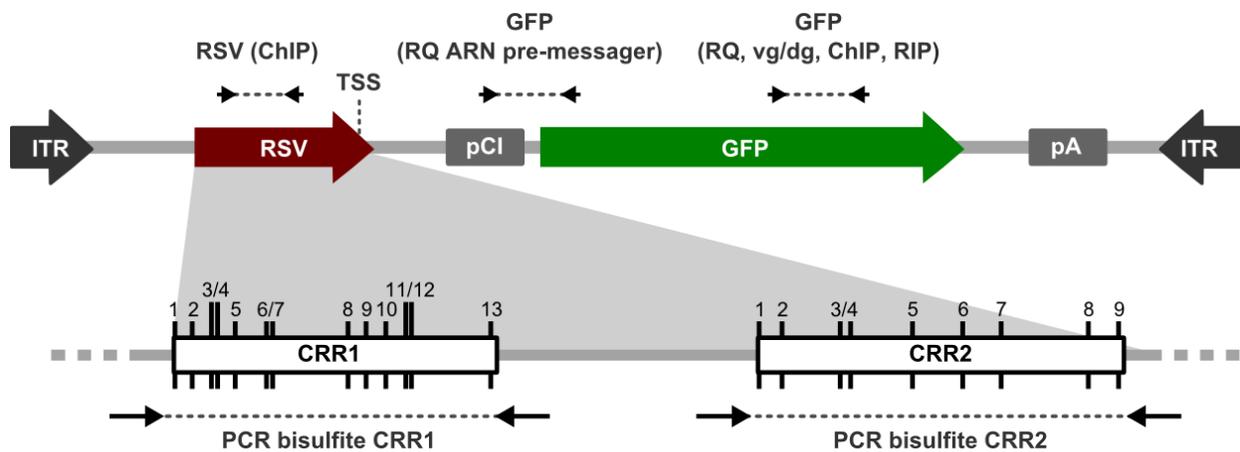
Afin de favoriser la transduction du tissu musculaire, nous avons utilisé une capsid de sérotype 8, connue pour son tropisme préférentiel pour ce tissu ([Wang 2005](#)), et avons injecté le vecteur par voie IM dans le *Tibialis anterior* (TA). Chez le primate, ce type d'injection est souvent associé à une immunotoxicité ([Toromanoff 2010](#)), notamment après injection d'un vecteur AAVr2/8 exprimant la GFP ([Gernoux 2015](#), manuscrit en préparation). Néanmoins, cette observation n'a pas été reproduite chez des souris C57BL/6J ayant reçu un vecteur AAVr2/8 exprimant la GFP par voie IM ([Mays 2009](#)). La **Figure 32** et le **Tableau 8** récapitulent les souris utilisées au cours de cette étude. La **Figure 33** schématise le génome du vecteur AAVr2/8 injecté, comprenant les deux régions riches en dinucléotides CpG (*CpG-rich regions*) du promoteur RSV, susceptibles d'être méthylées *in situ*, et les amorces ayant servi aux différentes réactions de PCR quantitative (qPCR).



**Figure 32 :** Récapitulatif du protocole d'injection et des souris utilisées dans l'étude I. Les flèches blanches (B6) et grises (mdx4Cv) indiquent les âges en jours (j) ou semaines (sem) auxquels les souris ont reçu le vecteur et ont été sacrifiées. On distingue ainsi 4 groupes de 13 souris, euthanasiées à 15 ou 60 jours après une injection d'un vecteur AAVr2/8 RSV GFP ( $5,0E10+10$  vg dans chaque TA) ou de Dulbecco's phosphate buffer saline (dPBS).

**Tableau 8 : Récapitulatif des souris utilisées lors de l'étude I**

souche	provenance	produit injecté	voie d'injection	dose injectée (vg)	âge à l'injection	âge à l'euthanasie	N
C57BL/6J	Charles River	AAVr2/8-RSV-GFP	IM (TA)	$1,0E+11$	6 semaines	8 semaines	10
C57BL/6J	Charles River	dPBS	IM (TA)	NA	6 semaines	8 semaines	3
C57BL/6J	Charles River	AAVr2/8-RSV-GFP	IM (TA)	$1,0E+11$	6 semaines	14 semaines	10
C57BL/6J	Charles River	dPBS	IM (TA)	NA	6 semaines	14 semaines	3
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	AAVr2/8-RSV-GFP	IM (TA)	$1,0E+11$	5-7 semaines	8 semaines	10
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	dPBS	IM (TA)	NA	5-7 semaines	8 semaines	3
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	AAVr2/8-RSV-GFP	IM (TA)	$1,0E+11$	5-7 semaines	14 semaines	10
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	dPBS	IM (TA)	NA	5-7 semaines	14 semaines	3



**Figure 33** : Schéma du vecteur AAVr2/8 RSV GFP utilisé dans l'étude I. La position de chaque dinucléotide CpG du promoteur RSV est indiquée par une barre verticale au sein des deux CRR, représentées sous le promoteur. Au-dessus du génome de vecteur, la position des amorces de qPCR ainsi que les protocoles les utilisant (entre parenthèses) sont également indiqués.

## Paramètres principaux mesurés et méthodes d'analyse

### Efficacité de l'expression du transgène

Grâce à l'utilisation d'un transgène rapporteur fluorescent, le niveau d'expression de notre protéine transgénique a pu être quantifié directement sur coupe de muscle injecté, en microscopie à épifluorescence. Par ailleurs, l'expression du transgène peut aussi être évaluée par la mesure de la quantité relative d'ARNm *gfp* (*relative quantity*, RQ) par rapport au gène de référence *Hprt* codant pour l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase. Pour ce faire, l'extraction d'ARN suivie d'une reverse-transcription (RT) puis d'une PCR quantitative (RT-qPCR) est la méthode de choix, de par sa mise en place relativement simple, sa robustesse et sa reproductibilité.

### Persistence du vecteur dans les tissus injectés :

De la même manière, ce paramètre peut être évalué en mesurant le nombre de copies de génomes de vecteur normalisé par génome diploïde hôte (vg/dg) par qPCR après extraction et purification d'ADN des tissus injectés.

## Activité spécifique du vecteur AAVr et du promoteur RSV

Nous avons appelé « activité spécifique » du vecteur AAVr le niveau relatif d'ARNm *gfp* généré par une quantité donnée de génomes de vecteur, *in fine* (c'est-à-dire après transcription et régulations post-transcriptionnelles). Ce paramètre a pu être approximé quantitativement en calculant pour chaque souris le ratio  $RQ / (vg/dg)$ , simplifié en  $RQ/vg$ . De la même façon, nous avons appelé « activité spécifique » du promoteur RSV le niveau relatif d'ARNm *gfp* non épissé, normalisé par  $vg/dg$ . Nous l'avons calculé en divisant  $RQ_{(ARN \text{ pré-messager})}$  par  $vg/dg$  pour chaque souris.

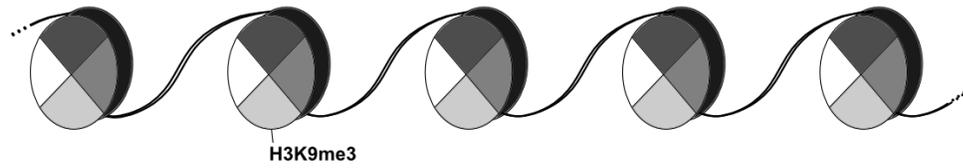
## Niveau de méthylation des CpG du promoteur :

Le profil épigénétique au niveau du promoteur RSV de notre vecteur a pu être évalué dans un premier temps par une quantification du taux de méthylation de deux CRR. Ceci a fait appel à la méthode de conversion au bisulfite de sodium des ADN extraits des muscles injectés, très largement employée. Cette stratégie est basée sur la capacité du bisulfite à réagir de manière spécifique avec les cytosines non-méthylées de l'ADN et les transformer en uraciles, tout en laissant intactes les cytosines méthylées. Suite à ce traitement, les échantillons peuvent être séquencés afin de discriminer les dinucléotides CpG porteurs d'un groupement méthyl. Pour cette dernière étape, nous avons fait appel à la technologie Illumina MiSeq de séquençage à haut débit, qui nous a permis d'obtenir une carte détaillée du promoteur avec, pour chaque position CpG, le pourcentage de méthylation retrouvé dans l'échantillon.

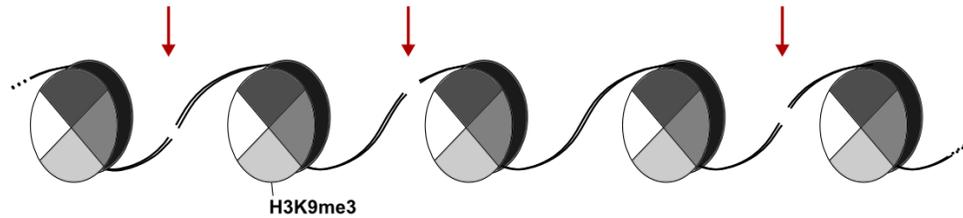
## Modifications d'histones associées avec le génome de vecteur :

Le deuxième paramètre épigénétique que nous avons souhaité analyser est la nature des HPTM associées avec les génomes de vecteur *in situ*. Dans ce but, nous avons mis au point un protocole de ChIP (**Figure 34**). Malheureusement, chaque condition expérimentale requiert une quantité initiale importante de chromatine, et il ne nous a pas été possible d'analyser le profil épigénétique des vecteurs AAVr de manière exhaustive. Nous avons donc focalisé notre analyse sur une HPTM communément associée avec une répression génique: H3K9me3 (**Introduction partie 4.1.2.a**). En parallèle, nous avons mesuré la densité en histone H3 par ce même protocole.

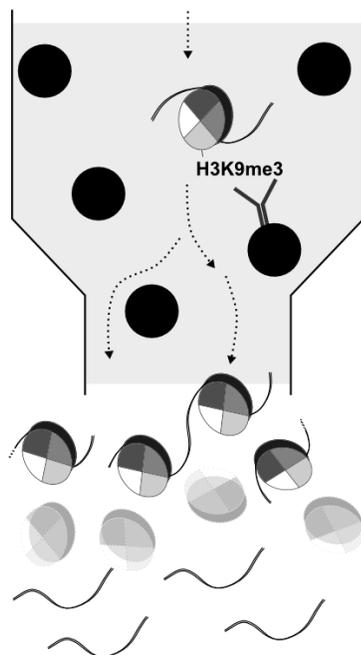
(1) crosslink (établissement de liaisons covalentes ADN - Protéines)



(2) sonication de la chromatine



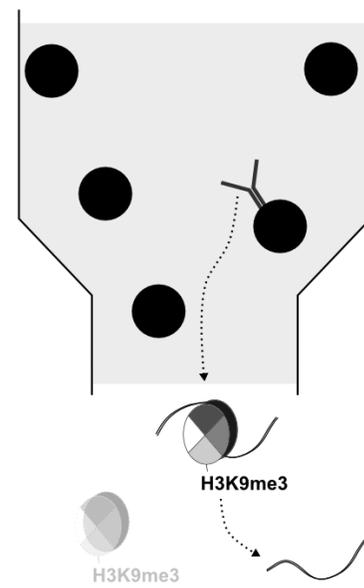
(3) immunoprécipitation par un anticorps spécifique couplé à des billes de sépharose



*Fraction non-liée*

(5) Purification et analyse de l'ADN par qPCR

(4) Elution et séparation des complexes histones / ADN



*Fraction liée*

(5') Purification et analyse de l'ADN par qPCR

**Figure 34 :** Principe de notre protocole de ChIP suivi d'une analyse par qPCR. L'immunoprécipitation spécifique de la modification souhaitée (H3K9me3) fait appel à un anticorps couplé à des billes de sépharose, qui sont ensuite purifiées par centrifugation. La fraction non-liée et la fraction liée (récupérée après élution) sont ensuite purifiées et analysées, dans notre cas par qPCR.

## Niveau d'oxydation de l'ARNm transgénique :

Plusieurs techniques sont à disposition pour quantifier l'oxydation des ARN dans les cellules. Certaines d'entre elles permettent d'estimer son niveau global sur un extrait d'ARN purifié et digéré en mononucléotides, d'autres utilisent un immunomarquage afin de détecter les ARN oxydés sur coupe histologique. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas de mesurer le taux d'oxydation d'une population spécifique d'ARN. Pour ce faire, la fraction d'ARN oxydés doit être isolée et analysée *a posteriori*. Ceci peut être réalisé par une immunoprécipitation d'ARN (*RNA immunoprecipitation*, ou RIP), une méthode conceptuellement similaire au ChIP utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement les guanines hydroxylées sur leur carbone N°8. Grâce à cet anticorps, nous avons mis au point un protocole de RIP en partant d'ARN extrait du TA de nos souris injectées et traités à la DNase, afin de supprimer l'ADN résiduel pouvant biaiser nos résultats. Les immunoprécipitations ont été suivies de RT-qPCR sur les échantillons d'ARN initiaux (*input*, IP) ainsi que sur les fractions immunoprécipitées. Les résultats ont été exprimés en pourcentage d'IP (%IP). L'absence de contamination ADN a tout de même été vérifiée en analysant par qPCR des échantillons n'ayant pas été reverse-transcrits. Les résultats se sont avérés négatifs dans chaque cas. De plus, un anticorps contrôle du même isotype que notre anticorps d'intérêt nous a permis de vérifier la spécificité de notre protocole d'immunoprécipitation.

La réalisation de ce projet de recherche grâce à l'application des méthodes expérimentales décrites ci-dessus nous a permis d'apporter certaines réponses aux questions posées dans nos objectifs. L'ensemble de ces résultats et leur interprétation sont retranscrits ci-après dans leur [version publiée](#).

## ARTICLE

# Short-lived recombinant adeno-associated virus transgene expression in dystrophic muscle is associated with oxidative damage to transgene mRNA

Jean-Baptiste Dupont<sup>1-3</sup>, Benoit Tournaire<sup>1-3</sup>, Christophe Georget<sup>4</sup>, Béatrice Marolleau<sup>4</sup>, Laurence Jeanson-Leh<sup>4</sup>, Mireille Ledevin<sup>5</sup>, Pierre Lindenbaum<sup>2,3,6</sup>, Emilie Lecomte<sup>1-3</sup>, Benjamin Cogné<sup>1-3</sup>, Laurence Dubreil<sup>5</sup>, Thibaut Larcher<sup>5</sup>, Bernard Gjata<sup>4</sup>, Laetitia Van Wittenberghe<sup>4</sup>, Caroline Le Guiner<sup>1-4</sup>, Magalie Penaud-Budloo<sup>1-3</sup>, Richard O Snyder<sup>1,7,8</sup>, Philippe Moullier<sup>1-3,7</sup> and Adrien Léger<sup>1-3</sup>

Preclinical gene therapy strategies using recombinant adeno-associated virus (AAV) vectors in animal models of Duchenne muscular dystrophy have shown dramatic phenotype improvements, but long-lasting efficacy remains questionable. It is believed that in dystrophic muscles, transgene persistence is hampered, notably by the progressive loss of therapeutic vector genomes resulting from muscle fibers degeneration. Intracellular metabolic perturbations resulting from dystrophin deficiency could also be additional factors impacting on rAAV genomes and transgene mRNA molecular fate. In this study, we showed that rAAV genome loss is not the only cause of reduced transgene mRNA level and we assessed the contribution of transcriptional and post-transcriptional factors. We ruled out the implication of transgene silencing by epigenetic mechanisms and demonstrated that rAAV inhibition occurred mostly at the post-transcriptional level. Since Duchenne muscular dystrophy (DMD) physiopathology involves an elevated oxidative stress, we hypothesized that in dystrophic muscles, transgene mRNA could be damaged by oxidative stress. In the mouse and dog dystrophic models, we found that rAAV-derived mRNA oxidation was increased. Interestingly, when a high expression level of a therapeutic transgene is achieved, oxidation is less pronounced. These findings provide new insights into rAAV transductions in dystrophic muscles, which ultimately may help in the design of more effective clinical trials.

*Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* (2015) 2, 15010; doi:10.1038/mtm.2015.10; published online 8 April 2015

## INTRODUCTION

Muscles of patients affected by muscular dystrophies suffer from profound metabolic disturbances. In Duchenne muscular dystrophy (DMD), the absence of Dystrophin leads to inflammation, rupture of calcium homeostasis, elevated oxidative stress, and eventually muscle fiber necrosis.<sup>1</sup> Ultimately, this leads to a progressive loss of ambulation and premature death.<sup>1</sup> In the last decade, successful gene therapy strategies have been designed in preclinical animal models of DMD using recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors.<sup>2-4</sup> However, one study evaluating rAAV-mediated gene transfer long-term reported a progressive reduction of therapeutic transgene expression attributed to the loss of vector genomes following muscle destruction as a result of subtherapeutic effect.<sup>5</sup> Additionally, in the DMD context other variables such as rAAV genome processing, transcriptional activity, and mRNA half-life have not yet been considered even though dystrophin-deficient muscles are characterized by: (i) a high level of DNA damage, which triggers DNA damage response (DDR)

activation<sup>6</sup>; (ii) perturbations of the epigenetic landscape and the transcriptome<sup>7,8</sup>; and (iii) an elevated oxidative stress degrading cellular components.<sup>9</sup>

In this study, we injected dystrophic mdx4Cv mice and healthy C57BL6 (B6) controls intramuscularly with a nontherapeutic AAV8 vector expressing GFP and analyzed the transgene expression pattern at 15 and 60 days postinjection (pi). Our results indicate that GFP expression in dystrophin-deficient muscles is decreased at both protein and mRNA levels. However, we also demonstrated that the loss of rAAV genomes is not the only factor involved in this process. Indeed, rAAV transcriptional activity was found to be similar in B6 and mdx4Cv contexts, but the amount of vector transgene mRNA was reduced in mdx4Cv muscle in correlation with a higher level of mRNA oxidation. Importantly, this observation translated in the Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) dog muscle, upon gene therapy with a therapeutic rAAV vector. Transgene mRNA oxidation was however found reduced in muscles displaying high and sustained levels of transgene expression.

<sup>1</sup>INSERM UMR 1089/Atlantic gene therapies, Nantes, France; <sup>2</sup>University of Nantes, Nantes, France; <sup>3</sup>Nantes University Hospital, Nantes, France; <sup>4</sup>GENETHON, Evry, France; <sup>5</sup>UMR INRA ONIRIS 703/Atlantic gene therapies, Nantes, France; <sup>6</sup>INSERM UMR 1087/CNRS UMR 6291/L'Institut du Thorax, Nantes, France; <sup>7</sup>Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, USA; <sup>8</sup>Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology, University of Florida College of Medicine, Gainesville, Florida, USA. Correspondence: A Léger (adrien.leger@inserm.fr) or P Moullier (moullier@ufl.edu)

Received 4 December 2014; accepted 17 February 2015

Our results emphasize the need to consider additional mechanisms when optimizing rAAV-mediated gene therapy. Transgene RNA stability is particularly sensitive to the modification of the cellular environment and thus deserves specific attention. Understanding the details and consequences of these molecular events paves the way for the design of improved gene therapy protocols for muscular dystrophies.

**RESULTS**

The level of rAAV-derived mRNA and protein is sharply reduced in murine dystrophic muscles

Six-week-old mdx4Cv and B6 mice received a serotype 2/8 rAAV-RSV-GFP vector (Figure 1) by bilateral intramuscular injection in the *tibialis anterior* (TA) muscle at a total dose of  $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg. Muscle pathology was confirmed in mdx4Cv mice from the time of injection (6 weeks of age) to the end of the experimental protocol (14 weeks of age) exhibiting typical dystrophic features, including myofiber regeneration, membrane permeability, anisocytosis, and centronucleation (Supplementary Figure S1).

We quantified transgene GFP fluorescence intensity (arbitrary unit (a.u.)) on whole muscle cross-sections by slide scanning microscopy (Figure 2a,b). Consistent with previous reports, GFP intensity at 15 days pi in B6 muscles was hardly detectable (mean: 0.87 a.u.) but was strong at 60 days pi (mean: 77.9 a.u.). At this latter time-point, 4% of B6 muscle fibers showed intensities higher than 200 a.u. and 0.2% reached the maximal capacity of the detector (*i.e.*, signal saturation). In contrast, at 60 days pi, GFP fluorescence in mdx4Cv muscles remained low (mean: 4.8 a.u.) with 90% of the cells below 15 a.u. Therefore, comparing the two groups, the median GFP fluorescence intensity at 60 days pi was 16.2-fold lower in mdx4Cv than in B6 muscles. Quantification of transgene mRNA by reverse transcription (RT) quantitative polymerase chain reaction (qPCR) from muscle samples confirmed this observation. We found a 4.3-fold reduction of the GFP mRNA relative quantity (RQ) in mdx4Cv muscles at 15 days pi (median RQ: 0.69) compared with B6 (median RQ: 2.97), and 16.7-fold reduction at 60 days pi (median RQ for B6 mice: 5.02; mdx4Cv mice: 0.30; Figure 2c).

Altogether, these results indicate that the dystrophin-deficient muscle is an environment, in which rAAV-mediated GFP expression is hampered.

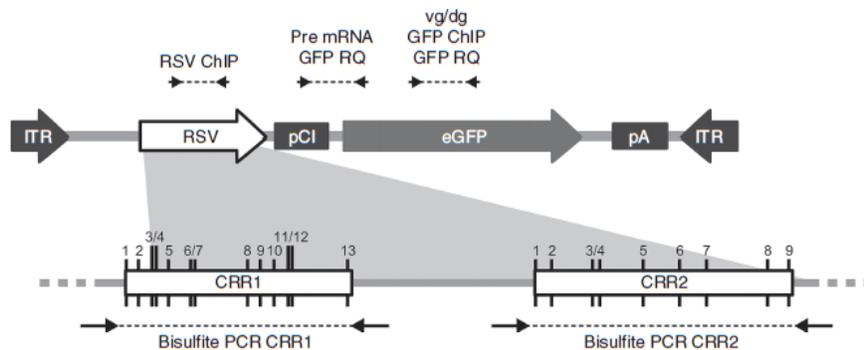
Vector genome loss is not sufficient to explain the reduced amount of transgene products in dystrophin-deficient muscles

A previous study in murine models of DMD<sup>5</sup> suggested that low transgene expression is the result of vector genome loss concomitant to muscle fiber degeneration. Similarly to mdx mice, mdx4Cv muscles show necrosis and regeneration (Supplementary Figure S1a). Therefore, we evaluated the vector genome persistence by qPCR. The reduction of the median vector genome per diploid genome (vg/dg) between 15 and 60 days pi was more pronounced in dystrophic muscles (from 1.65 to 0.19 vg/dg: 8.7-fold reduction,  $P < 0.0001$ ) than in their healthy counterparts (from 2.96 to 1.46 vg/dg: 2.0-fold reduction,  $P = 0.0089$ ) (Figure 3a). As a direct consequence, vg/dg ratios were significantly lower in mdx4Cv muscles compared to B6 controls at 15 days (1.65 versus 2.96 vg/dg,  $P = 0.049$ ) and particularly at 60 days pi (0.19 versus 1.46 vg/dg,  $P < 0.0001$ ).

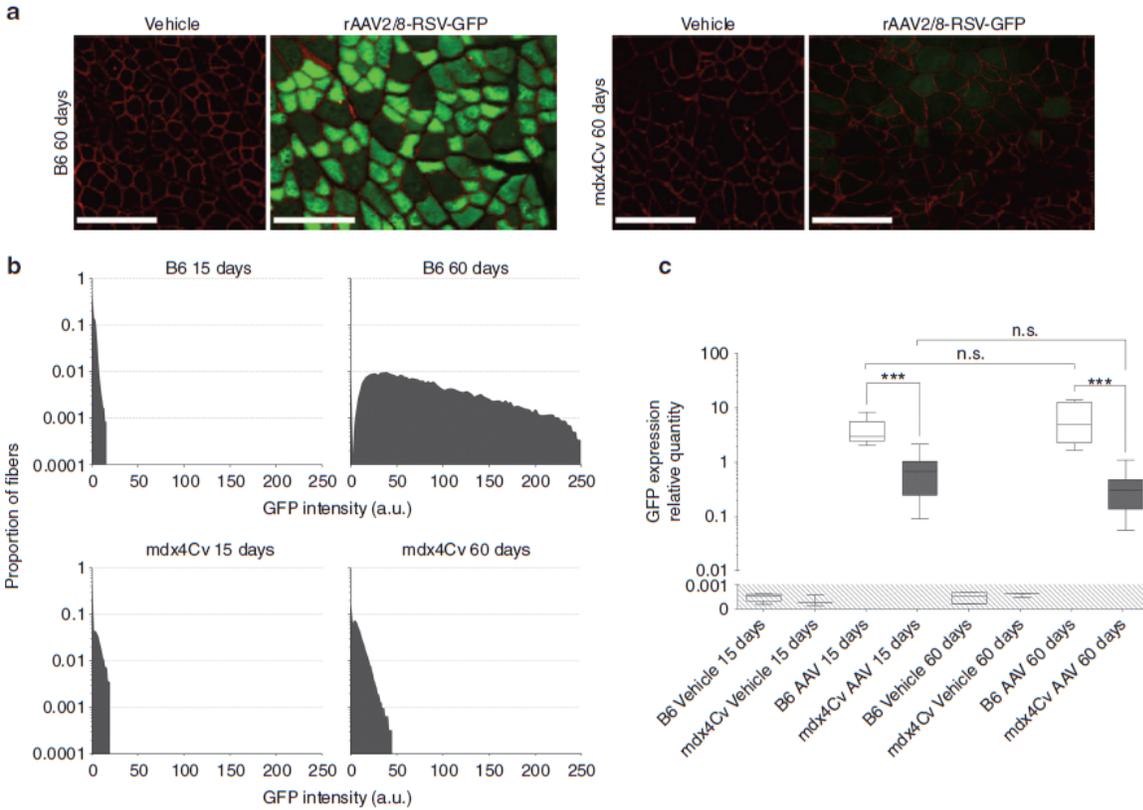
We hypothesized that if vector genome loss observed in dystrophic mice is the only factor involved in the reduced transgene expression, then the mRNA per vg ratio should be similar between dystrophic and normal mice. We calculated the ratio of GFP mRNA RQ divided by rAAV vg/dg (abbreviated as RQ/vg), reflecting the ability of rAAV genomes to express detectable mRNA. The median RQ/vg ratio was found significantly lower in mdx4Cv than in B6 muscles at 15 days (RQ/vg = 0.31 versus 1.29,  $P = 0.0019$ ) and 60 days pi (RQ/vg = 1.64 versus 4.28,  $P = 0.0011$ ) (Figure 3b). These results indicate that rAAV genomes are not able to produce mRNA in mdx4Cv as efficiently as in healthy muscles and/or that transgene mRNA is less stable in the dystrophic muscle environment.

Epigenetic marks along the rAAV genomes are similar in healthy and dystrophin-deficient muscle

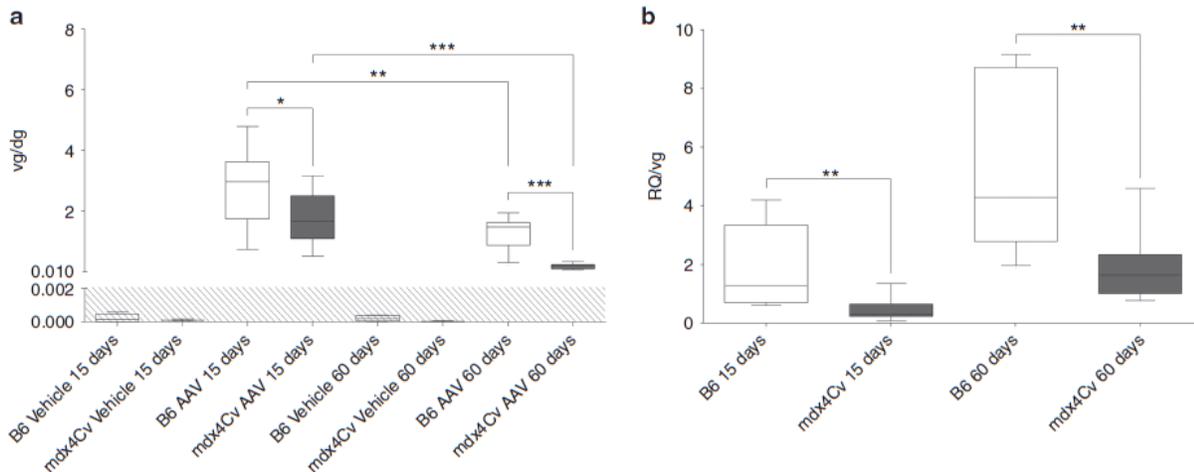
As previously shown, rAAV genomes persist in healthy muscles as chromatinized episomes devoid of DNA methylation, consistent with long-term transgene expression.<sup>10,11</sup> Since global chromatin patterns are deeply modified in DMD muscles,<sup>7,8</sup> we hypothesized that in mdx4Cv mice, rAAV genome expression may be downregulated at the transcriptional level by silencing epigenetic mechanisms. We focused our analysis on two well-described epigenetic modifications associated with silenced heterochromatin: Histone H3 Lysine 9 tri-methylation (H3K9me3) and DNA methylation on CpG dinucleotides.



**Figure 1** Schematic representation of the rAAV2/8-RSV-GFP genome and position of PCR primers. The expression cassette contains the complete Rous Sarcoma Virus (RSV) LTR promoter followed by an artificial pCI intron from the pCI plasmid backbone (Promega, Accession Number U47119), the GFP transgene, and the late poly-Adenylation signal from the SV40 virus. The bottom panel represents the two CpG Rich Region CRR1 and CRR2 identified in the RSV. CpG positions are marked by black vertical lines and numbered from 1 to 13 for CRR1, and from 1 to 9 for CRR2. Position of qPCR primers and bisulfite/PCR primers are represented above and below the figure, respectively.



**Figure 2** Evaluation of transgene expression in the muscle of recombinant adeno-associated virus (rAAV)-injected mice. mdx4Cv mice and C57BL/6J (B6) controls received bilateral intramuscular injection of an rAAV2/8-RSV-GFP vector ( $4 \times 10^{12}$  vg/kg) or dPBS (Vehicle) in TA and were sacrificed 15 or 60 days postinjection. (a,b) GFP fluorescence on frozen muscle sections 60 days after AAV or vehicle injection. Whole muscle sections were stained with an anti-laminin antibody (red) and the GFP signal (green) was quantified in levels of grey (from 0 to 255 a.u.) on the entire section using a digital slide scanner and ImageJ software. (a) Representative panel. Scale bar = 200  $\mu$ m. (b) Muscle fiber distribution according to GFP intensity,  $n = 5$  mice per group. (c) Quantification of GFP expression in injected muscles by Taqman RT-qPCR normalized to the endogenous target Hprt. The data represent the median value (central line), the first and third quartiles (box) and first and ninth deciles (whiskers) of 10 mice per group. The shaded area delineates qPCR limit of detection. Statistics: Mann-Whitney's  $U$ -test. \*\*\* $P < 0.001$ ; n.s., non significant.



**Figure 3** Persistence of AAV vector genome in dystrophic muscles and its implication on the reduction of transgene expression. mdx4Cv mice and C57BL/6J (B6) controls received bilateral intramuscular injection of an rAAV2/8-RSV-GFP vector (AAV,  $4 \times 10^{12}$  vg/kg) or dPBS (Vehicle) in TA and were sacrificed 15 or 60 days postinjection. (a) Quantification of AAV vector genome per diploid genome (vg/dg) by Taqman qPCR against GFP normalized with Albumin. (b) Plotting of individual ratios between GFP mRNA RQ and the AAV vg/dg copy number. The data represent the median value (central line), the first and third quartiles (box) and first and ninth deciles (whiskers) of 10 mice per group. The shaded area delineates qPCR limit of detection. Statistics: Mann-Whitney's  $U$ -test; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; n.s., non significant.

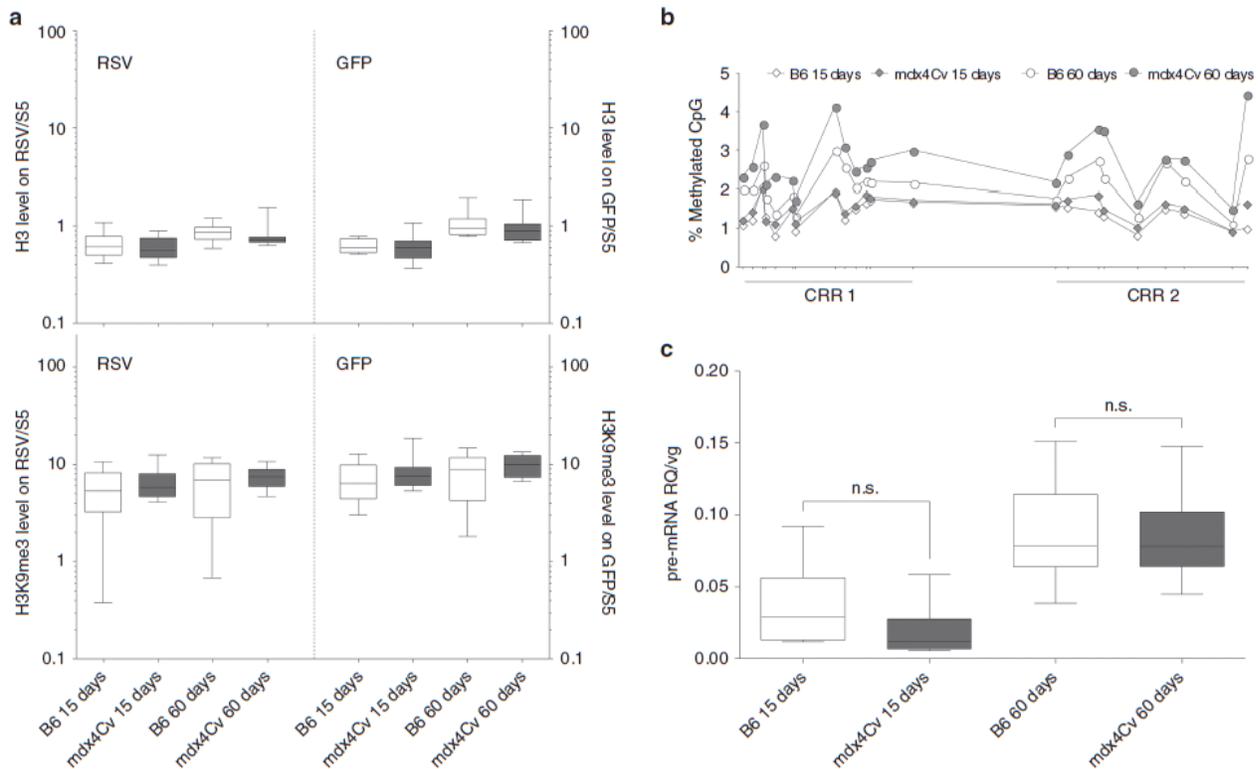
Chromatin immunoprecipitation (ChIP) followed by qPCR indicated that similar levels of H3K9me3 decorated rAAV genomes isolated from mdx4Cv muscles or B6 controls (Figure 4a). Bisulfite conversion of muscle DNA and next-generation sequencing of two CpG-rich regions of the rAAV RSV promoter showed that methylation percentages were comprised between 0.6 and 5.4% (Figure 4b). While there was no significant difference at 15 days pi, each CpG position of RSV was methylated more frequently in mdx4Cv muscles than in B6 controls at 60 days pi. However, the difference never exceeded 1.65%, which is unlikely to have a notable impact on transcriptional rates (Figure 4b). Collectively, these data suggest that inhibition of rAAV genome transcriptional regulation by epigenetic mechanisms did not account for the differential amounts of GFP mRNA initially observed in mdx4Cv and healthy B6 mouse muscles.

The reduction of GFP mRNA level occurs at the post-transcriptional level

To confirm the absence of inhibition at the transcriptional level, we measured the transcriptional output of the RSV promoter in mdx4Cv muscles and B6 controls. Spliced RNAs are mainly cytosolic and their half-life depends on post-transcriptional mechanisms such as nonsense-mediated decay, No-Go decay or RNA interference.<sup>12,13</sup> By contrast, unspliced mRNAs are mainly nuclear and reflect more faithfully the raw transcriptional output of a given promoter. We included a chimeric intron—efficiently spliced *in vivo*

(Supplementary Figure S2)—upstream of the GFP cDNA. While our previous RT-qPCR targeted both spliced and unspliced GFP mRNAs (RQ), we designed another RT-qPCR overlapping the chimeric intron to quantify specifically the unspliced GFP pre-mRNA fraction (pre-mRNA RQ). After normalization by vg/dg (later mentioned as pre-mRNA RQ/vg), here we observed no significant difference between mdx4Cv muscles and B6 controls notably at 60 days pi where the median and range values were similar (Figure 4c, median = 0.078 and range = 0.044–0.150 for mdx4Cv mice; median = 0.078 and range = 0.036–0.154 for B6 controls). These data indicate similar transcriptional outputs and pre-mRNA regulations of rAAV genomes in healthy and dystrophin-deficient murine muscles. We concluded that the lower GFP RQ values measured in mdx4Cv mice result from post-transcriptional events impacting on GFP mRNA half-life in the cytoplasm.

Oxidation of the GFP transgene mRNA is higher in mdx4Cv muscles To further understand mechanisms at stake in reducing cytoplasmic spliced GFP mRNA quantities, we hypothesized that mRNA metabolism could be disturbed by reactive oxygen species leading to reduced stability. This hypothesis would be consistent with the increased oxidative stress described in muscles of DMD patients and mdx mice.<sup>9,14–16</sup> RNA oxidation occurs most frequently on Guanine nucleotides resulting in 8-HydroxyGuanine (8-HOG), which can be detected by antibody-based techniques. First, we used an



**Figure 4** Regulation of transgene expression at the transcriptional and post-transcriptional level. mdx4Cv mice and C57BL/6J (B6) controls injected intramuscularly with an AAV8-RSV-GFP vector ( $4 \times 10^{12}$  vg/kg) in TA were sacrificed 15 or 60 days postinjection. (a) Immunoprecipitation of muscle chromatin using anti-H3 (top) and anti-H3K9me3 (bottom) antibodies followed by qPCR targeting RSV (left) and GFP (right). Data were normalized with the endogenous mouse heterochromatin segment Satellite-5 (S5). (b) DNA methylation assessment on two CpG-Rich Regions (CRR) of RSV by bisulfite conversion and next-generation sequencing. Data are represented as % of methylation for each CpG position along RSV. The distance between the CpG was adjusted to reflect the real positions on a linear DNA molecule. (c) Quantification of AAV genome transcriptional activity by RT-qPCR against unspliced GFP mRNA and normalization by vg/dg (pre-mRNA RQ/vg). (a,c) Graphic representation is as follows: median value (central line), the first and third quartiles (box) and first and ninth deciles (whiskers) of 10 mice per group. Statistics: Mann-Whitney's *U*-test; n.s., nonsignificant.

enzyme-linked immunosorbent assay to quantify the overall level of 8-HOG in total RNA extracted from injected muscles. At 60 days pi, there was a higher RNA oxidation in mdx4Cv muscles (median = 14.4, range = 13.6–16.3) compared with B6 controls (median = 13.9, range = 12.6–15.6), but the difference was not significant. Therefore, RNA oxidation, if involved, is not a widespread phenomenon but may rather be restricted to specific RNA subpopulations.

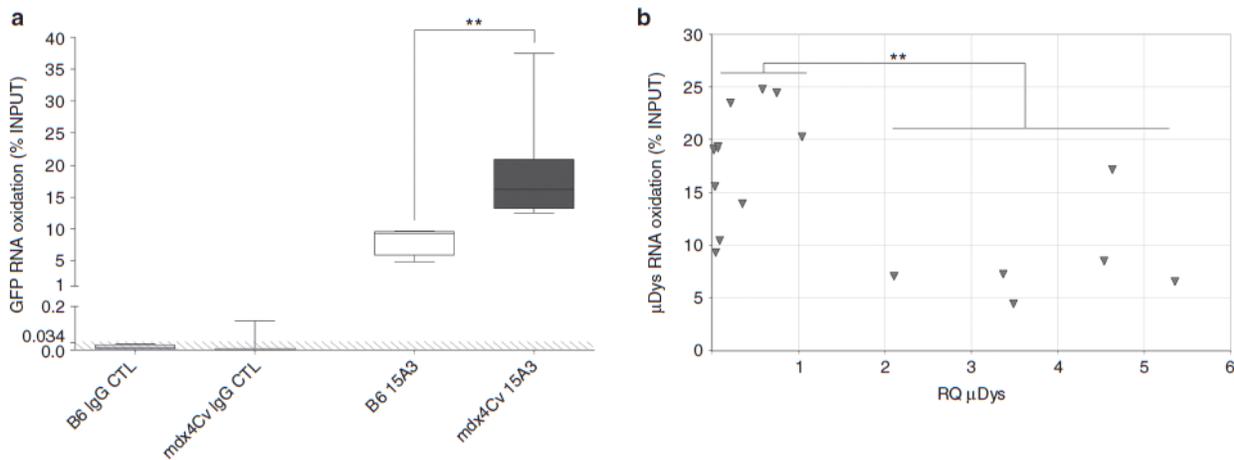
To analyze selected RNA, the oxidized RNA fraction was extracted from the whole RNA INPUT using a RNA Immunoprecipitation (RNA IP) protocol with an anti-8-HOG antibody. We designed a RT-qPCR assay targeting three different mRNA, either with a ubiquitous (Hprt and Gapdh) or a muscle-restricted (Myoglobin) expression. The relative abundance of each target was determined in both INPUT and immuno-precipitated fractions, and results were expressed as a percentage of INPUT. In B6 muscle RNA obtained 60 days pi, %INPUT for the three mRNAs were found to be similar (Hprt: 4.5–9.6%, Gapdh: 12.0–15.65%, Myoglobin: 4.2–11.6%), suggesting the existence of a basal oxidation level in healthy mouse muscles. In contrast, there was a selective hyperoxidation in mdx4Cv muscles 60 days pi affecting Hprt (12.8–20.7%,  $P = 0.012$ ) and Gapdh (19.8–37.0%,  $P = 0.006$ ) mRNA, but not Myoglobin (5.5–10.4%, n.s.) (Supplementary Figure S3). When applied to GFP transgene mRNA in B6 and mdx4Cv muscles, we found oxidized mRNA within the range of the three endogenous mRNAs (5–10%) and significantly higher values, ranging from 12.5 to 37.5% ( $P = 0.006$ ) (Figure 5a), respectively.

In conclusion, significant oxidative damage to GFP transgene mRNA occurs in dystrophic muscles and correlates with lower cytoplasmic mRNA levels. Ultimately, this phenomenon might be responsible, to some extent, for the low GFP signal found in mdx4Cv muscles.

High expression of a therapeutic transgene is correlated with a lower rAAV mRNA oxidation in dystrophin-deficient dog muscles. To further correlate the relationship between the mRNA oxidation status and the expression of the transgene, we

measured the level of transgene mRNA oxidation in a unique context where four GRMD dogs were injected locoregionally in one entire forelimb<sup>4</sup> with an rAAV8 vector expressing a truncated but functional form of dystrophin ( $\mu$ Dys).  $\mu$ Dys sarcolemmal localization was confirmed by immunofluorescence on transduced muscle sections with variable ratios of  $\mu$ Dys-expressing fibers among the 19 muscle samples analyzed 13–16 weeks pi (Le Guiner *et al.*, manuscript in preparation). We also measured the expression of  $\mu$ Dys at the mRNA level by RT-qPCR and distinguished two categories of samples: samples with low transgene expression ( $RQ < 1$ ) as opposed to samples with high transgene expression ( $RQ > 2$ ). Starting from the same RNA INPUTs, we applied the RNA IP protocol and subsequent RT-qPCR in order to assess the  $\mu$ Dys mRNA oxidation status. In samples with low  $\mu$ Dys RQ ( $RQ \mu$ Dys  $< 1$ ), transgene mRNA oxidation ( $\mu$ Dys %INPUT) ranged between 9.38 and 24.81% with a median of 19.25%, which was comparable to the results obtained for non-therapeutic GFP mRNA in mdx4Cv mice (Figure 5b). Remarkably, in muscle samples with high therapeutic transgene expression levels ( $RQ \mu$ Dys  $> 2$ ), RNA oxidation was reduced to a median value of 7.23% and only one sample had a %INPUT above 10% (Figure 5b). Similarly to the results described previously in mdx4Cv mice, transgene mRNAs are susceptible to oxidation in GRMD muscles when the mRNA is expressed below the therapeutic threshold. In contrast, high transgene expression, believed to be equal or above the therapeutic threshold, results in basal values of transgene RNA oxidation similar to healthy murine muscle samples.

Altogether, this study highlights novel mechanisms restricting rAAV transduction efficiency in dystrophic muscles. More than the physical loss of vector genome due to the progressive degeneration of dystrophic muscle cells, our data indicate that oxidative damage to transgene mRNA is also an important factor to consider, which in turn emphasizes the need to determine the therapeutic threshold in complex diseases.



**Figure 5** Transgene mRNA oxidation after rAAV injection in dystrophic mice and dogs. (a) RNA Immunoprecipitation analysis of GFP mRNA oxidation at 60 days postinjection in the TA muscles of mdx4Cv mice and C57BL/6J (B6) controls, using a specific anti-8-HOG antibody (15A3). No background signal was obtained with the isotype control (IgG CTL). The GFP mRNA copy number was measured by RT-qPCR after Immunoprecipitation and expressed as a percentage of INPUT. The data represent the median value (central line), the first and third quartiles (box) and first and ninth deciles (whiskers) of four (B6) or seven (mdx4Cv) mice per group. The shaded area delineates qPCR limit of detection. Statistics: Mann–Whitney’s  $U$ -test;  $**P < 0.01$ . (b) Microdystrophin ( $\mu$ Dys) mRNA oxidation after rAAV8 locoregional injection in Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs. % INPUT were obtained with the same protocol as in a and plotted as a function of  $\mu$ Dys RQ, measured by RT-qPCR and normalized with the endogenous target Rpl32. The 19 samples represent various forelimb muscles collected from four GRMD dogs injected with a similar vector dose ( $1 \times 10^{13}$  vg/kg) and euthanized between 13 and 16 weeks postinjection. Statistics: Mann–Whitney’s  $U$ -test between two distinct categories of samples ( $RQ < 1$  versus  $RQ > 2$ );  $**P < 0.01$ .

## DISCUSSION

In this study, we showed that the pathophysiological status of a diseased organ can impact dramatically on rAAV-mediated gene expression. Here, in the absence of a strategy based on pretreating the tissue prior to rAAV administration, the dystrophic muscle environment impairs optimal gene expression precluding the potential for therapeutic efficacy.

Our central observation using a nontherapeutic transgene is the lower level of GFP mRNA in dystrophic muscles despite the use of a strong and constitutive promoter in the vector (RSV),<sup>11,17</sup> resulting in low GFP fluorescence *in vivo* both at early (15 days) and later (60 days) times *pi*. Of note, the reduction of fluorescence in mdx4Cv strictly parallels the reduction of GFP mRNA (16-fold decrease), which led us to explore restriction factors occurring at the pretranslation level. Lower transgene mRNA levels in mdx4Cv muscles were partially correlated with the reduced persistence of the rAAV vector genomes, consistent with previous studies conducted in other murine models of muscular dystrophies such as the mdx/utr-/- double knock-out mouse<sup>5</sup> or the  $\alpha$ -sarcoglycan (sgca)-deficient mouse.<sup>18</sup>

In addition to vector genome clearance occurring in degenerative muscle, rAAV transduction may also be hampered at others steps such as genome processing, transcriptional activity, mRNA stability, or production of transgenic proteins. We investigated beyond the contribution of vector genome loss and used the RQ/vg ratio that we defined as the efficiency of comparable rAAV genome populations to produce and maintain stable GFP mRNA molecules. Similar RQ/vg values between mdx4Cv and B6 mice would have meant that vector genome clearance was the only cause explaining rAAV restriction in dystrophic muscles. In this study, however, RQ/vg ratios were found significantly lower in mdx4Cv mice, suggesting that an additional mechanism(s) is responsible for lower vector-derived mRNA levels.

The first steps following nuclear entry include second-strand synthesis and genome rearrangements into concatemeric or circular forms. These molecular events are controlled by numerous proteins notably involved in endogenous DDR.<sup>19,20</sup> Recent studies highlighted that cellular permissivity to rAAV transduction is inhibited by DDR proteins such as members of the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex or Atm.<sup>19–22</sup> Even if these proteins are mostly regulated post-translationally, their overexpression was recently linked with lower rAAV efficiency.<sup>21</sup> Therefore, we monitored by RT-qPCR the expression of several DDR genes (Mre11, Rad50, Nbs1, Atm, Atr, DNA-PKc) in our mdx4Cv and B6 muscle samples. All of them were found significantly overexpressed ( $P < 0.01$ ) in mdx4Cv muscles (Supplementary Figure S4) and might therefore inhibit rAAV genome processing into productive molecular forms. Even if an unbalanced DDR pathway could have been an additional disease-related restriction, it was not further considered in this study as we demonstrated that pretranscriptional mechanisms are unlikely to be involved.

One obvious parameter susceptible to inhibit rAAV genome expression in mdx4Cv muscles could have been epigenetic silencing. We previously showed that circular rAAV genomes associate with cellular histones *in vivo* to form episomal chromatin structures, suggesting the possibility of epigenetic regulation.<sup>10</sup> Our previous study showed a hypomethylation of CpG along the RSV promoter in healthy nonhuman primate muscle and liver explaining the long-term transgene expression in healthy tissues.<sup>11</sup> In the context of DMD, several investigators have described the deregulation of epigenetic enzymes such as DNA Methyltransferases following inflammation and cytokine secretion<sup>23</sup> or Histone Deacetylases specifically in the muscle of mdx mice or DMD patients.<sup>7,8</sup> We focused on

two marks known to be coenriched at constitutive heterochromatin loci: high CpG methylation of promoters and the histone lysine methylation H3K9me3. While our results did not show a repressive epigenetic pattern along rAAV genome in dystrophic muscles, we cannot exclude other transcription regulatory mechanisms. Of note, we found an unusual epigenetic pattern in all samples (mdx4Cv and B6) where rAAV genomes were essentially devoid of DNA methylation along the RSV promoter and enriched in H3K9me3. In addition to its role in gene silencing, H3K9me3 seems to be involved in DNA double strand break early signaling.<sup>24,25</sup> As rAAV genome undergoes extensive rearrangements at early steps post nuclear entry, this unusual pattern may be the result of conflicting signals between DNA repair and transcription.

In order to assess transgene expression efficiency more faithfully, we measured the ability of rAAV genome to produce GFP pre-mRNA. We considered only the unspliced fraction produced by equivalent vector genome populations and found similar transcriptional activities for rAAV genomes in mdx4Cv muscles and B6 controls, indicating that the reduction of GFP mRNA levels observed initially is the result of post-transcriptional events.

In the absence of dystrophin, myocytes endure a variety of molecular perturbations leading to inflammation, rupture of calcium homeostasis and oxidative stress. Once mature mRNAs leave the nuclear environment where exported into the cytoplasm, they become exposed to these stresses and to RNA quality control systems (nonsense-mediated decay, No-Go Decay, RNA interference<sup>12,13</sup>). Among them, oxidative stress seemed particularly relevant in the context of DMD patients and mdx mice. In the absence of dystrophin, the level of reactive oxygen species is increased in muscles and leads to the oxidation of membrane lipids, proteins, or DNA.<sup>9,15,16</sup> To our knowledge, however, the oxidation of RNA was never described in any animal model of DMD and the only report in the context of muscle diseases concerns patients suffering from myopathies with rimmed vacuoles.<sup>26</sup> Nevertheless numerous studies already described RNA oxidation and demonstrated its direct implication in the physiopathology of age-associated disorders including Alzheimer and Parkinson disease, dementia, or muscle atrophy.<sup>27,28</sup> Mechanistically, RNA oxidation by Guanine hydroxylation can result in strand scission<sup>29</sup> and leads to translation errors by ribosome stalling<sup>30,31</sup> which in turn activates RNA No-go decay.<sup>12</sup> We described a higher level of oxidation not only on transgene mRNA but also on several endogenous targets in mdx4Cv muscles. In GRMD muscle samples, we also demonstrated that rAAV-derived mRNA is highly oxidized when the expression of the therapeutic transgene is low. However, one of the mRNA targets examined in mice (Myoglobin, Supplementary Figure S3) and additional targets in GRMD dogs (Rpl32, Gusb, data not shown) seemed unaffected by oxidative stress. This indicates that mRNA oxidation in dystrophic muscles may be a selective process, as it was previously described *in vitro*-induced oxidative stress,<sup>31,32</sup> as well as *in vivo* in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis<sup>33</sup> or in postmortem brain samples from Alzheimer patients.<sup>27</sup> The factors explaining this selectivity are currently unknown but may include differential RNA motifs or folding, as well as intracellular localization. The basal expression level of the gene does not seem to have an influence, since in our study two promoters (Myoglobin and RSV) leading to similar expression levels did not result in similar mRNA oxidation levels.

Our results obtained in two animal models of DMD with two different rAAV products (GFP and  $\mu$ Dys) suggest that mRNAs derived from rAAV vectors are particularly sensitive to oxidative damage caused by free radicals in dystrophic muscles. This is likely to result in the lower efficiency of rAAV in combination with other

parameters such as the faster clearance of vector genome due to fiber degeneration. However, encouraging results in GRMD muscle samples showed that the high expression of  $\mu$ Dys was able to significantly reduce the relative proportion of oxidized mRNA. This gives further credit to the “threshold hypothesis” suggesting that a critical dose of therapeutic vector has to be reached to restore muscle fiber integrity and allow the persistence of rAAV genome expression in the long-term.

While current protocols rely on the injection of elevated rAAV doses, understanding how the dystrophic muscle context and the related pathophysiological factors are affecting rAAV vector efficiency might accelerate the emergence of alternative strategies. Among these strategies, developing dedicated protocols, such as pretreating the tissue with antioxidant prior to vector administration, may improve rAAV therapeutic index in future trials for DMD.

## MATERIALS AND METHODS

### Quality assurance

Quality management system has been implemented to cover all activities in INSERM UMR 1089 laboratory including the management of research teams and production of research-grade viral vectors. This system has been approved by Lloyd's Register Quality Assurance to meet requirements of international Management System Standards ISO 9001:2008.

### Production of rAAV vectors

The pAAV-RSV-GFP-pA vector plasmid contains the Rous Sarcoma Virus promoter (RSV), followed by a short synthetic intron (pCI plasmid, Promega, Madison, WI), the enhanced green fluorescent protein (GFP) coding sequence and the late SV40 polyadenylation (pA) signal. The expression cassette was cloned between AAV2 inverted terminal repeats (ITR) (Figure 1). Research grade single-stranded (ss) AAV 2/8 vectors were produced by the INSERM UMR 1089 vector core. Briefly, HEK293 were transfected with the pAAV-RSV-GFP-pA vector plasmid together with helper plasmid pDP8 (which contains AAV2 rep, AAV8 cap, and adenovirus helper genes). Cells were harvested 48–72 hours post-transfection and centrifuged at low speed, then the rAAV8 particles contained in the supernatant were purified by double cesium chloride gradient ultracentrifugation followed by dialysis against Dulbecco's phosphate-buffered saline (Lonza, Verviers, Belgium). Vector genomes and infectious particles (ip) were quantified by Dot Blot and Replication Center Assay respectively. The vector titers were  $1.2 \times 10^{13}$  vg/ml and  $2.4 \times 10^9$  ip/ml. Detection of Rep-ITR junctions in the final product did not reach the limit of quantification by qPCR.

### Ethic statement and animal experimentation

Generation of genetically modified mice by rAAV vectors was authorized by the French ministry of research (#5833) and all experimental procedures were validated by the Departmental Direction of Veterinary Services (#A44-124) in accordance with the French law on vertebrate laboratory animal experimentation (Decree 87-848, 1987). All animals were handled following guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals. Mouse experiments were conducted in SPF grade animal facilities based in Nantes university (UTE IRS-UN, Nantes, France) and Genethon (Evry, France) after approval by the research ethics boards from Loire Atlantique (#CEEA.2011.18) and from Genethon (#CE 11-05).

Five- to 7-week-old SPF-grade C57BL/6J (Charles River, Wilmington, MA) and mdx4Cv (B6Ros.Cg-Dmd<sup>mdx4Cv</sup>/J, in-house breeding) mice were randomly assigned to receive in each *tibialis anterior* (TA) muscle either dPBS or  $5.0 \times 10^{10}$  vg of the ssAAV2/8-RSV-GFP-pA vector diluted in dPBS, for a total dose of  $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg. Prior to injection, mice were anesthetized by a single intraperitoneal administration of Ketamine/Xylazine. Animals were euthanized at 15 or 60 days postinjection by exsanguination under a high dosage isoflurane inhalation anesthesia. For each animal, whole injected muscles, noninjected muscles, liver, lymphoid organs, and sera were collected and processed within 10 minutes, as follows: samples for molecular biology analyses were sliced in pieces of 1–2 cubic mm, randomly distributed in Eppendorf tubes and snap-frozen in liquid nitrogen before long-term storage at  $-80^\circ\text{C}$ ; samples for histology were placed in disposable base molds and embedded in Tissue-Tek optimum cutting temperature (OCT) compound (Sakura, Torrance, CA). Molds were subsequently frozen for 1 minute in cold isopentane and stored at  $-80^\circ\text{C}$ .

### Quantitative analyses of GFP expression by slide scanning microscopy

Skeletal muscle cryosections (5  $\mu\text{m}$ ) were collected on slides, air dried, fixed with 4% PFA pH7.4 for 10 minutes, and permeabilized 10 minutes in 0.3% Triton X100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Saturation was performed in 10% goat serum (Dako X090710, Troy, MI) for 30 minutes at room temperature (RT). Then, slides were incubated with the anti-mouse laminin primary antibody at 1:100 (rat monoclonal antibody MAB1905, Chemicon, Temecula, CA), for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . After washing with PBS, sections were incubated for 1 hour at RT with the Alexa fluor 555-conjugated anti-rat antibody at 1:400 (goat IgG A21434 from Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA). Nuclei were stained for 15 minutes at RT with DRAQ5 (DR500200, Biostatus limited, Shepshed, UK) at 1:1,000. Finally, slides were mounted with Prolong Gold (Invitrogen, P36934). To quantify GFP fluorescence, muscle sections were scanned using a Digital slide scanner (Nanozoomer 2.0, Hamamatsu, Japan) using FITC and TRITC filters to detect GFP and laminin respectively. For each group, exposure times were set up so that no GFP fluorescence would be detected on dPBS-injected sections. Myofibers were individualized using laminin fluorescence. The total number of fibers including GFP negative fibers and the mean GFP intensity of each cell were determined using ImageJ software on a gray scale ranging from 0 to 255 a.u. (Rasband, W.S.) (ImageJ, US National Institutes of Health, Bethesda, MD, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012).

### Nucleic acid extraction and reverse transcription

Genomic DNA was extracted from 50 to 100 mg of muscle and liver samples using Genra Puregene Blood Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). Briefly, frozen tissues were disrupted in Cell Lysis Solution using the Qiagen Tissue Lysate II (30 seconds at 30 Hz). DNA was then recovered according to the manufacturer's instructions and stored at  $-20^\circ\text{C}$ . DNA concentration and purity were evaluated by microliter optical density (ratio A260 nm/A280 nm between 1.8 and 2). Total muscle RNA was obtained from frozen tissue samples by mechanical disruption (Tissue Lysate II:  $2 \times 30$  seconds at 30 Hz), organic extraction using TRI Reagent (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA)/chloroform (Sigma-Aldrich) purification and isopropanol precipitation (Carlo-Erba, Milan, Italy). RNA samples were stored at  $-80^\circ\text{C}$  until further use. Contaminating DNA was eliminated by two successive digestions with DNase (TURBO DNA-free kit, Ambion). DNase-treated RNA was subsequently reverse transcribed with poly-dT primers and M-MLV Reverse-Transcriptase (Invitrogen) following the manufacturer's instructions and cDNAs were stored at  $-20^\circ\text{C}$  before analysis. Control samples without Reverse-Transcriptase were also prepared in order to verify the absence of DNA contaminants. For all samples, DNA contamination was not detected by qPCR.

### In situ chromatin immunoprecipitation

The ChIP protocol was adapted from standard procedures for the study of murine muscle chromatin. Briefly, muscles were pulverized under liquid nitrogen using mortar and pestle. The resulting powder was incubated in 1% formaldehyde to cross-link DNA and proteins and the nuclei were then isolated by chemical and mechanical extraction. Following chromatin sonication (to an average size of 250–350bp), IP was performed with the appropriate antibody (anti-H3: ab1791 from abcam, Cambridge, UK; anti-H3K9me3: abcam ab8898). Finally, Bound and Unbound DNA were purified separately and analyzed by qPCR. A detailed description of the different steps is provided in the Supplementary Material section.

### Bisulfite conversion and Illumina Miseq sequencing

DNA methylation was quantified using the Methyl Detector kit (Active motif, Carlsbad, CA) for bisulfite conversion and PCR amplifications (Supplementary Table S1) of two CG rich regions (Figure 1, CRR1/2) were performed. Subsequently, C/T polymorphisms were quantified by illumina Miseq deep sequencing. A count of the methylated bases was performed using a custom program implementing an alignment algorithm handling degenerate bases. The C++ code is freely available at the following URL: <http://variationtoolkit.googlecode.com/svn/trunk/src/methyl01.cpp>.

### RNA immunoprecipitation

RNA inputs (1.5  $\mu\text{g}$  of DNase-treated RNA) were distributed by B.T. in Nonstick RNase-free tubes (Ambion). The following steps including data analysis were conducted blindly by J.B.D. First, samples were incubated at RT for 4 hours

with the anti-8-hydroxyguanine (8-HOG) 15A3 antibody (abcam ab62623) or with an IgG2b isotype control (Thermo Fisher, Waltham, MA) diluted in RNA IP buffer (25 mmol/l Tris pH7.4, 150 mmol/l KCl, 5 mmol/l EDTA, 0.5 mmol/l DTT, 0.5% Igepal, 100 U/ml RNaseOUT inhibitor (Invitrogen), supplemented with Complete EDTA-free protease inhibitor (Roche, Basel, Switzerland)). Precipitation was performed O/N at 4 °C after addition of protein A magnetic beads (Dynabeads-ProteinA, Life Technologies) with gentle rotation. RNA bound to the beads was then washed five times in PBS 0.04% Igepal, eluted with PBS 0.04% Igepal, 1% SDS, 0.08 mg/ml proteinase K and incubated at 55 °C for 30 minutes with regular vortex. The BOUND RNA was collected in clean tubes, purified with proteinase K and isopropanol precipitation. RNA pellets were washed in ethanol 80%, dried, resuspended in RNase-free water, and finally stored at -80 °C until further use. After titration, the reverse transcription reaction was performed on 250 ng RNA with the RT<sup>2</sup> First Strand Kit (Qiagen) following the manufacturer's guidelines for small samples.

### Quantitative PCR

Since most of our results relied on qPCR analyses, we followed MIQE recommendations<sup>34</sup> and reported comprehensively our controls and validation checkpoints in the following paragraphs. Characteristics of targets and oligonucleotides are listed in Supplementary Table S1. Primers and probes were provided by Sigma after purification by a desalting procedure, except those already included in kits (Reference Gene Panel Mouse, TATAA Biocenter, Gothenburg, Sweden). Quantitative PCR reactions were performed in a final volume of 20 µl from either 50 ng of DNA or 2.5 µl of 10-fold diluted cDNA. All samples were analyzed in duplicates by StepOne Plus thermal cycler (Applied Biosystem). The predicted specificity of qPCR reactions was verified by UCSF *in silico* PCR (<http://genome.ucsf.edu/cgi-bin/hgPcr>). For SYBR green-based qPCR we also systematically validated the specificity by melting curve analysis. Quantification cycle ( $C_q$ ) values were calculated with StepOne software v2.3 using automatic baseline and a threshold fixed manually for each assay (Supplementary Table S1). DNA copy numbers were inferred by calibration curve quantitation established with serial dilutions of linearized plasmids containing the target sequences. Exclusion conditions including  $r^2$ , amplification efficiency, and linear dynamic range are listed in Supplementary Table S1. The different parameters analyzed in this study were obtained as follows: (i) for the determination of vector genome copy number (vg) per host diploid genome (dg) the mouse Albumin (mAlb) was selected as reference gene (vg/dg:  $2 \times \text{GFP copy number}/\text{mAlb copy number}$ ); (ii) for RT-qPCR analyses of GFP (RQ and RQ'), the reference gene was determined using the Reference Gene Panel Mouse (TATAA Biocenter). Twelve murine reference transcripts were analyzed; data were compared with NormFinder and GeNorm algorithms and Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Hprt) was selected as presenting the lowest variations between the analyzed tissues. RQ and RQ' were calculated with the  $2^{-\Delta C_q}$  method ( $RQ = 2^{-(C_q \text{ target} - C_q \text{ Hprt})}$ ) in the case of similar efficiencies between target and Hprt qPCR reactions. If the efficiencies were different, this calculation was adapted as follows:  $RQ = ((E \text{ Hprt}) \times (C_q \text{ Hprt})) / ((E \text{ target}) \times (C_q \text{ target}))$ , as previously described<sup>35</sup>; (iii) ChIP qPCR data were normalized using the Satellite-5 control target, which is comprised in a single copy LINE/LTR located in a murine gene and which was found particularly enriched in H3K9me3. ChIP relative enrichment was calculated from qPCR data as follows: Bound/(Bound+Unbound) for target sequences (RSV or GFP) divided by B/(B+U) obtained for Satellite-5; (iv) percentages of INPUT obtained after RNA IP were calculated from qPCR data by dividing the copy number of the desired target in the isolated fraction by the copy number of the same target in the INPUT. In each case, sensitivity thresholds were calculated using the smallest amount of plasmid template detected in calibration curves and the average copy number of reference gene measured by the appropriate qPCR.

### General data handling and statistical analysis

Data were processed using PRISM 5 software (GraphPad, La Jolla, CA). Most of the graphics were represented as "box and whiskers" plots, with the median value of the sample indicated as a line inside the box; box extremities: first to third quartiles; whiskers extremities: first to ninth deciles. Due to the small sample sizes (maximum 10 mice per separate group), data were analyzed using only the nonparametric Mann-Whitney U-test.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Region Pays de la Loire and the Association Française contre les Myopathies (AFM). The authors would like to thank Marine Allais, the Atlantic Gene Therapies Institute Vector Core, GENETHON Bioexperimentation department and

Biogenouest Genomics core facility for their technical assistance. We are also grateful to the AFM sponsored-DMD/µDys network which includes GENETHON, l'Institut de Myologie, Atlantic Gene Therapies and the Royal Holloway (UCL) for providing samples from Golden Retriever muscular dystrophy dogs. This work was performed under a Cooperative Agreement between INSERM, AFM, and the University of Florida Center of Excellence for Regenerative Health Biotechnology. R.S. owns equity in a gene therapy company that is commercializing AAV for gene therapy applications. To the extent that the work in this manuscript increases the value of these commercial holdings, R.S. has a conflict of interest.

### REFERENCES

- Emery, AEH, Muntoni, F and Quinlivan, RCM (2015). *Duchenne Muscular Dystrophy, Fourth edition*, Oxford Monographs on Medical Genetics.
- Goyenvalle, A, Vulin, A, Fougereousse, F, Leturcq, F, Kaplan, JC, Garcia, L *et al.* (2004). Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**: 1796–1799.
- Foster, H, Sharp, PS, Athanasopoulos, T, Trollet, C, Graham, IR, Foster, K *et al.* (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.
- Le Guiner, C, Montus, M, Servais, L, Chérel, Y, Francois, V, Thibaud, JL *et al.* (2014). Forelimb treatment in large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. *Mol Ther* **22**: 1923–1935.
- 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.
- Schmidt, WM, Uddin, MH, Dysek, S, Moser-Thier, K, Prkrer, 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.
- Colussi, C, Mozzetta, C, Gurtner, A, Illi, B, Rosati, J, Straino, S *et al.* (2008). HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 19183–19187.
- Renjini, R, Gayathri, N, Nalini, A and Srinivas Bharath, MM (2012). Oxidative damage in muscular dystrophy correlates with the severity of the pathology: role of glutathione metabolism. *Neurochem Res* **37**: 885–898.
- Penaud-Budloo, M, Le Guiner, C, Nowrouzi, A, Toromanoff, A, Chérel, Y, Chenuaud, P *et al.* (2008). Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* **82**: 7875–7885.
- Léger, A, Le Guiner, C, Nickerson, ML, McGee Im, K, Ferry, N, Moullier, P *et al.* (2011). Adeno-associated viral vector-mediated transgene expression is independent of DNA methylation in primate liver and skeletal muscle. *PLoS One* **6**: e20881.
- Isken, O and Maquat, LE (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev* **21**: 1833–1856.
- Schoenberg, DR and Maquat, LE (2012). Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nat Rev Genet* **13**: 246–259.
- Canton, M, Menazza, S and Di Lisa, F (2014). Oxidative stress in muscular dystrophy: from generic evidence to specific sources and targets. *J Muscle Res Cell Motil* **35**: 23–36.
- Rodriguez, MC and Tarnopolsky, MA (2003). Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **34**: 1217–1220.
- Dudley, RW, Daniyalou, G, Govindaraju, K, Lands, L, Eidelman, DE and Petrof, BJ (2006). Sarcolemmal damage in dystrophin deficiency is modulated by synergistic interactions between mechanical and oxidative/nitrosative stresses. *Am J Pathol* **168**: 1276–87; quiz 1404.
- Rivera, VM, Gao, GP, Grant, RL, Schnell, MA, Zoltick, PW, Rozamus, LW *et al.* (2005). Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105**: 1424–1430.
- Pacak, CA, Conlon, T, Mah, CS and Byrne, BJ (2008). Relative persistence of AAV serotype 1 vector genomes in dystrophic muscle. *Genet Vaccines Ther* **6**: 14.
- Cataldi, MP and McCarty, DM (2010). Differential effects of DNA double-strand break repair pathways on single-strand and self-complementary adeno-associated virus vector genomes. *J Virol* **84**: 8673–8682.
- Cervelli, T, Palacios, JA, Zentilin, L, Mano, M, Schwartz, RA, Weitzman, MD *et al.* (2008). Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins. *J Cell Sci* **121**(Pt 3): 349–357.
- Lovric, J, Mano, M, Zentilin, L, Eulalio, A, Zaccagna, S and Giacca, M (2012). Terminal differentiation of cardiac and skeletal myocytes induces permissivity to AAV transduction by relieving inhibition imposed by DNA damage response proteins. *Mol Ther* **20**: 2087–2097.
- Cataldi, MP and McCarty, DM (2013). Hairpin-end conformation of adeno-associated virus genome determines interactions with DNA-repair pathways. *Gene Ther* **20**: 686–693.

23. Acharyya, S, Sharma, SM, Cheng, AS, Ladner, KJ, He, W, Kline, W *et al.* (2010). TNF inhibits Notch-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy. *PLoS One* **5**: e12479.

24. Ayrapetov, MK, Gursoy-Yuzugullu, O, Xu, C, Xu, Y and Price, BD (2014). DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 9169–9174.

25. Xu, Y, Xu, C and Price, BD (2012). Mechanistic links between ATM and histone methylation codes during DNA repair. *Prog Mol Biol Transl Sci* **110**: 263–288.

26. Tateyama, M, Takeda, A, Onodera, Y, Matsuzaki, M, Hasegawa, T, Nunomura, A *et al.* (2003). Oxidative stress and predominant Abeta42(43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol* **105**: 581–585.

27. Shan, X, Tashiro, H and Lin, CL (2003). The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **23**: 4913–4921.

28. Poulsen, HE, Specht, E, Broedbaek, K, Henriksen, T, Ellervik, C, Mandrup-Poulsen, T *et al.* (2012). RNA modifications by oxidation: a novel disease mechanism? *Free Radic Biol Med* **52**: 1353–1361.

29. Jacobs, AC, Resendiz, MJ and Greenberg, MM (2010). Direct strand scission from a nucleobase radical in RNA. *J Am Chem Soc* **132**: 3668–3669.

30. Tanaka, M, Chock, PB and Stadtman, ER (2007). Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 66–71.

31. Shan, X, Chang, Y and Lin, CL (2007). Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *FASEB J* **21**: 2753–2764.

32. Görg, B, Qvarnkhava, N, Keitel, V, Bidmon, HJ, Selbach, O, Schliess, F *et al.* (2008). Ammonia induces RNA oxidation in cultured astrocytes and brain in vivo. *Hepatology* **48**: 567–579.

33. Chang, Y, Kong, Q, Shan, X, Tian, G, Ilieva, H, Cleveland, DW *et al.* (2008). Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS One* **3**: e2849.

34. Bustin, SA, Benes, V, Garson, JA, Hellemans, J, Huggett, J, Kubista, M *et al.* (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**: 611–622.

35. Pfaffl, MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. (2001). *Nucleic Acids Res* **29**: e45.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

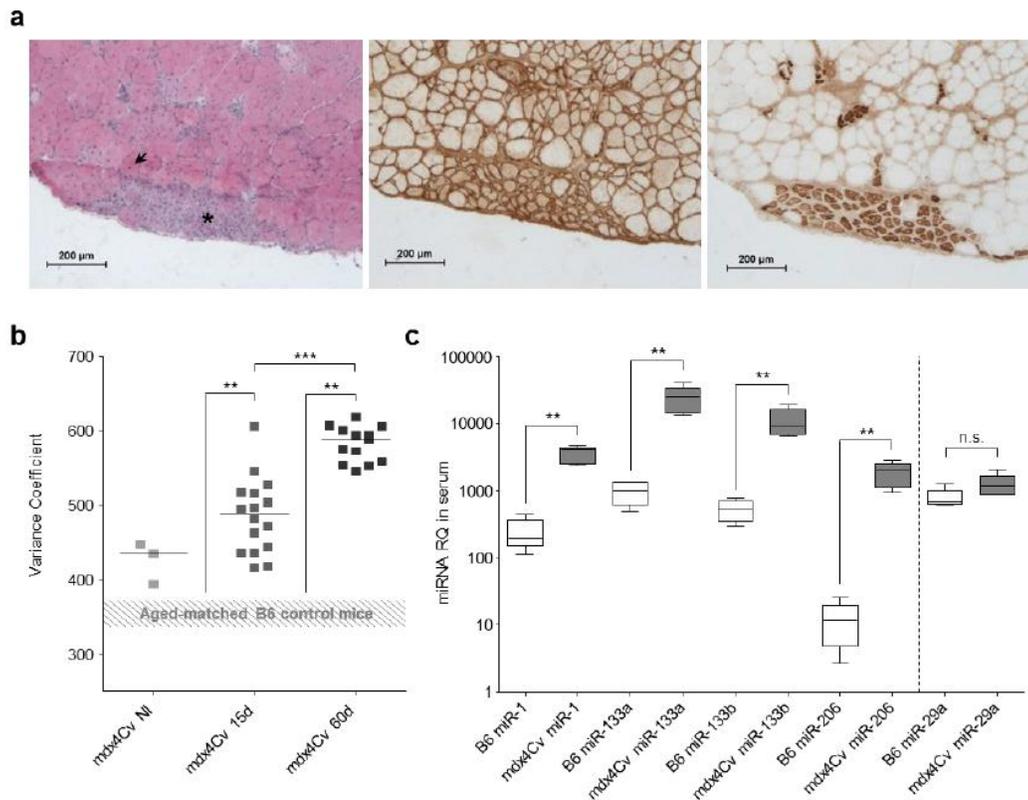
Supplementary Information accompanies this paper on the *Molecular Therapy—Methods & Clinical Development* website (<http://www.nature.com/mtm>)

**Short-lived rAAV transgene expression in dystrophic muscle is associated with oxidative damage to transgene mRNA**

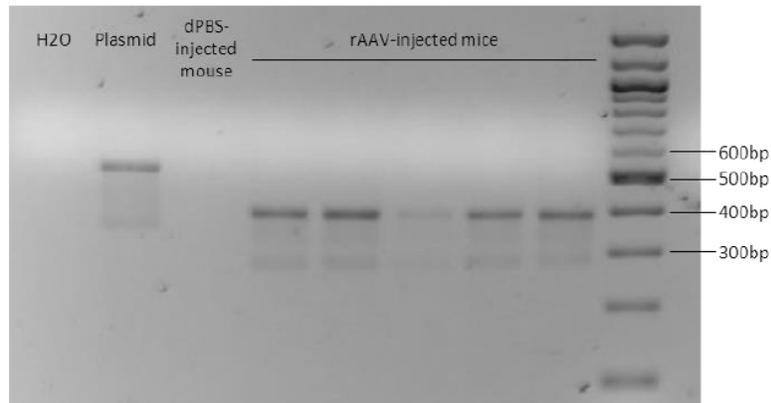
Jean-Baptiste Dupont, Benoit Tournaire, Christophe Georger, Béatrice Marolleau, Laurence Jeanson-Leh, Mireille Ledevin, Pierre Lindenbaum, Emilie Lecomte, Benjamin Cogné, Laurence Dubreil, Thibaut Larcher, Bernard Gjata, Laetitia Van Wittenberghe, Caroline Le Guiner, Magalie Penaud-Budloo, Richard O. Snyder, Philippe Moullier and Adrien Léger

**This file includes:**

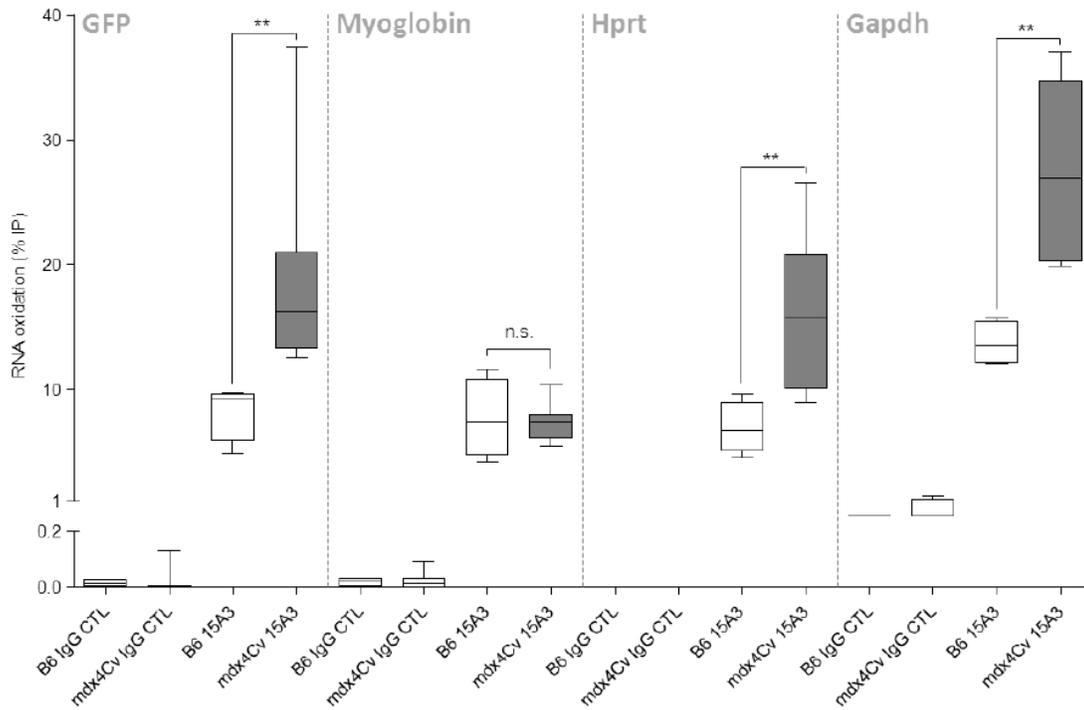
- **Figure S1:** Characterization of muscular dystrophy in mdx4Cv mice
- **Figure S2:** *In vivo* splicing of the pCI intron included in the injected rAAV vector
- **Figure S3:** Endogenous mRNA oxidation in mdx4Cv and B6 muscles
- **Figure S4:** Expression of genes involved in DNA damage response in mdx4Cv and B6 muscles
- **Supplementary Materials and Methods**
- **Supplementary References**



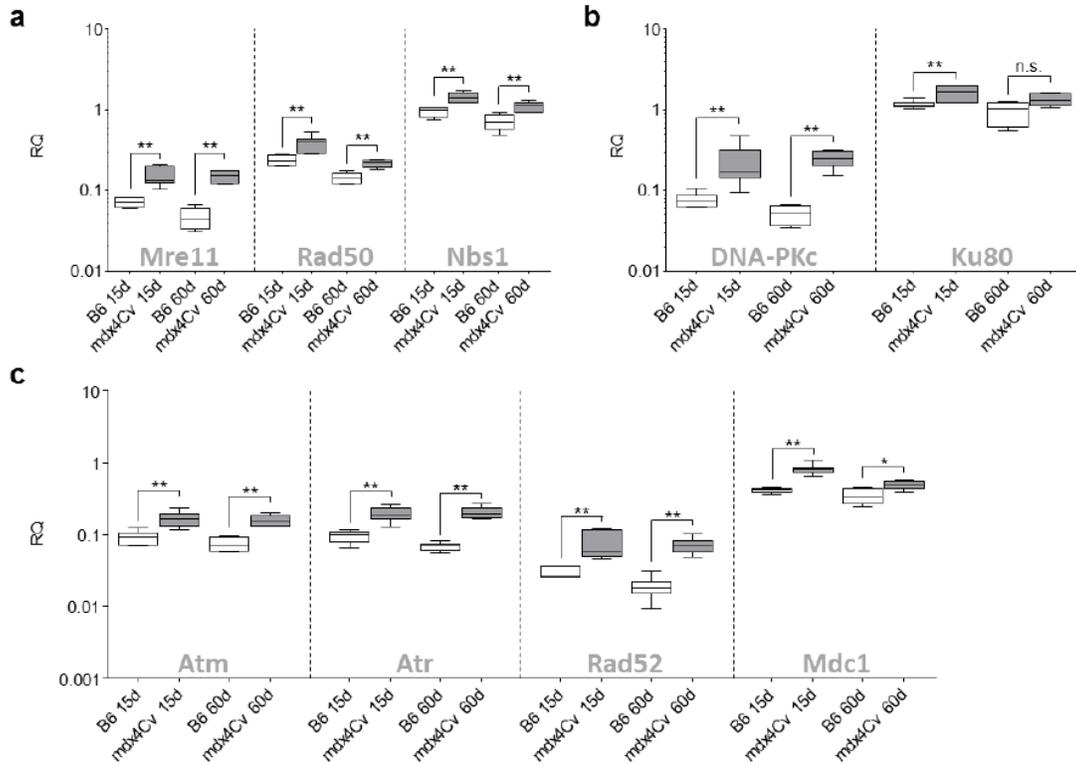
**Figure S1 Characterization of muscular dystrophy in mdx4Cv mice.** mdx4Cv mice and C57BL/6J (B6) controls injected intramuscularly with an AAV8-RSV-GFP vector ( $4.0 \times 10^{12}$  vg/kg) in *Tibialis anterior* (TA) were sacrificed 15 days (15d) or 60 days (60d) post injection. **(a)** Histological analysis of mdx4Cv muscle sections stained with Hematoxylin Phloxine Saffron (left), with an anti-laminin antibody (middle) or with an anti-developmental Myosin Heavy Chain antibody (right). Arrow: centronucleated cell; asterisk: regenerative area. **(b)** Quantification of muscle cell anisocytosis calculated as the variance coefficient of smallest Feret's diameters measured after laminin staining on muscle sections (see **a**, middle panel) following the protocol described by Briguet *et al*<sup>1</sup>. **(c)** Serum level of several Dystro-miRNA assessed by Taqman RT-qPCR. miR-16 was used to normalize the data, and miR-29 as a control considered to be unaffected by muscle dystrophy<sup>2</sup>. Data were represented as follows: median value (central line), 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartiles (box) and 1<sup>st</sup> and 9<sup>th</sup> deciles (whiskers) with  $n = 6$  mice per group. Statistics: Mann Withney's U-test; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; *n.s.*, non-significant.



**Figure S2** *In vivo* splicing of the pCI intron included in the injected rAAV vector. RT-PCR analysis of GFP mRNA after rAAV injection in TA muscles of mdx4Cv and C57BL/6J (B6) mice. Mice injected with D-PBS or with the rAAV vector were randomly selected and had their TA muscle processed through RNA extraction and RT-PCR. Primers (see **Table S1**) were designed to amplify a region overlapping the artificial pCI intron (Forward primer: AGCAAGCTTGAGATCTGCTTCA located downstream RSV TSS<sup>3</sup> and upstream of pCI; Reverse primer: TCTTGTAGTTGCCGTCGTCC located downstream of pCI). The unspliced and spliced GFP cDNA will result in bands at 522 and 389bp, respectively. The RT-PCR was performed on total muscle RNA using M-MLV Reverse Transcriptase kit (Life Technologies) and AmpliTaq GOLD (Life Technologies), following manufacturer's guidelines. Following RT-PCR, samples were run on a 2% agarose gel and DNA was stained with Ethidium Bromide. The vector plasmid was used as a control for the unspliced mRNA.



**Figure S3 Endogenous mRNA oxidation in mdx4Cv and B6 muscles.** RNA Immunoprecipitation analysis of endogenous mRNA oxidation at 13-15 weeks of age in the TA muscle of mdx4Cv mice and C57BL/6J (B6) controls, using a specific anti-8-HOG antibody (15A3). No relevant signal was obtained with the isotype control (IgG CTL) except with Gapdh for which data obtained with 15A3 are also elevated. The GFP results shown in the paper's main text are indicated on the left. Data are represented as follows: median value (central line), 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartiles (box) and 1<sup>st</sup> and 9<sup>th</sup> deciles (whiskers), with  $n = 4$  (B6) or 7 (mdx4Cv) mice per group. Statistics: Mann Withney's U-test; \*\*  $P < 0.01$ ; *n.s.*, non significant.



**Figure S4: Expression of genes involved in DNA damage response in mdx4Cv and B6 muscles (a-c)** DNA Damage Response (DDR) in mdx4Cv and B6 muscles assessed by specific SYBR Green RT-qPCR targeting genes from the Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) complex (a), the Non-Homologous End Joining pathway (b), or the Homologous Recombination pathway (c). Data were normalized using Hprt mRNA and represented as follows: median value (central line), 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> quartiles (box) and 1<sup>st</sup> and 9<sup>th</sup> deciles (whiskers) with n = 6 mice per group. Statistics: Mann Withney's U-test; \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ; \*\*\*  $P < 0.001$ ; n.s., non-significant.

## Supplementary Materials and Methods

### Detailed Chromatin Immunoprecipitation protocol

TA muscles (25 to 35%) were mixed with non-injected Quadriceps muscles (65 to 75%) for a total mass of 250 to 350 mg. Frozen muscles were pulverized under liquid nitrogen using mortar and pestle (Dutscher, Brumat, France). The resulting powder was kept at -80°C until further use.

Crosslinking was performed in 1% formaldehyde (Sigma) for 8 min after resuspension in PBS/NaBut (PBS / 20 mM Sodium Butyrate, Sigma / Complete EDTA-free anti-protease cocktail 1X, Roche, Basel, Switzerland). Following formaldehyde quenching in Glycine 0.125 M for 5 min and two washes in PBS/NaBut, the samples were incubated 10 min in cell lysis buffer (0.3 M sucrose / 10 mM Tris pH 7.4 / 2 mM EDTA / 7.5mM NaCl / 30 mM MgCl<sub>2</sub> / 20 mM NaBut / anti-protease 1X / 0.25% Igepal (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) / 0.5mM DTT (Sigma) in H<sub>2</sub>O). Nuclei release was helped by a mechanical lysis with a striated dounce homogenizer (Dutscher). The lysates were centrifuged at 1000 rpm for 10 min and nuclei pellets were incubated 10 min in nuclei lysis buffer (50 mM Tris pH 8.1 / 10 mM EDTA / 100 mM NaCl / 1% SDS / 20 mM NaBut / anti-protease 1X in H<sub>2</sub>O). The resulting chromatin was distributed in 1.5 ml aliquots and fragmented by sonication (Misonix S4000 sonicator with microtip) using the following program: intensity 70% and successive rounds of 20 s ON / 1 min OFF. A total energy of 3200J was delivered to each aliquot. The chromatin fragments were cleared by centrifugation (2 x 10 min at 14000 rpm) and snap-frozen in liquid nitrogen.

An aliquot (200 µl) was saved to check sonication efficiency: crosslinking was reversed with NaCl 0.4 M O/N at 65°C and DNA was purified using RNase A (Sigma), Proteinase K (Roche) and two successive organic extractions in Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (Sigma) and Phenol alone (MP Biomedicals, Santa-Ana, California, USA), respectively. Purified DNA was finally run on a 1.5 % agarose gel in Tris-Acetate-EDTA. The chromatin was kept for subsequent IP only if DNA fragments had a length comprised between 100 and 1000 bp with an average of 250 to 350 bp. This pattern was achieved for all mice except 3 C57BL/6J (1 at 15 days and 2 at 60 days pi), which were removed from the analysis.

## Dupont et al. - rAAV-derived mRNA oxidation in dystrophic muscles - Supplementary material

For the IP, the chromatin was thawed at +4°C, diluted to 1:10 in IP buffer (25 mM Tris pH 8.1 / 5 mM EDTA / 150 mM NaCl / 0.1% Triton X-100 (Sigma) / 20 mM NaBut / anti-protease 1X in H<sub>2</sub>O) and incubated 1 hr at +4°C with Protein A-sepharose beads (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) pre-blocked with purified Bovine Serum Albumin (BSA, Sigma) and salmon sperm DNA (Sigma) to remove the non-specific binding fraction. The clarified chromatin was then incubated with the appropriate antibody O/N at +4°C with gentle rotation. The chromatin/antibody complexes were captured with protein A-sepharose beads (20 µl per µg of chromatin) for 4 hr at +4°C with gentle rotation. After centrifugation 3 min at 3200 rpm, the UNBOUND (U) fractions were stored at +4°C until further use. The beads were washed two times in low salt buffer (0.1% SDS / 1% Triton X-100 / 2 mM EDTA / 20 mM Tris pH 8.1 / 150 mM NaCl in H<sub>2</sub>O), once in high salt buffer (low salt buffer with 500 mM NaCl), once in LiCl buffer (0.25 mM LiCl, 1% Igepal (Sigma) / 1% Sodium deoxycholate / 0.1 mM EDTA / 10 mM Tris pH 8.1 in H<sub>2</sub>O) and twice in TE 10:1 (10 mM Tris pH8.1 / 1 mM EDTA in H<sub>2</sub>O). Each washing step was performed at RT for 5 min with gentle rotation. The chromatin was then eluted with 2 x 250 µl of an elution solution pre-warmed at 65°C (50 mM NaHCO<sub>3</sub> / 0.1 mM EDTA / 1% SDS in H<sub>2</sub>O), in two successive 15 min incubations under gentle rotation. The resulting BOUND (B) fractions and the UNBOUND fractions were reverse-crosslinked O/N at 65°C in 500 mM NaCl and the DNA was isolated and purified as described above. After determining the concentration at 260 nm with µDrop plate and Multiskan Microplate Reader (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), DNA samples were diluted to 10 ng/µl and stored at -20°C.

### Evaluation of anisocytosis on muscle sections

The anisocytosis was assessed by staining muscle sections against the membrane protein laminin: frozen tissues were cut in 8µm cross sections and collected on slides. Endogenous peroxidases were inhibited with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min and non-specific binding sites were blocked 30 min in 10% goat serum, at Room Temperature (RT). Incubation with the anti-laminin antibody (rabbit polyclonal antibody, Dako Z0097, dilution 1:1000, Troy, Michigan, USA) was performed O/N at 4°C. After washing in PBS, the sections were incubated 30 min at RT with the secondary antibody (Envision+ System-HRP, Dako K4006). Then, the HRP reaction was performed with DAB (Dako K3466), slides were washed 5 min with water, dehydrated with successive ethanol baths, incubated 2x5 min in xylene (Carlo-Erba 528251, Milan, Italy) and mounted with Eukkit

## Dupont et al. - rAAV-derived mRNA oxidation in dystrophic muscles - Supplementary material

(LABONORD 05347505, Templemars, France). Sections were observed using an optic microscope (NIKON Eclipse E600, Tokyo, Japan) in bright field. The anisocytosis was determined as recommended by Briguet *et al.*<sup>1</sup> using Ellix software (Microvision, Evry, France) to calculate the smallest Feret's diameter for each cell. The variance coefficient for each mouse was calculated from the data set of an entire muscle section, as follows:  $1000 * \text{sd} / \text{mean}$ .

### HPS Staining of muscle sections

Hematoxylin Phloxine Saffron (HPS) staining was performed on 5µm cryosections. Slides were stained 5 min with Gill's Hematoxylin II (Diapath, C0263, Martinengo, Italy), few seconds in lithium carbonate (VWR), 2 min in phloxine (Labonord, 07907833), dehydrated in absolute ethanol before staining 2 min in saffron (Microm Microtech, F/SAFRAN2, Francheville, France) and then washed in water. Finally the sections were dehydrated with successive ethanol baths, cleared in toluene and mounted with Pertex mounting medium (HistoLab, 00811, Gothenburg, Sweden). Hematoxylin colors nuclei in red, Phloxine stains the cytoplasm in pink and Saffron the collagen in yellow.

### Quantification of micro-RNA in the serum

RNA was isolated using miRNeasy extraction kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) from 150 µl of mouse serum. Briefly, the first step used a 5:1 volume ratio for Qiazol:serum and was followed by the manufacturer's guidelines. RNA was eluted in 50 µl RNase-free water, precipitated overnight and resuspended in 10 µl RNase free water. Total RNA were quantified by using a Nanodrop spectrophotometer (ND8000 Labtech, Wilmington, Delaware, USA) and analyzed using the Agilent small and pico RNA kit in the 2100 bioanalyzer (Agilent, Santa Clara California, USA). miRNA (10 ng) were converted to cDNA via miRNA-specific stem loop RT primers (Applied Biosystems miRNA assays, Thermo, Waltham, Massachusetts, USA) following manufacturer's instructions. The Cq measurement was performed in a 7900HT Real-Time PCR system (Applied Biosystems) with Mouse Taqman MicroRNA Assays targeting miR 1, miR 133a, miR 133b, miR 206 and miR 29a (Applied Biosystems). For all these assays Cq threshold was fixed at 0.2. Raw Cq were normalized with miR 16 ( $2^{-\Delta Cq}$  method).

**Muscle expression level of DNA Damage Response genes**

Levels of expression for DNA damage response genes were measured from total muscle mRNA by RT-QPCR on RT<sup>2</sup> Profiler PCR Arrays (Qiagen) using SYBR Green-optimized primer sets designed and provided by the manufacturer for the following genes: Atm, Atr, DNA-PKc, Mdc1, Mre11, Nbs1, Rad50, Rad52. Data were analyzed following manufacturer's guidelines and normalized with Hprt mRNA level.

### Supplementary References

1. [Briguet, A, Courdier-Fruh, I, Foster, M, Meier, T and Magyar, JP \(2004\). Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. \*Neuromuscul. Disord. NMD\* 14: 675–682.](#)
2. [Vignier, N, Amor, F, Fogel, P, Duvallet, A, Poupiot, J, Charrier, S, et al. \(2013\). Distinctive serum miRNA profile in mouse models of striated muscular pathologies. \*PLoS One\* 8: e55281.](#)
3. [Mobley, CM and Sealy, L \(1998\). Role of the transcription start site core region and transcription factor YY1 in Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter activity. \*J. Virol.\* 72: 6592–6601.](#)

## Conclusions

Au vu des résultats présentés et discutés dans cette première étude, plusieurs conclusions peuvent être tirées :

- nous avons confirmé la plus faible efficacité de transduction des vecteurs AAVr dans un contexte musculaire déficient en dystrophine. De même, nous avons pu corrélérer en partie ces résultats avec une perte plus importante des génomes de vecteurs au cours de notre période d'étude ;
- grâce à un nombre d'animaux suffisamment important et aux différents paramètres mesurés, nous avons pu estimer l'implication de cette perte de vg sur la différence d'expression du transgène entre muscles déficients en dystrophine et muscles contrôles. Nos résultats suggèrent fortement que d'autres facteurs de restriction sont impliqués, et que ceux-ci agissent majoritairement au niveau post-transcriptionnel ;
- parmi les facteurs de restriction potentiellement impliqués, nous avons mis en évidence que le niveau d'oxydation de l'ARNm du transgène était plus élevé dans les muscles mdx4Cv, à même de contribuer à leur dégradation potentiellement par NGD (**Introduction partie 4.2.2.3.b**) ;
- enfin, nous avons confirmé la pertinence de ces résultats dans un modèle de chien GRMD ayant reçu un vecteur AAVr exprimant un transgène thérapeutique. Dans ce contexte, même si une oxydation de l'ARNm transgénique peut également être détectée, celle-ci semble contrecarrée lorsque l'expression du transgène dépasse un certain seuil thérapeutique.

Il semble donc que le muscle déficient en dystrophine soit un environnement particulièrement défavorable à une transduction efficace et durable par un vecteur AAVr. Le fait que ce tissu ne soit pas réellement quiescent mais en constante régénération, associé aux nombreuses perturbations métaboliques qui y sont observées (dans notre cas, le stress oxydatif tout particulièrement), a pour conséquence une expression sub-optimale de la protéine transgénique. Deux éléments encourageants ressortent néanmoins de notre étude : en premier lieu, les résultats obtenus chez le chien GRMD semblent confirmer l'hypothèse selon laquelle au-delà d'un certain niveau d'expression, un transgène thérapeutique puisse être maintenu à long terme dans les muscles dystrophiques injectés et y contrer les phénotypes normalement

responsables de son élimination. Toutefois, cette observation implique potentiellement l'injection de doses importantes de vecteur, posant les problèmes déjà mentionnés dans la **Synthèse** de l'introduction de ce manuscrit. Deuxièmement, nous avons désormais identifié l'oxydation de l'ARNm du transgène comme étant un facteur de restriction potentiel de la transduction des muscles déficients en dystrophine par les vecteurs AAVr. Or, il existe de nombreux composés pharmacologiques capables de diminuer le stress oxydatif *in vivo*, notamment chez la souris mdx (**Tableau 3**). L'administration de tels composés pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des vecteurs AAVr chez ces souris, en améliorant non pas le vecteur, mais le tissu musculaire qu'il transduit.

## **Étude II**

**Étude des effets du N-Acétylcystéine sur la  
transduction d'un vecteur AAVr dans le muscle  
déficient en dystrophine**

## Objectifs

Dans la deuxième partie de ce travail de thèse, nous avons cherché à élaborer une stratégie innovante chez la souris mdx4Cv, en combinant l'injection d'un vecteur AAVr avec un traitement pharmacologique pertinent. Le rationnel de cette stratégie était le suivant : l'amélioration pharmacologique de certains phénotypes musculaires de la DMD préalablement à l'injection du vecteur AAVr devrait permettre de créer un environnement cellulaire et moléculaire plus favorable à la transduction des cellules déficientes en dystrophine par ce dernier. Les objectifs étaient les suivants :

- limiter la perte de génomes de vecteur observée au cours de notre étude précédente (**Étude I**) ainsi que par une autre équipe ([Le Hir 2013](#)) ;
- réduire le stress oxydatif au sein des cellules musculaires des souris mdx4Cv dans le but de diminuer le pourcentage d'oxydation de l'ARNm du transgène ;
- augmenter *in fine* le taux d'ARNm utilisables pour la production de la protéine transgénique dans les cellules musculaires des souris mdx4Cv.

À plus long terme, ce type d'approche pourrait permettre d'améliorer l'indice thérapeutique des vecteurs AAVr dans le cadre de la DMD, c'est-à-dire de diminuer la dose de vecteur qu'il est nécessaire d'injecter pour observer un bénéfice thérapeutique. Ceci réduirait en retour les risques potentiels liés à cette injection.

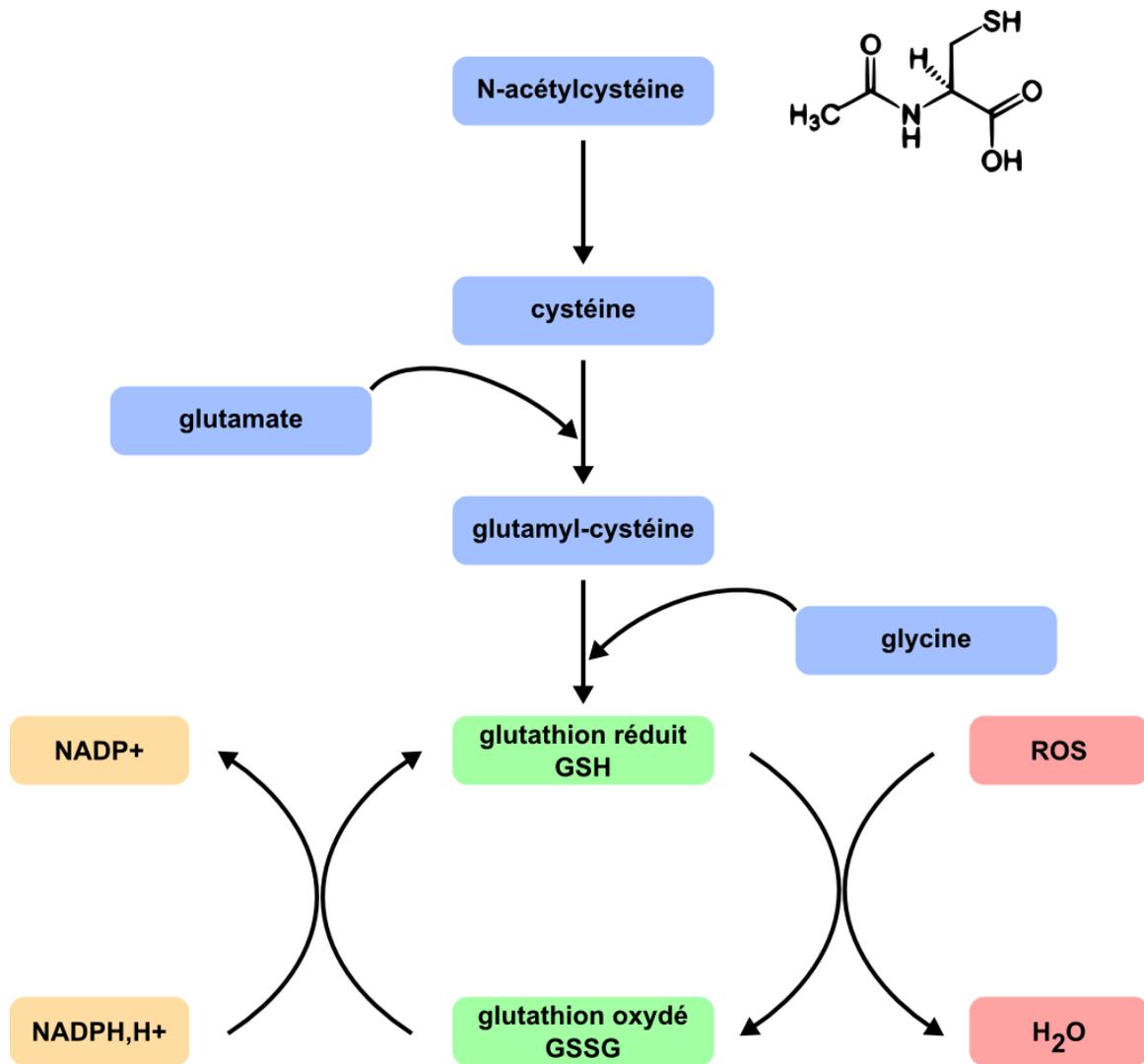
## Stratégie expérimentale

### Composé pharmacologique et déroulement du protocole

Il nous fallait d'abord sélectionner un composé pharmacologique susceptible d'améliorer la stabilité du génome AAVr et de l'ARNm transgénique dans les cellules musculaires des souris mdx4Cv. Compte tenu de nos résultats précédents suggérant un rôle important du stress oxydatif sur la stabilité post-transcriptionnelle de l'ARNm, nous nous sommes intéressés à la famille des composés ayant des effets anti-oxydants bien caractérisés. Certaines molécules de cette famille ont déjà été testées chez les souris mdx (**Tableau 3**). L'idébénone aurait pu être un candidat intéressant ([Buyse 2009](#)) : cette molécule synthétique fonctionne en partie en empêchant la

peroxydation des lipides membranaires mitochondriaux, améliorant l'efficacité de la chaîne respiratoire et diminuant le stress oxydatif qu'elle génère. Si ses effets bénéfiques sur les fonctions cardio-respiratoires ont été récemment démontrés lors d'un essai clinique de phase III ([Buyse 2015](#)), son efficacité sur les muscles squelettiques n'a pas été caractérisée. Plusieurs polyphénols naturels, notamment extraits du thé vert (épigallocatechine gallate, EGCG, [Dorchies 2006](#), [Nakae 2008](#)) ou du raisin (resvératrol, [Hori 2011](#), [Kuno 2013](#)), ont également prouvé leur efficacité chez la souris mdx. Mais si ces deux composés ont permis l'amélioration de différents phénotypes pathologiques dans ce modèle (nécrose, fibrose, stress oxydatif, perméabilité membranaire), leur efficacité chez l'Homme n'a pas encore été clairement démontrée. Dans l'optique de pouvoir éventuellement appliquer notre stratégie rapidement aux patients DMD, nous nous sommes plutôt tournés vers un composé couramment utilisé en médecine humaine : le N-acétylcystéine ([NAC](#)). Chez des souris mdx, un traitement au NAC permet une amélioration notable du phénotype aussi bien dans des muscles appendiculaires (EDL et TA, [Whitehead 2008](#)) que dans le coeur ([Williams 2007](#)) ou le diaphragme ([de Senzi Moraes Pinto 2013](#)). Ce traitement permet non seulement de diminuer le niveau de ROS superoxydes *in situ*, mais améliore également la centronucléation, la nécrose, la perméabilité membranaire et l'inflammation médiée par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. Chimiquement, le NAC est un précurseur de la cystéine, un acide aminé qui entre dans le métabolisme du glutathion réduit (GSH, **Figure 35**). Le NAC permet donc indirectement d'augmenter le niveau de GSH et de jouer sur la balance oxydo-réductrice des cellules traitées en faveur d'un environnement réducteur capable de neutraliser les ROS ([Corcoran 1985](#), [Sandström 2006](#)).

Afin d'améliorer le phénotype des muscles dans lesquels le vecteur AAVr sera injecté, nous souhaitons débiter le traitement au NAC suffisamment longtemps avant l'injection. Dans les études pré-citées, les souris mdx étaient traitées entre l'âge de 3 et 9 semaines ([Williams 2007](#), [Whitehead 2008](#)). La toxicité à long terme du NAC chez les souris mdx n'ayant pas été rapportée, nous avons essayé de mimer au maximum ces conditions. De plus, nous avons également tenté de reproduire les conditions d'injection réalisées dans notre **Étude I**, à savoir l'utilisation du modèle mdx4Cv, une injection de vecteur AAVr entre 5 et 7 semaines d'âge, et une analyse 60 jours après injection. En tenant compte de ces paramètres, nous avons fixé le protocole de traitement et les différents groupes de souris (**Figure 36**).

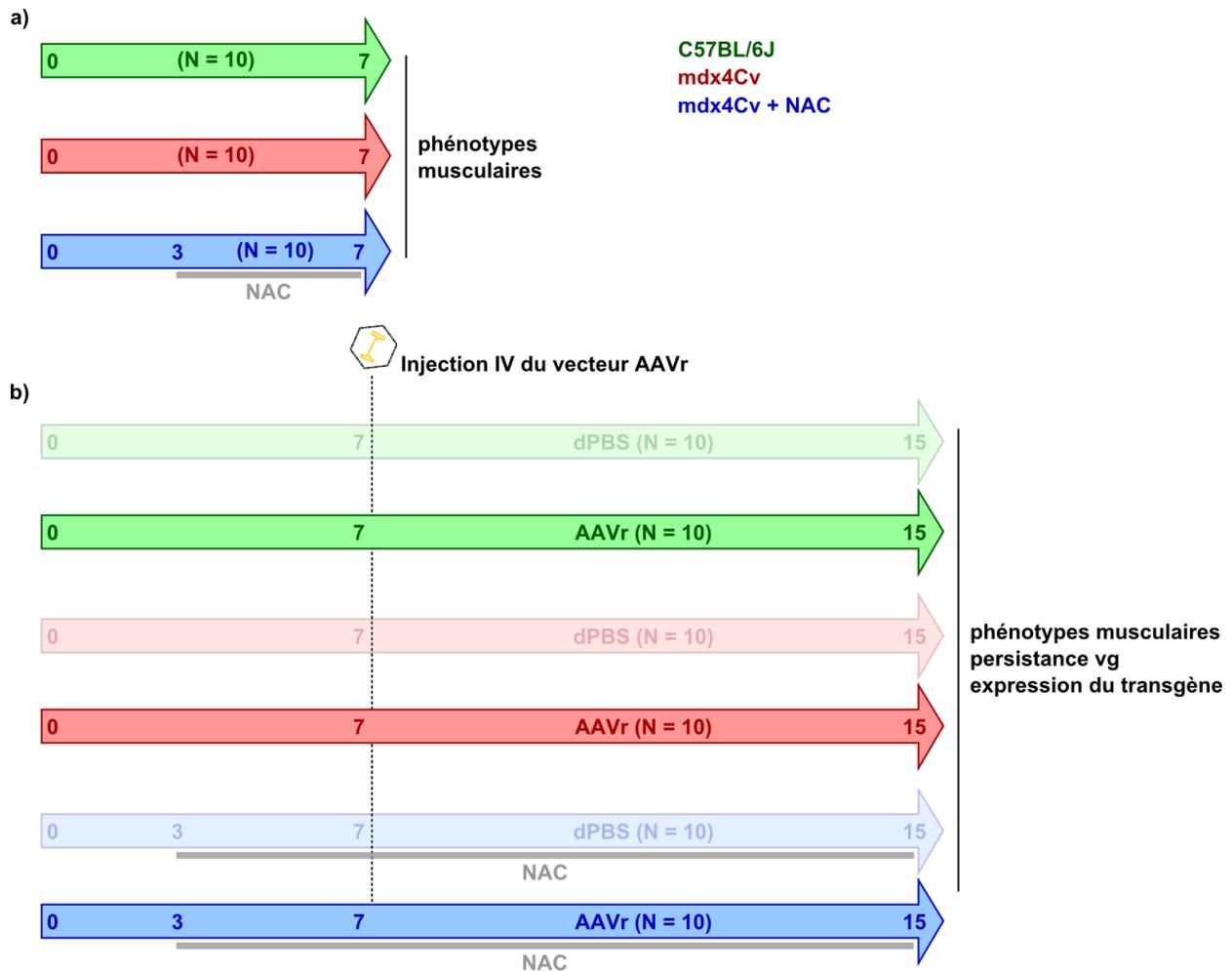


**Figure 35** : Métabolisme intracellulaire du NAC. Rapidement après sa pénétration dans le cytosol, le NAC est transformé en cystéine par des N-désacétylases. L'ajout de glutamate (liaison  $\gamma$  non-peptidique) puis de glycine (liaison peptidique) aboutit à la formation de GSH. Les molécules de GSH peuvent neutraliser les ROS en formant des ponts disulfures entre elles. Le recyclage de GSH à partir de GSSG fait intervenir le coenzyme libre d'oxydoréduction NADPH,H<sup>+</sup> et l'enzyme glutathion réductase.

## Vecteur AAVr utilisé et voie d'administration

### a. Choix du transgène

Similairement à notre première étude, nous avons sélectionné un transgène rapporteur



**Figure 36 :** Récapitulatif du protocole d'injection et des souris utilisées lors de l'étude II. Les flèches vertes (B6), rouges (mdx4Cv) et bleues (mdx4Cv + NAC) indiquent les âges des souris en semaines. Les barres grises sous les flèches bleues indiquent l'étendue des périodes de traitement au NAC. On distingue ainsi 2 lots de souris : le premier (a) contenant 30 animaux, euthanasiés à 7 semaines d'âge, ne recevant aucun vecteur AAVr ; le deuxième (b) contenant 60 animaux (20 pour chaque groupe), euthanasiés à 15 semaines d'âge, 8 semaines après avoir reçu le vecteur AAVr ou le tampon de formulation (dPBS).

non-thérapeutique. En effet, nous souhaitons que le seul bénéfice thérapeutique susceptible d'améliorer la persistance et l'efficacité du vecteur soit apporté par le traitement pharmacologique. En cas de succès, cette approche n'en sera que plus prometteuse dans le cas d'un vecteur thérapeutique, susceptible d'agir en synergie avec le NAC. De plus, nous voulions pouvoir analyser l'expression du transgène de manière continue au cours du protocole, afin de pouvoir détecter un effet même transitoire du traitement. Pour ce faire, nous nous sommes

tournés vers une phosphatase alcaline murine endogène spécialement modifiée pour satisfaire cette exigence : le transgène *murine secreted alkaline phosphatase* (muSeAP, [Wang 2001](#)). Le gène d'origine, nommé *Alkaline phosphatase, placental-like 2* ([Alpl2](#)), code pour une phosphatase alcaline exprimée chez l'embryon murin depuis le stade "2-cellules" jusqu'au stade blastocyste ([Hahnel 1990](#)). Chez la Souris adulte, l'expression de ce gène est limitée uniquement à l'intestin et aux testicules. La protéine Alpl2 endogène possède en C-terminal un domaine permettant son ancrage membranaire dont l'absence provoque la libération de l'enzyme muSeAP dans le milieu extracellulaire. *In vivo*, la protéine délétée en C-terminal conserve son activité enzymatique, qui peut être quantifiée par un test d'activité à partir d'un simple prélèvement de sérum ([Wang 2001](#)). Le transgène muSeAP a déjà été inclus dans des vecteurs AAVr et utilisé chez des modèles murins de dystrophie musculaire, notamment la souris mdx ([Bartoli 2006](#)). Dans cette étude, muSeAP a été utilisé en tant que témoin de l'efficacité thérapeutique d'un vecteur AAVr. Dans le sérum des souris mdx ayant reçu le vecteur thérapeutique, l'activité muSeAP a été mesurée plus forte et persistante à long terme, par opposition aux souris injectée avec du PBS. Par ailleurs, chez la souris saine, ce même transgène a été employé en temps que rapporteur pour tester l'efficacité de différents polymères sur la transduction d'un vecteur AAVr2/2 ([Moulay 2010](#)). Ainsi, le système expérimental muSeAP a déjà été employé dans deux types de protocoles expérimentaux différents du point de vue de leur objectif :

- l'un visant à mesurer l'efficacité thérapeutique d'un traitement donné chez la souris dystrophique ([Bartoli 2006](#)) ;
- le deuxième mesurant l'effet de composés particuliers sur l'efficacité de transduction par un vecteur AAVr ([Moulay 2010](#)).

Notre étude combinera ces deux approches chez la souris mdx4Cv, puisque notre vecteur AAVr muSeAP permettra simultanément de mesurer l'influence du NAC sur le phénotype dystrophique ainsi que sur la persistance et l'efficacité du vecteur.

Lors de l'**Étude I**, nous avons mis à profit la présence de l'intron synthétique pCI pour mesurer le niveau d'ARN pré-messager *gfp*. Mais compte tenu de la taille de cet intron et de sa proximité par rapport au promoteur RSV, nous avons du nous contenter de la population d'ARN totale, sans mesurer directement le niveau d'ARNm épissé. Pour cette nouvelle étude, nous avons pu cloner dans le génome de notre vecteur l'intégralité des 11 exons et des 10 introns endogènes du gène *Alpl2* à partir du génome murin (taille totale : 2650 pb), à l'exception de

l'extrémité 3' de l'exon 11, tronquée pour permettre la sécrétion de la protéine transgénique ([Manes 1990](#)).

## b. Choix du promoteur

Lors de cette deuxième étude, nous avons également cherché à nous rapprocher des paramètres expérimentaux utilisés à l'heure actuelle dans les études pré-cliniques de thérapie génique pour la DMD. Compte tenu de la réponse immunitaire observée lors du premier essai clinique utilisant un promoteur viral de type CMV chez des patients DMD ([Mendell 2010](#)), les futures études favoriseront probablement des promoteurs endogènes ou synthétiques orientés vers les cellules musculaires. Parmi eux, nous avons sélectionné le promoteur c5-12, qui présente l'avantage d'être de taille réduite (312 pb) et de s'exprimer à bas niveau dans des tissus non-musculaires ([Li 1999](#)). À l'inverse, son activité est élevée (parfois supérieure à celle des promoteurs viraux CMV ou RSV) dans les tissus musculaires, y compris le cœur ([Wang 2008](#)) et dans une moindre mesure le diaphragme ([Foster 2008](#)). Ce promoteur a déjà été inclus à plusieurs reprises dans des vecteurs AAVr injectés à des souris mdx ([Bartoli 2006](#), [Foster 2008](#), [Lai 2014](#)), et est actuellement testé chez le chien GRMD où il dirige l'expression d'une version optimisée de la microdystrophine ([Koo 2011](#), **Étude I** et **Caroline Le Guiner, manuscrit en préparation**). D'un point de vue moléculaire, le promoteur synthétique c5-12 a été généré par l'assemblage aléatoire d'éléments de régulation répondant aux facteurs de transcription myogéniques, et présents au sein des promoteurs et *enhancers* de la majorité des gènes musculaires ([Li 1999](#)).

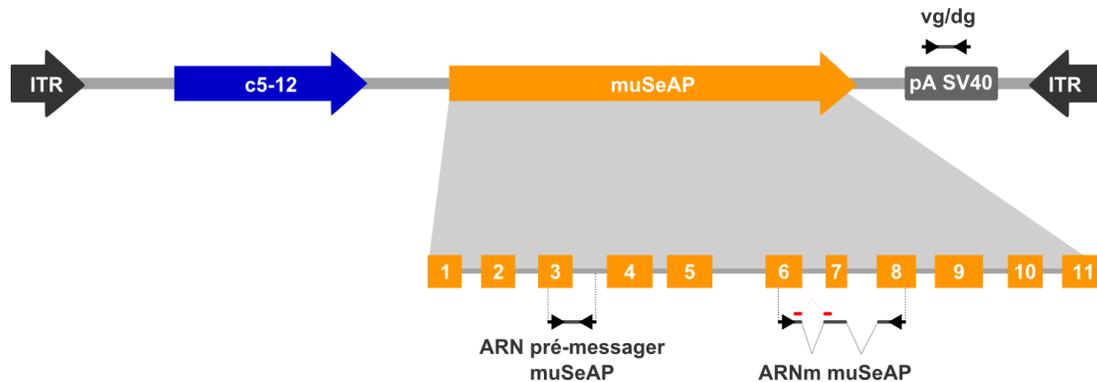
Le plasmide contenant la cassette AAVr exprimant l'ADNc muSeAP sous le contrôle du promoteur c5-12 nous a été fourni par l'équipe d'Isabelle Richard (Généthon, Évry). Nous y avons simplement remplacé cet ADNc par le fragment d'ADN génomique *Alpl2* tronqué en 3' de l'exon 11.

## c. Choix du sérotype et de la voie d'administration

Toujours dans l'idée de nous approcher au maximum d'un plan d'étude préclinique pertinent, nous avons opté pour un mode d'injection systémique en IV, afin de cibler le maximum de muscles, non seulement les muscles appendiculaires, mais aussi le cœur et le diaphragme. Pour ce faire, nous avons mentionné précédemment que les sérotypes 6, 7, 8 et 9 étaient connus pour avoir un tropisme assez large suivant une injection IV chez la souris

(Zincarelli 2008, Figure 18). Cette observation est particulièrement valable pour le sérotype 9, qui est également capable de cibler le coeur avec le plus d'efficacité (Inagaki 2006). Après euthanasie, nous pourrions ainsi analyser différents types de prélèvements musculaires, parmi lesquels le TA, le Quadriceps, le diaphragme ou encore le coeur.

Un lot de vecteurs AAVr2/9 c5-12 muSeAP (Figure 37) a donc été produit par la « Plateforme Production de vecteurs viraux pré-cliniques et cliniques » de notre laboratoire.



**Figure 37** : Schéma du vecteur AAVr2/9 c5-12 muSeAP utilisé dans l'étude II. Le gène murin *Alpl2* a été volontairement tronqué au niveau de l'exon 11, afin de créer une version génomique de muSeAP contenant les 10 introns endogènes. Pour la mesure du vg/dg, le fragment amplifié par qPCR est situé au niveau du pA *Simian Virus 40* (SV40). Par RT-qPCR, l'ARN pré-messager *muSeAP* est quantifié par un fragment situé au niveau de la jonction exon3-intron3. Enfin, l'ARNm épissé est quantifié par un fragment allant de l'exon6 à l'exon8, et une sonde au niveau de la jonction exon6-exon7.

**Tableau 9 : Récapitulatif des souris utilisées lors de l'Etude II**

souche	provenance	traitement	produit injecté	voie d'injection	dose injectée (vg)	âge à l'injection	âge à l'euthanasie	N
C57BL/6J	Charles River	H2O	NA	NA	NA	NA	7 semaines	10
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	H2O	NA	NA	NA	NA	7 semaines	10
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	NAC	NA	NA	NA	NA	7 semaines	10
C57BL/6J	Charles River	H2O	AAVr	IV (veine caudale)	1,5E+12	7 semaines	15 semaines	10
			dPBS		NA			10
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	H2O	AAVr	IV (veine caudale)	1,5E+12	7 semaines	15 semaines	10
			dPBS		NA			10
mdx4Cv	Généthon (élevage interne)	NAC	AAVr	IV (veine caudale)	1,5E+12	7 semaines	15 semaines	10
			dPBS		NA			10

## Principaux paramètres mesurés et méthodes d'analyse

Cette étude comporte deux parties distinctes, visant à répondre à deux questions complémentaires mais pouvant être traitées séparément :

- **objectif N°1** : dans un premier temps, nous souhaitons évaluer l'effet d'un traitement de 4 semaines au NAC sur la physiopathologie musculaire des souris mdx4Cv, afin d'obtenir des informations sur le phénotype du tissu dans lequel le vecteur AAVr sera ensuite injecté. Trente premières souris (10 mdx4Cv traitées au NAC, 10 mdx4Cv non traitées et 10 C57BL/6J non traitées, **Figure 36a**) ont été dédiées à cette première analyse. Les animaux ont été traités entre 3 et 7 semaines d'âge, puis euthanasiés au terme du protocole ;
- **objectif N°2** : en parallèle, d'autres souris ont reçu notre vecteur AAVr (ou le tampon de formulation dPBS) à 7 semaines d'âge, et ont été suivies pendant 8 semaines après injection (euthanasie à 15 semaines d'âge). Pendant cette période, le traitement au NAC a été maintenu pour les souris mdx4Cv concernées (**Figure 36b**).

L'analyse des prélèvements des souris de l'objectif N°2 étant à peine commencée à l'heure de l'écriture de ce manuscrit, elles n'y seront pas incluses. Les résultats présentés ci-après sont donc focalisés sur l'objectif N°1 ; Toutefois, quelques éléments de la méthodologie adoptée afin de réaliser l'objectif N°2 seront détaillés ci-après.

### Objectif N°1 : Efficacité du traitement au NAC au moment de l'injection du vecteur

Cette première partie visait donc à évaluer l'effet du NAC sur la pathologie musculaire des souris mdx4Cv, après un traitement d'un mois. Pour cela, différents outils histologiques étaient à notre disposition, parmi lesquels ceux déjà utilisés lors de notre première étude. Pour ce projet, nous avons ainsi reconduit la quantification de l'anisocytose selon le protocole établi par Briguet *et al.* ([Briguet 2004](#)). La mesure de ce paramètre nous permettra d'avoir une vision globale de l'état général du muscle au moment de l'injection du vecteur.

De plus, nous voulions également mesurer l'effet du NAC sur le stress oxydatif de manière plus directe. Pour cela, différentes sondes artificielles peuvent réagir avec certaines catégories de ROS et émettre en retour une fluorescence mesurable en microscopie ([Guide Molecular Probes](#)). Toutefois, ces techniques sont utilisées la plupart du temps sur des cellules

vivantes, et la pertinence de leur utilisation sur coupes de tissus congelés est difficile à estimer, compte tenu de la forte réactivité et de l'instabilité des ROS. De plus, l'utilisation de ces sondes présente certaines limitations, notamment à cause de leur aspécificité et des artefacts réactionnels qu'elles génèrent et qui peuvent mener à une amplification involontaire du niveau de ROS ([Kalyanaraman 2012](#)). Alternativement, il est possible de mesurer l'effet du stress oxydatif sur différentes molécules biologiques, notamment les protéines ([Iwasaki 2013](#)), les lipides ([Nakae 2008](#)) ou les acides nucléiques. Dans un premier temps, nous avons essayé de mettre au point un protocole d'immunofluorescence des ARN oxydés sur coupe de muscle murin, grâce à l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation des ARN lors de notre étude précédente. Malheureusement, cet anticorps n'a jamais permis d'obtenir un signal spécifique, robuste et reproductible. Nous nous sommes donc tournés vers les cassures double-brin de l'ADN, pouvant résulter d'un stress oxydatif ([Klaunig 2010](#)) et entraînant la phosphorylation du variant d'histone H2Ax autour de la cassure ([van Attikum 2009](#), [Iacovoni 2010](#)). Cette modification d'histone ( $\gamma$ H2Ax) est détectable par immunomarquage, une technique déjà utilisée sur des coupes musculaires de souris mdx ([Schmidt 2011](#)). En partant de ces résultats, nous avons donc développé un protocole d'immunofluorescence anti- $\gamma$ H2Ax sur coupe transversale de muscle murin.

Ces protocoles seront non seulement appliqués aux souris traitées au NAC pendant 4 semaines, mais seront également effectués sur les prélèvements des souris euthanasiées deux mois après l'injection du vecteur AAVr, afin d'évaluer l'effet du NAC sur le phénotype musculaire en fin d'étude.

## **Objectif N°2 : Effets du NAC sur la persistance et l'efficacité des vecteurs AAVr**

Afin de tester l'effet du NAC sur le devenir moléculaire des génomes d'AAVr et de l'ARNm transgénique, il nous fallait reproduire le même type de méthodes expérimentales que celles publiées dans notre étude précédente. Néanmoins, nous avons cherché à optimiser un certain nombre de paramètres, afin de pallier aux différentes critiques qui pouvaient être faites sur notre méthodologie, à savoir :

- pour une même souris, l'extraction de l'ADN et de l'ARN sont réalisées sur deux biopsies différentes du même muscle. Mettre en relation nos résultats de qPCR et de RT-qPCR comme nous l'avons fait pour le calcul du RQ/vg revient à estimer que la transduction est homogène à l'intérieur de l'organe et ne dépend pas de la biopsie considérée. Même si cela peut être crédible pour une injection intramusculaire où le vecteur diffuse largement dans tout le muscle injecté, il est peu probable que ce soit le cas suite à une injection systémique, en particulier dans un muscle dystrophique qui présente une structure très hétérogène ;

- la normalisation de nos résultats de RT-qPCR est effectuée à l'aide d'un gène rapporteur endogène. Or, quelque soit le gène considéré, il est possible que les niveaux d'expression mesurés varient plus ou moins d'un animal à l'autre, ou entre souris B6 et mdx4Cv, voire même entre deux biopsies d'un même muscle dystrophique. Il est connu que ce type de normalisation est susceptible d'introduire un biais dans les résultats de RT-qPCR ([Bustin 2000](#), [2002](#)). De plus, la prise en compte de ce gène de référence multiplie par deux le nombre de réactions de qPCR nécessaires à l'obtention des résultats, augmentant le risque de biais expérimental.

En réponse à ces limites expérimentales, nous avons mis au point de nouvelles méthodes pour nos analyses moléculaires :

- extraction des acides nucléiques : nous avons mis au point un protocole permettant l'extraction combinée de l'ADN et de l'ARN à partir du même prélèvement musculaire initial. Ce protocole pourra être appliqué aux souris ayant reçu le vecteur AAV<sub>r</sub>, et permettra de mettre en relation nos résultats de qPCR et de RT-qPCR de manière plus fiable que précédemment. Préalablement à cette double extraction, nous ajouterons à chaque échantillon un ADN ou un ARN exogènes en quantité connue, qui serviront de normalisateurs internes ;

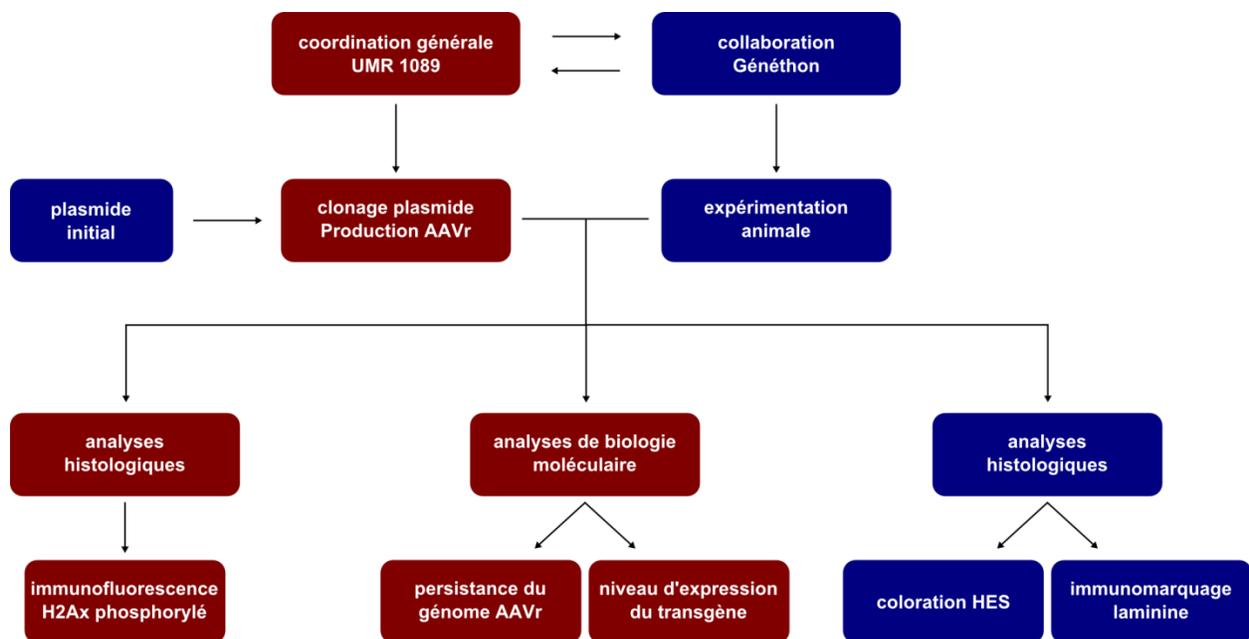
- PCR quantitatives : suite à ces extractions, la persistance et l'efficacité du vecteur AAV<sub>r</sub> seront respectivement mesurées par qPCR et RT-qPCR sur les ADN ou les ARN purifiés. Afin de limiter la variabilité inter-réaction ainsi que le nombre de réactions nécessaires, nous avons mis au point des qPCR en duplex combinant l'amplification de l'ADN ou de l'ARN

transgénique avec celle de leur normalisateur exogène respectif ;

- Mesure de l'activité enzymatique de muSeAP : l'activité phosphatase alcaline de notre transgène sera mesurée de deux façons : par luminométrie, sur le sérum des souris prélevé tout au long du protocole ; par coloration au *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) / 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate (BCIP) sur coupe histologique. Ces deux méthodes sensibles, robustes et reproductibles, ont déjà utilisées à plusieurs reprises pour ce type d'analyse ([Wang 2001](#), [Maelandsmo 2005](#), [Bartoli 2006](#)).

## Répartition des tâches

Comme pour notre précédente étude, nous avons monté une collaboration avec les départements de bioexpérimentation et d'histologie de Généthon. La répartition des tâches de ce projet entre les différents partenaires est schématisée en **Figure 38**.



**Figure 38** : Répartition des tâches de l'étude II entre les différents partenaires de cette collaboration, à savoir l'équipe pharmacologie moléculaire des vecteurs AAVr de l'UMR INSERM 1089 (Nantes, rouge), les départements de bioexpérimentation et d'histologie ainsi que l'équipe de recherche dirigée par Isabelle Richard, localisés à Généthon (Evry, bleu).

## Matériel & méthodes

### Expérimentation animale

L'ensemble de cette étude a fait l'objet d'une demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques auprès du ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche (dossier n° 01340.01) et a été approuvé par le comité d'éthique de Généthon (CEEA n° 64). Dix souris C57BL/6J de statut sanitaire *specific pathogen free* (SPF, Charles River France) et 20 souris mdx4Cv (B6Ros.Cg-Dmd<sup>mdx4Cv</sup>/J, élevage interne), ont été incluses dans la première partie de ce projet. Elles ont été élevées dans des conditions standard au sein de l'animalerie de Généthon (département de bioexpérimentation, Évry, France), entre l'âge de 3 et 7 semaines. Pendant cette période, la moitié des souris mdx4Cv a reçu dans l'eau de boisson du NAC (Sigma-Aldrich, #A7250, St. Louis, Missouri, USA) dissout à 10 g/L et équilibré à pH = 6,5 ~ 7,0 avec du NaOH 2M. À l'âge de 7 semaines, les souris ont été euthanasiées par élongation cervicale après anesthésie fixe (kétamine 100 mg/kg, xylazine 10 mg/kg). Différents muscles ont alors été prélevés (TA, biceps, coeur et diaphragme), inclus en gomme de Tragacanth (Sigma-Aldrich #G1128) et congelés en isopentane refroidi à l'azote liquide. Les prélèvements ont été conservés à -80°C avant analyse. Pour des raisons d'organisation, nous n'avons pas adopté de protocole de répartition aléatoire des souris mdx4Cv. En revanche, chacune des 30 souris a été identifiée par un numéro dès le début du protocole, et transmise sans autres informations aux expérimentateurs en charge des analyses. L'aveugle n'a été levé qu'une fois l'ensemble des expériences réalisées et analysées. Il en sera de même pour les 60 autres souris, dont les prélèvements ont été récupérés durant l'écriture de ce manuscrit.

### Histologie

#### a. Évaluation de l'anisocytose sur coupe transversale de muscle

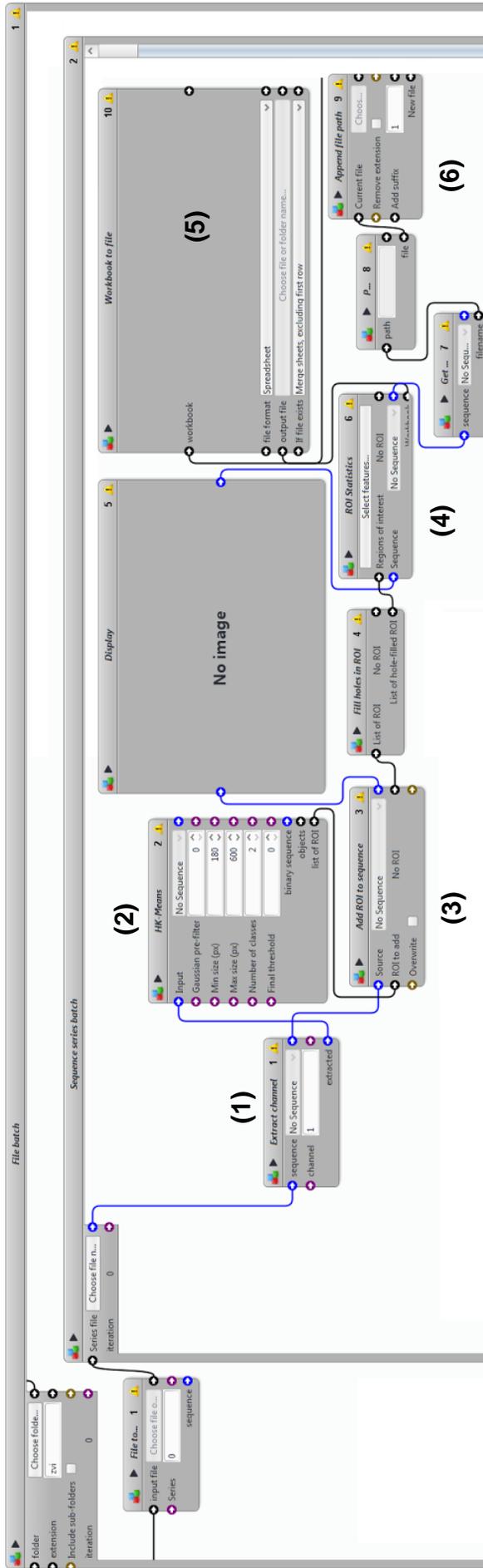
Le protocole utilisé pour mesurer ce paramètre est strictement identique à celui décrit dans les *Supplementary Material and Methods* de notre étude précédente.

#### b. Immunofluorescence anti- $\gamma$ H2Ax

Des sections transversales de muscle de 5  $\mu$ m d'épaisseur ont été effectuées au cryostat,

déposées sur lames et fixées en PBS + Paraformaldéhyde 4 % (Thermo Scientific #28906) pendant 15 min à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min au PBS, les sites non spécifiques sont bloqués par une incubation de 1 h dans du PBS + sérum de chèvre 5 % (Sigma-Aldrich #G9023) + Triton X-100 0,3 % (Sigma-Aldrich #T8787). L'immunomarquage anti- $\gamma$ H2Ax est ensuite réalisé pendant la nuit à 4°C en chambre humide grâce à un anticorps de lapin (Cell Signaling Technology #9718, Danvers, Massachusetts, USA) dilué au 1:50 dans du PBS + 1 % *bovine serum albumin* (BSA, New England Biolabs #B9001S, Ipswich, Massachusetts, USA). Pour chaque lame, un contrôle négatif est également réalisé en incubant une coupe en PBS + 1 % BSA sans anticorps primaire. Après 3 lavages de 5 min au PBS, l'anticorps secondaire (*goat anti-rabbit - Alexa 488*, Life Technologies #A11034, Carlsbad, Californie, USA) dilué au 1:500 dans du PBS + 1 % BSA est déposé sur les coupes et laissé 1 h à température ambiante. Un marquage des noyaux est ensuite réalisé par incubation des coupes avec du DRAQ5 (Biostatus #DR50200, Shepshed, Royaume-Uni) dilué au 1:1000 dans du PBS pendant 15 min à température ambiante. Les lames, montées en ProLong Gold (Life Technologies P36934), sont ensuite laissées à l'obscurité dans une atmosphère sèche et à température ambiante pendant au moins 48 h. Elles sont ensuite observées au microscope à épifluorescence Axio Imager 2 équipé d'un module ApoTome.2 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). La quantification de la fluorescence est effectuée de manière automatisée grâce à un protocole développé spécifiquement sur le logiciel ICY (unité d'analyse d'images biologiques, institut Pasteur, Paris, <http://icy.bioimageanalysis.org/>). Une capture d'écran du protocole utilisé est donné en **Figure 39**. Pour chaque image, une localisation des noyaux est effectuée, puis la fluorescence de l'Alexa 488 est mesurée sur chaque région d'intérêt (chaque noyau).

**Figure 39 (page suivante) :** Schéma du protocole automatisé ayant permis de mesurer le pourcentage de noyaux positifs pour  $\gamma$ H2Ax et l'intensité de fluorescence dans chacun de ces noyaux. La fluorescence rouge (DRAQ5) est extraite de l'image (1), les noyaux sont discriminés sur des critères de taille (2), la région d'intérêt ainsi générée est superposée à la fluorescence verte (Alexa488) (3), la fluorescence verte est mesurée dans chaque noyau (nombre de pixels et intensité) (4), le fichier EXCEL contenant les données est exporté (5) et l'image générée est également exportée (6).



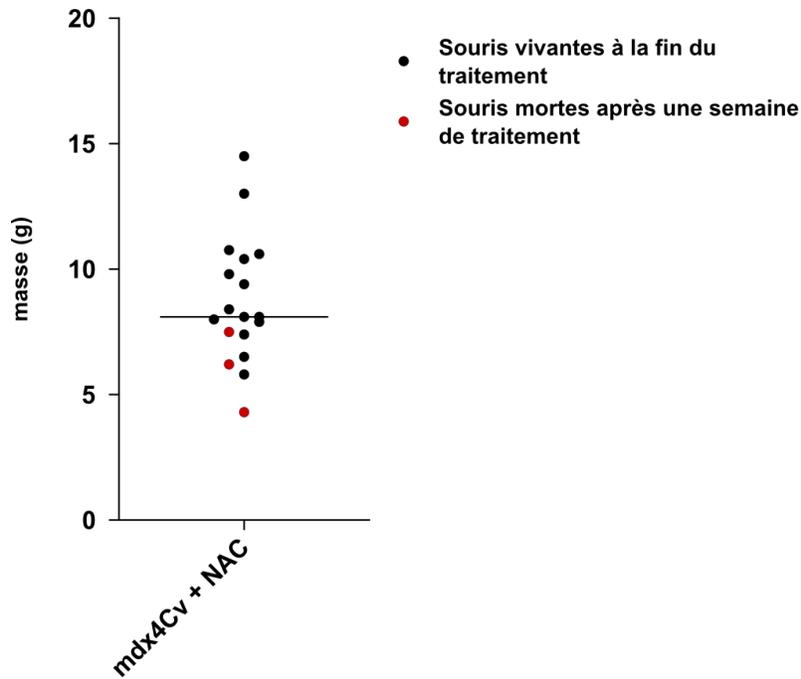
## Résultats préliminaires

### Évolution de la masse des souris pendant la première phase du protocole

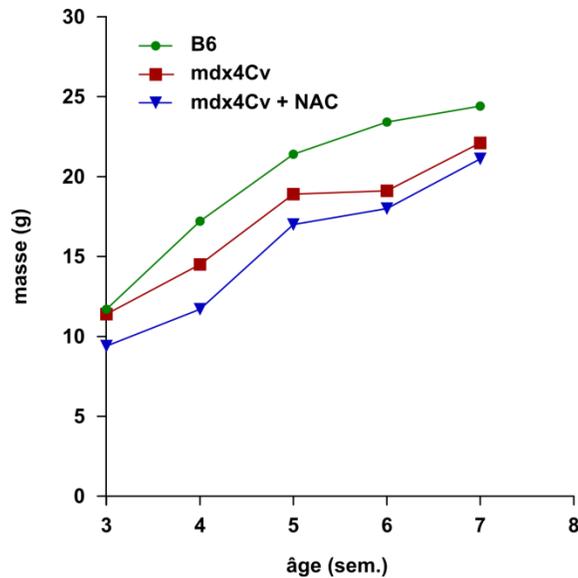
Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet d'un traitement de 4 semaines au NAC sur la condition générale des souris. Sur les dix premières souris mdx4Cv traitées au NAC, nous avons observé un décès, qui a touché la plus légère du lot, moins d'une semaine après le début du traitement. Cette observation s'est confirmée lors de l'inclusion des 20 souris supplémentaires, avec deux décès additionnels dans la même période, chez des souris parmi les plus légères à 3 semaines (**Figure 40**). Ces événements mis à part, aucun effet majeur n'a été observé durant les 4 semaines du protocole de traitement. En témoigne l'évolution de la masse des souris au cours de ces 4 semaines. À 3 semaines d'âge, les souris mdx4Cv débutant le traitement au NAC semblent avoir une masse plus faible que les souris mdx4Cv non traitées, ce qui reflète probablement l'absence de répartition aléatoire des animaux. Néanmoins, la différence entre ces deux groupes diminue avec le temps, suggérant que l'hétérogénéité initiale est peu à peu compensée (au moins en terme de masse). À 7 semaines d'âge, les masses médianes sont les suivantes (N = 10 par groupe, **Figure 41**) :

- **B6 : m = 24,4 g ; étendue : [22,7 g - 25,0 g]**
- **mdx4Cv non traitées : m = 22,1 g ; étendue : [20,8 g - 25,0 g]**
- **mdx4Cv traitées au NAC : m = 21,1 g ; étendue : [18,4 g - 23,3 g]**

Il n'est bien sûr pas possible avec cette analyse d'exclure des effets toxiques du NAC uniquement dirigés contre certains organes ou certaines populations cellulaires. Néanmoins, à la lumière de ces résultats, un mois de traitement au NAC ne semble pas avoir d'effet notable sur l'état général et la croissance des souris mdx4Cv. En revanche, ce composé a manifestement un effet néfaste sur les animaux les plus légers lorsqu'il est débuté à 3 semaines d'âge.



**Figure 40 :** Masse des souris mdx4Cv traitées au NAC au moment du début du traitement. Les 3 animaux retrouvés morts dans leur cage après moins d'une semaine de traitement sont indiqués en rouge. La ligne horizontale indique la masse médiane des souris.



**Figure 41 :** Évolution de la masse médiane des souris pendant les 4 semaines de traitement au NAC. Les 3 groupes de 10 souris ont chacun été séparés en deux sous-groupes, pesés alternativement en semaine paire et impaire. Chaque point représente donc la valeur médiane de N = 5 souris, sauf pour la semaine 7 (N = 10), où chaque souris a été pesée avant l'euthanasie.

## Effet du traitement de 4 semaines au NAC sur l'aspect général des muscles

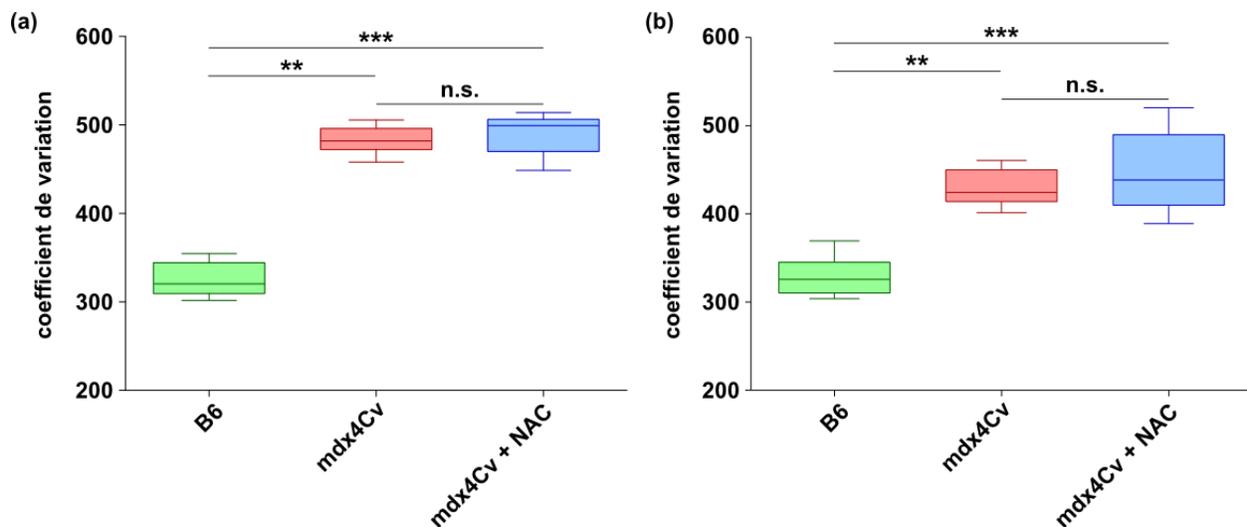
Nous nous sommes ensuite focalisés sur les phénotypes pathologiques des souris mdx4Cv, et en premier lieu l'anisocytose. Ce paramètre représente l'hétérogénéité du diamètre des fibres musculaires, résultant des cycles de nécrose / régénération successifs. Après un immunomarquage anti-laminine sur coupe transversale de TA et biceps, modélisation informatique et mesure automatique du plus petit diamètre de Feret de chaque fibre musculaire, il est possible de calculer un coefficient de variation pour chaque souris, représentatif de l'anisocytose. Un tel calcul lors de notre précédente étude nous avait indiqué qu'entre 5 et 7 semaines d'âge, l'anisocytose des souris mdx4Cv était déjà significativement supérieure à celle de souris B6 contrôles. En appliquant ce protocole aux souris de cette étude, nous avons confirmé cette observation à 7 semaines d'âge, aussi bien dans le TA que dans le biceps. En revanche, le traitement au NAC ne semble pas avoir d'influence sur ce paramètre chez les souris mdx4Cv (**Figure 42**). À 7 semaines, les anisocytoses médianes sont les suivantes :

- **TA B6 : coefficient de variation = 320,3**
- **TA mdx4Cv non traitées : coefficient de variation = 481,9**
- **TA mdx4Cv traitées au NAC : coefficient de variation = 499,2**
  
- **biceps B6 : coefficient de variation = 325,6**
- **biceps mdx4Cv non traitées : coefficient de variation = 424,1**
- **biceps mdx4Cv traitées au NAC : coefficient de variation = 438,3**

Ces résultats suggèrent qu'un mois de traitement au NAC n'est pas suffisant pour contrer l'anisocytose qui se développe dans les muscles squelettiques des souris mdx4Cv.

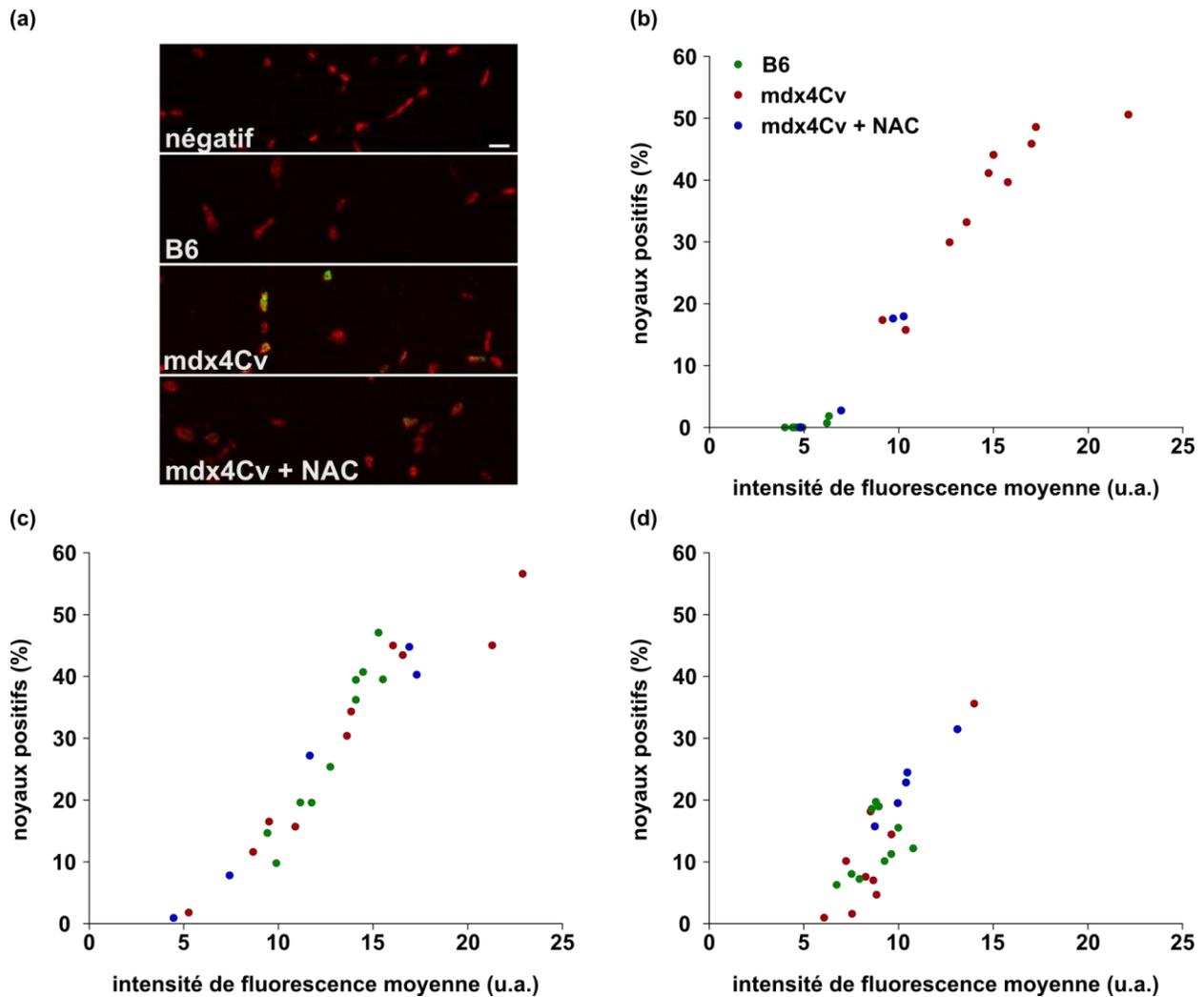
## Effet du traitement de 4 semaines au NAC sur les cassures double brin de l'ADN

Même si après seulement 4 semaines, notre protocole de traitement n'a semble-t-il pas amélioré l'état général du muscle des souris mdx4Cv, il pourrait avoir eu des effets plus localisés et ciblés sur le stress oxydatif. Nous avons donc mesuré l'intensité des cassures double-brin de l'ADN sur coupes histologiques, par un marquage immunofluorescent anti- $\gamma$ H2Ax. Les contrôles



**Figure 42** : Mesure de l'anisocytose (coefficient de variation) par immunomarquage anti-laminine sur coupe transversale de TA (a) ou de biceps (b) après 4 semaines de traitement au NAC. Les données sont représentées par leur médiane (ligne horizontale), leur premier et troisième quartiles (boîte) et leur premier et neuvième déciles (extrémités). Statistiques : test de Kruskal-Wallis puis test de Dunn pour comparaisons multiples (n.s. non significatif ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

négatifs, réalisés pour chaque souris en l'absence d'anticorps primaire, ont révélé un très faible bruit de fond (**Figure 43a**). Nous avons donc déterminé un seuil au-delà duquel un noyau était considéré positif pour le marquage, et permettant d'exclure la quasi-totalité du signal sur les coupes contrôle. Pour chaque échantillon, nous avons ensuite mesuré le pourcentage de noyaux positifs, ainsi que l'intensité de fluorescence moyenne en prenant en compte tous les noyaux (positifs et négatifs). Chaque souris a donc pu être identifiée par deux coordonnées, représentées graphiquement sur un nuage de points pour le TA, le biceps et le coeur (**Figure 43b, c, d**, respectivement). En comparaison avec les contrôles B6, les TA des souris mdx4Cv affichent un important pourcentage de noyaux positifs pour  $\gamma$ H2Ax, et une intensité de fluorescence moyenne supérieure. De manière intéressante, ces valeurs sont inférieures chez les souris traitées au NAC. Ceci suggère qu'au sein de ces muscles, le traitement au NAC semble avoir réduit les cassures double brin de l'ADN, et donc potentiellement le stress oxydatif. Les résultats sont moins nets pour le biceps, où un signal aussi important est observé sur les coupes des muscles B6 et mdx4Cv. Concernant le myocarde enfin, les intensités moyennes et les pourcentages de noyaux positifs sont tous deux moins élevés quelque soit le groupe considéré, ce qui indiquerait que cet organe est globalement moins affecté par le stress oxydatif à cet âge chez les souris mdx4Cv.



**Figure 43 :** Immunofluorescence anti- $\gamma$ H2Ax sur coupe histologique de muscle. (a) Panel représentatif des résultats obtenus pour le TA chez les différents groupes de souris en l'absence (négatif) ou en présence de l'anticorps primaire anti- $\gamma$ H2Ax (vert). Les noyaux sont marqués au DRAQ5 (rouge). La barre horizontale représente 10 $\mu$ m. (b), (c) et (d) Quantification des résultats obtenus pour le TA, le biceps et le coeur, respectivement. Chaque point représente l'intensité moyenne de fluorescence (abscisse, unité arbitraire, u.a.) et le pourcentage de noyaux positifs (ordonnée) obtenus pour une souris appartenant à l'un des 3 groupes. Note : seule la moitié des prélèvements du groupe « mdx4Cv + NAC » a été analysée au moment de l'écriture de ce manuscrit.

## **Conclusions partielles après 4 semaines de traitement au NAC**

- Le traitement au NAC ne semble pas entraîner de retard de croissance ni présenter de toxicité majeure chez les souris mdx4Cv. Les trois décès observés prématurément concernaient des souris parmi les plus légères, suggérant tout de même un effet potentiellement néfaste dans ce cas de figure.
- Le traitement au NAC n'a pas permis d'améliorer la physionomie générale du tissu musculaire telle qu'elle est mesurée par l'anisocytose chez les souris mdx4Cv.
- En revanche, le traitement au NAC a permis de réduire les cassures double brin de l'ADN dans le TA des souris mdx4Cv, ce qui semble indiquer une action bénéfique sur le stress oxydatif généré dans le muscle en l'absence de dystrophine.



## **Discussion**

La thérapie génique de la DMD arrive dans une phase critique de son développement. Les essais cliniques utilisant la technologie AAVr amenés à voir le jour ces prochaines années vont permettre de confirmer ou non le potentiel de ces vecteurs comme futurs médicaments pour cette maladie. Les études précliniques menées chez la souris mdx ou des modèles dérivés sont arrivées à maturité il y a déjà plusieurs années (**Tableau 5**). Par ailleurs, des premiers résultats encourageants ont déjà été obtenus dans le modèle canin GRMD ([Le Guiner 2014](#)) et d'autres sont actuellement en cours d'analyse. Malgré ces avancées, plusieurs interrogations demeurent, concernant notamment l'importance de la dose thérapeutique de vecteur AAVr à administrer, et l'impact à long terme d'une telle injection. Comme de récents résultats nous l'ont rappelé ([Mendell 2010](#), [Chandler 2015](#)), l'immunotoxicité et la génotoxicité restent des facteurs importants à prendre en considération, même si l'on sait maintenant que ces risques sont moindre en comparaison aux vecteurs adénoviraux et rétroviraux, respectivement. De plus, plusieurs travaux ([Moulay 2010](#), [Le Hir 2013](#), **Étude I**) suggèrent aussi que le maintien de l'expression du transgène pendant plusieurs mois devra également être documenté, étudié et si possible optimisé. Ces éléments vont à l'encontre du dogme (établi à l'aide de modèles animaux sains) selon lequel les vecteurs AAVr présentent *in vivo* une innocuité et une efficacité stables pendant plusieurs années. En parallèle, ils soulignent la nécessité d'étudier en détail l'impact du phénotype des cellules cibles sur les différentes étapes de la transduction.

### **Quels sont les facteurs restreignant la transduction de l'AAVr en l'absence de dystrophine ?**

L'une des observations principales de notre **Étude I** concerne les niveaux de fluorescence émis par la protéine transgénique GFP dans les muscles mdx4Cv. Deux mois suivant l'injection du vecteur, ceux-ci sont en effet inférieurs d'un facteur 16 par rapport à ceux mesurés dans un muscle contrôle B6. Pour expliquer cette plus faible efficacité obtenue à partir d'une dose initiale similaire, nous avons apporté plusieurs éléments de réponse :

## Une diminution de la persistance des génomes de vecteur

Comme l'ont souligné plusieurs publications, l'un des facteurs responsable de cette faible efficacité est probablement la perte progressive des génomes de vecteurs, que nous avons également mesurée dans notre étude. À deux mois après injection, les ratios vg/dg sont en effet approximativement 8 fois inférieurs dans les muscles mdx4Cv. Cette observation semble être généralisable à plusieurs modèles murins de dystrophie musculaire et à différents vecteurs AAVr (thérapeutiques ou non). C'est le cas de souris mdx ou mdx/*utr*<sup>-/-</sup> ayant reçu un vecteur AAVr2/1 U7ex23 permettant un saut d'exon ([Le Hir 2013](#)), mais également de souris déficientes en sarcoglycane- $\alpha$  ([Pacak 2008](#)).

Concernant les causes exactes de cette perte progressive de vg, la nécrose des fibres musculaires transduites joue certainement un rôle majeur. Même s'il demeure compliqué de prouver formellement son implication, une étude utilisant un vecteur AAVr muSeAP peut nous apporter un élément de réponse ([Bartoli 2006](#)). Après co-injection de ce vecteur avec un AAVr thérapeutique, les auteurs ont observé sur coupe histologique que l'expression de muSeAP était maintenue uniquement dans les cellules exprimant la protéine thérapeutique, et étant imperméable au bleu d'Evans (pénétrant dans les fibres en nécrose). Ceci suggère que la correction du phénotype nécrotique est une condition nécessaire au maintien des vg dans ces cellules.

Toutefois, rien ne dit que d'autres facteurs ne soient pas en partie impliqués dans l'élimination des génomes de vecteur. Notamment, l'environnement extra-cellulaire au contact duquel arrivent les particules de vecteur injectées pourrait s'avérer particulièrement défavorable à leur endocytose. Après injection IM d'un vecteur AAVr2/2, une équipe a montré que l'internalisation des particules était précédée d'une diffusion endomysiale pendant plusieurs heures ([Xiao 2012](#)). Même si chez nos souris mdx4Cv âgées de 2 à 4 mois la fibrose est limitée, un remodelage endomysial entraînant le piégeage d'une fraction des particules à l'extérieur des cellules reste envisageable. Un autre élément allant potentiellement dans le sens de cette hypothèse vient de l'observation que la transduction des vecteurs AAVr est moins efficace dans des tissus musculaires mdx adultes que jeunes ([Liu 2005](#)). La fibrose étant l'un des phénotypes s'aggravant avec l'âge dans les muscles dystrophiques (même si cette augmentation est très modérée dans le modèle murin, [Lefaucheur 1995](#), [Pastoret 1995](#)), il est possible que la densité de l'endomysium freine la diffusion des particules jusqu'aux cellules musculaires cibles.

L'interstitium musculaire des souris déficientes en dystrophine est également colonisé par des populations de cellules immunitaires, notamment des macrophages et des lymphocytes T, qui participent à la progression des cycles de nécrose et régénération ([Spencer 2001](#), [Villalta 2009](#) et **Introduction partie 2.4.4**). Nous avons confirmé par immunofluorescence la présence de ces cellules, particulièrement des macrophages, dans les muscles de nos souris mdx4Cv (expérience non publiée réalisée par Thibaut Larcher, INRA UMR703 ONIRIS). Il est possible que dans ce contexte immunologique particulier, les cellules immunitaires infiltrées participent d'une manière ou d'une autre à l'élimination des particules de vecteur avant leur internalisation.

Par ailleurs, il est également envisageable que des facteurs de restriction intracellulaires puissent jouer un rôle dans l'élimination des particules de vecteurs AAVr spécifiquement dans les muscles mdx4Cv. Le rétrotrafic de l'AAVr depuis la membrane plasmique jusqu'au noyau, à travers le système endomembranaire, a majoritairement été décrit *in vitro*, ou dans le meilleur des cas, dans des tissus sains (**Introduction partie 3.2.3.1**). Sa dépendance vis à vis des microtubules et le passage obligatoire par l'appareil de Golgi sont deux événements bien caractérisés ([Xiao 2012](#), [Nonnenmacher 2015](#)), même si le détail des voies empruntées fait encore débat ([Douar 2001](#), [Ding 2006](#)). Or le cytoplasme des muscles mdx est lui aussi connu pour subir de profonds remaniements, avec une densification du réseau de microtubules, et une délocalisation du Golgi ([Percival 2007](#), [Khairallah 2012](#)). Ces deux facteurs combinés sont tout à fait à même d'avoir un impact négatif sur le trafic des particules de vecteur dans les muscles mdx4Cv, voire d'entraîner leur reroutage vers des compartiments abortifs (endosomes tardif, lysosomes) où elles pourraient être éliminées.

Une fois l'import nucléaire réalisé et la décapsidation effectuée, les génomes d'AAVr passent d'une forme « simple brin » à une forme « double brin ». Cette étape peut s'effectuer selon deux modalités : par appariement entre génomes de polarité inverse, ou par synthèse d'ADN à partir de l'ITR 3' ([Hauck 2004](#), [Nash 2007](#)). Nous avons mentionné dans l'Introduction (**partie 3.2.3.2**) que cette dernière étape était dépendante de l'état de phosphorylation de FKBP52, lui-même contrôlé par EGFR-PTK et TC-PTP (**Figure 19**). Or, des travaux menés sur des cellules musculaires lisses vasculaires ont montré que l'influx d'ions  $Ca^{2+}$  par des canaux indépendants du voltage entraînait l'activation de la kinase EGFR-PTK *via* l'endothéline 1 ([Kawanabe 2002](#)). Même si ce modèle expérimental est assez éloigné de celui dans lequel nous travaillons, il est également possible d'observer des influx calciques anormalement élevés dans

les fibres musculaires déficientes en dystrophine ([Vandebrouck 2002](#)). Nous pouvons donc imaginer que ces influx suractivent EGFR-PTK, menant à l'inhibition de la synthèse du second brin et diminuant le nombre de copies de vg détectables par qPCR. Pour tester cette hypothèse, il suffirait d'injecter des souris mdx4Cv avec un vecteur *self-complementary* (sc) AAV n'étant pas limité par cette étape, et de comparer les résultats avec un vecteur *single-stranded* (ss) AAV similaire à celui que nous avons utilisé.

L'ensemble de ces facteurs peut conduire à des situations différentes dans les muscles mdx4Cv, non mutuellement exclusives mais n'ayant pas le même impact sur nos résultats : soit les particules n'arrivant pas jusqu'au noyau sont détruites, ce qui entraîne la diminution du vg/dg que nous avons mesurée ; soit ces mêmes particules sont piégées à l'extérieur ou à l'intérieur des fibres musculaires, au sein des tissus fibreux voire des populations de cellules interstitielles, ou dans un compartiment cytoplasmique particulier. Dans ce deuxième cas de figure, les génomes de ces particules seraient tout de même détectés par qPCR. En revanche, ne participant pas à l'expression du transgène, ils contribueraient à faire diminuer le RQ/vg.

### **Absence d'une inhibition globale au niveau transcriptionnel**

Nos résultats de RT-qPCR nous ont montré que les niveaux relatifs d'ARN messenger *gfp* mesurés 2 mois après l'injection du vecteur étaient significativement inférieurs dans le TA des souris mdx4Cv. Comme pour les niveaux de fluorescence de la GFP, le facteur de diminution est environ égal à 16 par rapport aux souris B6. Tout en plaidant contre une inhibition post-traductionnelle, ce résultat indique que le métabolisme de l'ARNm *gfp* est altéré que ce soit au niveau anabolique (transcriptionnel) ou catabolique (post-transcriptionnel). Compte tenu de la variabilité observée quant au nombre de copies de vg/dg entre les muscles mdx4Cv et B6, nous avons jugé utile de normaliser nos résultats de RT-qPCR par ce paramètre.

Dans un premier temps, nous avons cherché à comparer l'activité transcriptionnelle du promoteur RSV entre les muscles B6 et mdx4Cv. Le promoteur RSV a déjà été utilisé à plusieurs reprises dans le domaine du transfert de gène *in vivo*, et est même utilisé en clinique en Chine dans l'adénovirus recombinant anti-tumoral Gendicine<sup>®</sup> (rAd RSV p53, [Peng 2005](#)). Il présente une forte activité dans les fibres musculaires squelettiques et les cardiomyocytes ([Davis 1993](#),

[Maass 2003](#), [Chen 2008](#)), y compris dans le TA de souris mdx ([Yue 2002](#)). Même si la régulation précise de son activité transcriptionnelle n'a jamais été totalement décrite, des travaux ont tout de même montré qu'elle dépendait de la liaison de deux facteurs de transcription multifonctionnels : YY1 et TFII-I ([Mobley 1998](#), [2000](#)). YY1 est connu pour être un inhibiteur épigénétique de la myogenèse, agissant notamment sur le promoteur du gène *DMD* ([Galvagni 1998](#)). De manière intéressante, une surexpression de YY1 a été observée dans le TA de souris mdx ([Lu 2012](#)) et plus récemment dans des myoblastes isolés de patients DMD ([Zanotti 2015](#)). À première vue, ceci suggère que le promoteur RSV pourrait être suractivé dans les muscles de nos souris mdx4Cv. Cependant, d'autres facteurs inhibiteurs encore non caractérisés pourraient tout à fait jouer un rôle antagoniste et conduire finalement à une moindre activité transcriptionnelle.

Comme nous l'avons vu dans la **partie 4.1**, une différence d'activité transcriptionnelle se reflètera probablement sur les marques épigénétiques associées avec le promoteur et le transgène. Nous avons donc entrepris une analyse épigénétique des génomes de vecteurs extraits des muscles injectés, qui nous a apporté plusieurs indications.

Nous avons d'abord mesuré le taux de méthylation du promoteur RSV dans les muscles B6 et mdx4Cv. Ce promoteur a déjà été décrit pour son état méthylé, que ce soit après transfection transitoire de macrophages par un plasmide d'expression ([Escher 2005](#)) ou dans le domaine de la transgénèse aviaire ([Park 2010](#)). Ceci démontre que, intrinsèquement, le promoteur RSV peut être inhibé par ce type de régulation. Lorsqu'il est inclus dans un vecteur AAVr en revanche, notre équipe n'a pas observé de méthylation notable, que ce soit dans le muscle ou le foie de primate non humain ([Léger 2011](#)).

De la même manière, nous n'avons pas détecté de taux de méthylation notables (globalement inférieurs à 5 %), ni dans les muscles sains, ni dans ceux déficients en dystrophine. L'utilisation du séquençage à haut débit MiSeq nous a néanmoins permis de mettre en évidence des pourcentages de méthylation très légèrement supérieurs dans les muscles des souris mdx4Cv, 2 mois après injection du vecteur (de 0,09 à 1,65 % de différence). Cette augmentation affecte l'ensemble des génomes de vecteur de manière homogène, sans entraîner de méthylation complète d'un faible nombre d'entre eux. Même si ces différences sont parfois significatives, il peut paraître difficile à envisager à première vue qu'une méthylation si peu abondante ait un réel impact sur l'expression globale du transgène. En revanche, chez les souris mdx4Cv comme chez

les B6, nous avons noté une légère augmentation de la méthylation sur chaque position CpG entre 15 et 60 jours après injection. Il pourrait donc être intéressant d'étendre la période d'étude afin de voir si la différence se creuse entre les muscles B6 et mdx4Cv à plus long terme.

Dans le domaine de la thérapie génique non virale utilisant un plasmide porteur du promoteur RSV, plusieurs publications successives ont noté une inhibition épigénétique de l'expression du transgène plusieurs semaines après injection chez la souris ([Chen 2004](#)). En accord avec nos résultats, cette extinction transcriptionnelle semble se faire en l'absence de méthylation du promoteur, mais dépendre davantage de l'architecture chromatinienne des épisomes formés *in situ*, et de modifications d'histone répressives ([Riu 2007](#), [Chen 2008](#)). Nous nous sommes intéressés à l'une de ces modifications, mesurée à des niveaux importants sur le promoteur et la séquence codante des vecteurs non viraux lorsque ceux-ci sont inhibés : H3K9me3 ([Riu 2007](#), [Gracey Maniar 2013](#)). Même si cette modification épigénétique est aussi retrouvée dans certains cas au niveau de la séquence codante des gènes transcrits ([Vakoc 2005](#)), elle est majoritairement décrite pour son rôle majeur dans la formation d'hétérochromatine, en association avec la méthylation de l'ADN (**Introduction partie 4.1.2**, [Hiragami-Hamada 2009](#)). De plus, sa présence au niveau du promoteur RSV a été corrélée avec une nette inhibition transcriptionnelle ([Gracey Maniar 2013](#)).

Indépendamment du contexte musculaire (B6 ou mdx4Cv), nous avons mesuré par ChIP/qPCR de forts niveaux de H3K9me3 aussi bien sur le promoteur RSV qu'au sein de la séquence codante GFP de notre vecteur. Plus précisément, ces niveaux sont environ 10 fois supérieurs à ceux associés avec une région génomique murine endogène réprimée de manière constitutive (*Satellite 5*). Le même type de résultats avaient été précédemment observés dans l'équipe avec des vecteurs AAVr2/8 exprimant la GFP sous le contrôle des promoteurs CMV ou phosphoglycérate kinase (Magalie Penaud-Budloo et Adrien Léger, données non publiées). Ceci suggère que les vecteurs AAVr de manière générale seraient particulièrement ciblés par H3K9me3 *in vivo*. La fonction de cette marque reste néanmoins énigmatique. Sa présence au sein de l'hétérochromatine constitutive formée au niveau des régions péricentromériques ou des rétrovirus endogènes est généralement associée à une méthylation de l'ADN ([Liu 2014](#), [Rose 2014](#)). Néanmoins, ces deux marques ne sont pas nécessairement dépendantes l'une de l'autre, et il arrive que la chromatine ne porte que l'une d'entre elles. Au niveau des séquences codantes,

elles pourraient même être mutuellement exclusives, la répression transcriptionnelle se faisant soit par méthylation de l'ADN (gènes riches en CpG), soit par H3K9me3 (gènes pauvres en CpG) ([Hahn 2011](#)). Puisque nos techniques expérimentales (conversion au bisulfite/MiSeq et ChIP/qPCR) ont été réalisées séparément et affichent probablement des sensibilités différentes, il nous est impossible de dire si les génomes d'AAVr positifs pour H3K9me3 sont également méthylés au niveau des CpG du promoteur, ou si ces deux marques sont portées par des populations de génomes différentes. Au vu des données bibliographiques disponibles à ce jour, ces deux situations sont envisageables. En revanche, les conséquences de la présence de H3K9me3 à ce niveau sur notre vecteur, aussi bien dans les muscles mdx4Cv que B6, restent inconnues.

À la lecture de certaines publications s'intéressant aux régulations épigénétiques qui accompagnent la réponse aux dommages à l'ADN, il est néanmoins possible d'émettre certaines hypothèses. Lors d'une cassure double-brin dans l'ADN, deux événements se produisent de manière concomitante : le recrutement du complexe protéique MRN, et la tri-méthylation de H3K9 pouvant se propager sur plusieurs kb à partir de la cassure ([Ayrapetov 2014](#)). Ces deux phénomènes permettent respectivement la liaison et l'activation de l'acétyltransférase *TAT-interactive protein 60 kD* (Tip60), qui active en retour la kinase ATM ([Sun 2005](#), [2009](#)). Finalement, cette dernière phosphoryle un nombre important de régulateurs protéiques participant à la régulation du cycle cellulaire (p53, Chk2, *etc*) et à la réparation de l'ADN (Nbs1, H2Ax, *etc*). Or, la structure particulière du génome de l'AAVr est, dans une certaine mesure, perçue par la cellule hôte comme un dommage à l'ADN et est capable d'interagir avec plusieurs protéines parmi lesquelles ATM ou le complexe MRN ([Schwartz 2007](#), [Cervelli 2008](#), [Cataldi 2010](#)). Dans les deux cas, ces interactions entraînent l'inhibition de la transduction ([Cataldi 2013](#), [Lentz 2015](#)). Même si cela n'a jamais été prouvé formellement, il est probable que cette inhibition de la transduction se produise au niveau épigénétique. Toutefois, compte tenu des niveaux de H3K9me3 comparables entre les muscles B6 et mdx4Cv, cette inhibition ne semble pas être plus prononcée en l'absence de dystrophine.

En résumé, les génomes de vecteur extraits des muscles injectés dans notre étude possèdent de forts niveaux de H3K9me3 mais de faibles pourcentages de méthylation chez les souris B6 comme mdx4Cv, avec un promoteur RSV très légèrement sur-méthylé en l'absence de

dystrophine. Afin de mesurer l'impact véritable de ces résultats sur la transcription du génome AAVr, nous avons mesuré le niveau relatif d'ARN *gfp* pré-messager, c'est à dire ne subissant pas les régulations post-transcriptionnelles cytoplasmiques. Dans notre étude, ce paramètre était probablement celui reflétant le plus fidèlement l'activité transcriptionnelle du promoteur RSV. Après normalisation par vg/dg pour chaque souris, nous avons noté que cette activité était comparable dans les muscles B6 et mdx4Cv.

En conclusion de cette partie, il semble donc possible que des événements moléculaires interfèrent de manière positive ou négative avec la prise en charge nucléaire des génomes AAVr dans les muscles déficients en dystrophine. Toutefois, leurs influences, si elles existent, paraissent se neutraliser et aboutissent *in fine* à des niveaux d'expression de l'ARN pré-messager *gfp* similaires entre les muscles des souris B6 et mdx4Cv.

### Conséquences des dommages à l'ADN sur la biosécurité des vecteurs AAVr

De manière intéressante, nous avons mesuré une surexpression d'un grand nombre de gènes participant à la réponse aux dommages à l'ADN dans les muscles mdx4Cv, notamment *Atm* ou les trois gènes du complexe MRN : *Mre11*, *Rad50*, *Nbs1* (**Étude I, données supplémentaires**). Ceci peut par ailleurs être mis en relation avec le signal fluorescent anti- $\gamma$ H2Ax plus élevé que nous avons observé sur des coupes de TA mdx4Cv (**Étude II**), suggérant que les dommages à l'ADN et la réponse à ces dommages sont globalement plus importants dans ce contexte.

Cette augmentation des cassures double-brin dans les muscles déficients en dystrophine pourrait faire craindre une intégration non négligeable des génomes de vecteurs dans l'ADN cellulaire hôte. En effet, il a été décrit depuis longtemps que la transduction des vecteurs AAVr est augmentée en présence d'agents endommageant l'ADN ([Alexander 1994](#), [Russell 1995](#)), et que ces agents entraînent une intégration des vg au niveau des cassures double-brin générées ([Miller 2004](#)). Dans certaines études précliniques chez des souris modèles de maladies métaboliques, l'intégration préférentielle des vg à proximité du locus *Rian* ont été liées de manière convaincante avec le développement de carcinomes hépato-cellulaires ([Donsante 2007](#), [Chandler 2015](#)). Même si ce lien causal a été vivement contesté ([Li 2011](#), [Valdmanis 2012](#)), il

semble clair à l'heure actuelle que certains protocoles sont à même de révéler le potentiel génotoxique des vecteurs AAVr. Dans les muscles déficients en dystrophine où le stress oxydatif exacerbe les dommages à l'ADN, il est donc possible que l'intégration des vg soit favorisée.

## Réduction des niveaux d'ARNm *gfp* et oxydation de l'ARN

Suite à ces résultats, nous nous sommes focalisés sur les événements post-transcriptionnels potentiellement dérégulés dans les muscles mdx4Cv.

Notre **Étude I** ne nous a pas permis d'exclure complètement que l'épissage de l'ARN pré-messager *gfp* ou son export cytoplasmique soient perturbés en l'absence de dystrophine. La comparaison des transcriptomes d'un muscle sain et d'un patient DMD a mis en évidence qu'une protéine impliquée dans la régulation des patrons d'épissages alternatifs était sur-exprimée dans les muscles DMD, pouvant aboutir à des épissages aberrants chez ces patients (*CUG-binding protein 2*, CUGBP2, [Bakay 2002](#), [Sironi 2003](#)). Dans notre cas, de telles dérégulations nous ont semblé peu probables au vu de nos résultats de RT-PCR et de RT-qPCR qui n'ont pas montré d'accumulation particulière d'ARN pré-messager *gfp* dans les muscles mdx4Cv.

Nous nous sommes plutôt focalisés sur les modifications de l'ARNm *gfp* susceptibles d'accélérer sa dégradation dans le cytoplasme, par les mécanismes mentionnés dans l'introduction (**partie 4.2.2.3**). Il nous a paru particulièrement pertinent d'analyser l'influence du stress oxydatif, celui-ci étant connu pour provoquer des dommages sur la majorité des biomolécules en l'absence de dystrophine (**Introduction partie 2.4.3**). En effet, en plus de l'oxydation des protéines (principalement par carbonylation) et la peroxydation des lipides, nous avons montré que l'ADN était endommagé chez les souris mdx4Cv (**Étude II, Figure 43**), confirmant ainsi une étude précédente ([Schmidt 2011](#)). Dans ce contexte tissulaire particulier, l'une des causes les plus probables des cassures double brin observées est le stress oxydatif, comme pourraient en témoigner les niveaux élevés de 8-OHdG mesurés dans les urines des patients DMD. En revanche, l'oxydation de l'ARN n'a, à notre connaissance, jamais été analysée dans les muscles déficients en dystrophine.

Ce phénomène a pourtant déjà été corrélié avec la physiopathologie de certaines maladies

neurodégénératives (**partie 4.2.2.2**). Concernant le système musculaire, l'oxydation de l'ARN a été décrite dans le cas d'une forme particulière de myopathie à corps d'inclusion ([Tateyama 2003](#)) et lors du vieillissement ou d'une atrophie ([Hofer 2008](#)). Cette dernière étude est particulièrement intéressante, car elle démontre que contrairement à l'ARN, l'ADN n'est pas affecté par ces dommages oxydatifs. Des résultats antérieurs obtenus *in vitro* à partir de cellules A549 en culture avaient également démontré une plus grande sensibilité de l'ARN vis à vis du peroxyde d'hydrogène ([Hofer 2005](#)).

Même si nous n'avons pas effectué d'étude comparative dédiée, nos résultats préliminaires ainsi que ceux d'autres études suggèrent que dans le cas de la DMD, le stress oxydatif chronique s'exerçant sur les cellules musculaires pourrait affecter aussi bien l'ADN que l'ARN ([Rodriguez 2003](#), [Schmidt 2011](#), **Étude I**, **Étude II**). En revanche, alors que les niveaux de 8-OHdG mesurés dans les urines de patients DMD (d'âge moyen de 10 à 11 ans) sont particulièrement élevés, nous n'avons pas détecté d'augmentation globale du taux de 8-OHG dans des prélèvements d'ARN musculaire de souris mdx4Cv âgées d'environ 4 mois. Nous avons donc mis au point un protocole de RIP grâce auquel nous avons mis en évidence une oxydation ciblant spécifiquement certaines populations d'ARNm, parmi lesquelles celle de l'ARNm de notre transgène *gfp*. Nos résultats rejoignent les études citées précédemment dans le cadre de la maladie d'Alzheimer ([Shan 2003](#), [2006](#)), ou de la sclérose latérale amyotrophique (SLA, [Chang 2008](#)). L'oxydation de l'ARN n'est donc pas un phénomène aléatoire et général, mais semble affecter seulement certaines sous-populations définies. L'origine de cette spécificité reste à déterminer, mais plusieurs hypothèses peuvent toutefois être émises pour tenter de l'expliquer :

- des pourcentages de guanines différents : puisque nous avons mesuré une modification affectant les nucléotides G de l'ARN, il semblerait logique que plus l'ARNm en possède, plus la probabilité de subir un dommage oxydatif soit élevée. Nous avons réfuté cette hypothèse en mesurant ces pourcentages pour les ARNm murins : *hprt* (sur-oxydation dans les muscles mdx4Cv : 23% de G) ; *gapdh* (sur-oxydation : 25%) ; *gfp* (sur-oxydation : 27%) ; *Mb* (oxydation similaire entre B6 et mdx4Cv : 28% de G). Ce paramètre ne semble donc pas jouer de rôle majeur ;

- des niveaux d'expression différents : nos résultats obtenus chez le chien GRMD ont établi une corrélation inverse entre le niveau d'expression et le taux d'oxydation de l'ARNm transgénique. Il est donc possible d'imaginer que les ARNm présents en quantité importante dans le cytoplasme soient, en proportion relative, moins affectés par le stress oxydatif. Cela revient à supposer que le taux de production absolu des ROS est constant et limitant, et qu'une fois la réaction d'oxydation de l'ARNm à l'équilibre, la production de cet ARNm en excès n'entraînera pas d'oxydation supplémentaire. Même s'il semble virtuellement impossible de tester cette hypothèse in vivo, l'un de nos résultats va clairement à son encontre. Le promoteur du gène Mb et le promoteur RSV possèdent en effet des activités comparables dans les cellules musculaires (CT médian pour l'IP :  $gfp = 24,74 / Mb = 24,9$ ). À niveau d'expression comparable, l'ARNm *gfp* est pourtant sur-oxydé dans les muscles mdx4Cv, contrairement à l'ARNm *Mb* ;

- des structures d'ordre supérieur différentes, ou des partenaires protéiques différents : parmi les hypothèses envisageables, nous pouvons également penser à une protection spécifique de certains ARNm, par l'adoption de structures secondaires ou par association avec des protéines RBP spécifiques. De nombreuses inconnues subsistent dans ces deux domaines d'étude. Notamment, la protéine CUGBP2, dont le gène est surexprimé dans les muscles DMD, régule non seulement l'épissage alternatif de l'ARN mais également son édition ([Anant 2001](#)) et sa traduction ([Mukhopadhyay 2003](#)). Les conséquences de cette surexpression sur le métabolisme des différentes populations d'ARN mériteraient d'être explorées ;

- des localisations cytoplasmiques différentes : enfin, il est probable qu'une fois exportés dans le cytoplasme, et en fonction de leur différents partenaires protéiques, les ARN soient transportés vers des compartiments sub-cellulaires spécifiques. Ces différents compartiments sont sans doute soumis à des stress oxydatifs d'intensité variable. En l'absence de dystrophine, le stress oxydatif est élevé principalement au niveau du sarcolemme ou des tubules transverses (où l'on trouve l'enzyme NOX2), ou encore à proximité des mitochondries (à cause de la dérégulation du MPTP). Si des transcrits sont transportés dans ces compartiments, il est probable que leur oxydation soit favorisée.

Quelle que soit la raison véritable de cette spécificité, nos résultats en % IP obtenus par RIP permettent de préciser le pourcentage de molécules d'ARNm *gfp* possédant au minimum 1 résidu 8-OHG leur permettant d'être immunoprécipitées. Par cette technique, nous ne sommes en revanche pas en mesure de déterminer précisément le taux d'oxydation de ces ARNm (quel est le pourcentage moyen de guanines oxydées par molécule d'ARN ?). De plus, nous ne savons pas à quel endroit de l'ARN (UTR 5', séquence codante, UTR 3') se trouvent ces dommages oxydatifs. Pour ce faire, notre immunoprécipitation aurait pu être complétée par un séquençage à haut débit de type RNA-Seq (RIP-Seq, [Zhao 2010](#)).

*In fine*, l'ensemble de ces facteurs de restriction aboutissent à des niveaux de protéine transgénique 16 fois inférieurs dans les muscles mdx4Cv. Dans notre étude nous ne pensons pas qu'une inhibition supplémentaire se produise au niveau post-traductionnel, compte tenu du fait que les niveaux relatifs d'ARNm *gfp* sont également 16 fois inférieurs chez les souris mdx4Cv. Il aurait toutefois été intéressant de mesurer l'oxydation des protéines transgéniques GFP extraites des muscles injectés, et d'étudier son impact sur la fluorescence de la protéine. Mais en plus de requérir des méthodes expérimentales pointues et que nous ne possédions pas au laboratoire, ces analyses auraient probablement nécessité une quantité importante de matériel biologique initial, que nous n'avions pas immédiatement à disposition.

Un facteur additionnel pouvant diminuer le niveau de fluorescence GFP dans les muscles déficients en dystrophine pourrait être une réponse immunitaire dirigée contre les cellules exprimant à leur surface des peptides dérivés de la capsid du vecteur ou de la protéine transgénique. À ce titre, nous avons toutefois mentionné précédemment que la GFP présentait un faible potentiel immunogène dans un fond génétique C57BL6/J ([Skelton 2001](#), [Mays 2009](#)). De plus, les vecteurs AAVr2/8 semblent peu efficaces à transduire les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles (cellules dendritiques, monocytes ou macrophages, [Mays 2014](#), [Gernoux 2015](#)). Enfin, ces vecteurs ne conduisent pas à la sur-expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) dans les CPA facultatives que sont les cellules musculaires ([Mays 2014](#)). Il paraît donc peu probable que dans un muscle B6, un vecteur AAVr2/8 exprimant la GFP conduise à l'induction d'une réponse immunitaire. Mais en raison du contexte immunologique particulier des muscles déficients en dystrophine, une réponse T CD8

cytotoxique dirigée contre les cellules transduites reste néanmoins envisageable. Toutefois, dans l'éventualité d'une telle réponse, la destruction des cellules transduites entraînerait conjointement une destruction des molécules d'ARNm *gfp* et des copies de génomes de vecteur présentes dans ces cellules. Même si elle existe, cette réponse immunitaire anti-GFP dans les muscles mdx4Cv a donc eu un impact sur l'ensemble des paramètres que nous avons mesurés.

Pour conclure cette première partie, il est nécessaire de nous poser la question de la pertinence de notre modèle d'étude. En effet, jusqu'ici, elle n'a été réalisé que dans un modèle murin de la DMD, qui comme nous l'avons déjà mentionné à plusieurs reprises, n'est pas celui qui reproduit le plus fidèlement l'atteinte observée chez l'Homme. Toutefois, cette atteinte étant bien moins sévère chez la Souris (à l'âge auquel nous l'avons étudiée), il est probable que les effets de la pathologie sur la transduction de l'AAVr soient encore plus marqués chez les patients DMD. De plus, à l'heure où nous avons débuté ce projet, l'alternative la plus cliniquement pertinente aurait été le modèle canin GRMD. Or ce modèle est peut-être moins adapté qu'un modèle murin pour la mesure de certains paramètres, notamment le nombre de copies de génomes de vecteur. En effet, cette expérience aurait nécessité soit d'injecter des chiens sains avec notre vecteur AAVr (expérience réalisable mais coûteuse), soit d'étudier la persistance des vecteurs au cours du temps chez les chiens GRMD. Compte tenu de la variabilité importante de la transduction inter-animal, inter-muscle et même intra-muscle, nous aurions probablement obtenu des résultats peu reproductibles et inexploitable d'un point de vue statistique. Malgré cela, une fois notre facteur de restriction identifié, nous avons pu tester sa pertinence dans un modèle canin GRMD, grâce à des prélèvements musculaires de chiens ayant reçu un vecteur thérapeutique. Chez ces animaux et avec un transgène codant pour une micro-dystrophine, nous avons mesuré une oxydation de l'ARNm transgénique d'une ampleur similaire à celle observée chez les souris mdx4Cv. En revanche, seuls les échantillons exprimant le transgène à faible niveau étaient concernés par ce phénomène.

## **Existe-t-il une valeur thérapeutique seuil à franchir pour permettre une persistance à long terme des vecteurs AAVr dans les muscles déficients en dystrophine ?**

Comme le suggèrent nos résultats obtenus chez le chien GRMD (**Étude I**), une limite hypothétique d'expression du transgène semble exister, au-delà de laquelle l'oxydation de l'ARNm transgénique est neutralisée par l'expression de la protéine thérapeutique. Ceci plaide en faveur de la théorie selon laquelle la persistance à long terme de l'effet thérapeutique nécessite que le transgène s'exprime à un niveau suffisamment élevé et suffisamment rapidement. L'étude menée récemment dans notre laboratoire avec un vecteur permettant un saut d'exon du messenger *Dmd* chez le chien GRMD a permis de confirmer que l'amélioration phénotypique observée dépendait de la dose initiale de vecteur injectée, et était atteinte pour des doses d'environ  $1,0$  à  $5,0E+13$  vg/kg ([Le Guiner 2014](#)). Dans cette étude, l'analyse des prélèvements musculaires à 3,5 mois après injection du vecteur indique que ces doses permettent d'obtenir une expression de la protéine transgénique dans 30 à 40% des fibres musculaires, ce qui se traduit par un bénéfice structural et fonctionnel. En revanche, le suivi à long terme des animaux injectés n'a pas été documenté. Dans ce cadre, et avec une dose initiale comparable ( $1,4E+13$  vg/kg), une étude antérieure avait suggéré que plusieurs années après injection, une perte des génomes de vecteur thérapeutique se produisait également ([Vulin 2012](#)). Toutefois, ces observations ayant été faites à partir de biopsies successives et chez un seul animal, les résultats obtenus restent à confirmer chez le chien GRMD. Même si l'expression du transgène reste stable à long terme, les doses « thérapeutiques » déterminées dans ces études pour des chiens d'une masse approchant les 10 kg au moment de l'injection correspondent à plus de  $1,0E+14$  génomes de vecteur administrés *in vivo*. Bien qu'aucun effet néfaste n'ait été observé après l'injection d'une telle dose chez le chien GRMD ([Le Guiner 2014](#)), sa toxicité chez les patients DMD reste une question en suspens. De plus, même si réalisable en théorie, la production et la purification des lots de vecteurs nécessaires à l'injection de dizaines de patients soulève aussi plusieurs problèmes d'ordre logistique et économique.

En conséquence, la deuxième partie de ce travail de thèse avait pour objectif de développer un protocole de traitement novateur permettant de diminuer cette dose efficace, et d'apporter une première preuve de concept de sa pertinence dans un modèle de souris mdx4Cv.

## Est-il possible d'augmenter le niveau d'expression du transgène sans augmenter la dose de vecteur AAVr injectée ?

L'objectif de notre **Étude II**, dont les échantillons sont en cours d'analyse au moment de l'écriture de ce manuscrit, est d'améliorer l'efficacité de transduction et d'expression du transgène par un vecteur AAVr dans un muscle déficient en dystrophine au moyen d'un traitement pharmacologique pertinent. Lors de la phase de genèse du projet, nous nous sommes questionnés sur le choix d'un agent pharmacologique qui pourrait améliorer le phénotype musculaire des souris tout en ayant un effet positif sur la transduction des vecteurs AAV *per se*.

### Molécules connues pour améliorer la transduction des vecteurs AAVr

Plusieurs composés sont déjà connus pour améliorer l'efficacité de transduction des vecteurs AAVr, indépendamment de tout contexte cellulaire pathologique. Parmi eux, les inhibiteurs du protéasome (bortezomib, MG132) agissent en diminuant la dégradation des virions qui s'accumulent en zone périnucléaire. Ceci favorise non seulement la translocation nucléaire des virions ([Denby 2005](#)) mais limite aussi la présentation des peptides dérivés de la capsid sur les molécules de CMH-I ([Finn 2010](#)). Cet effet a été observé dans plusieurs types cellulaires, notamment des cellules épithéliales bronchiques ([Duan 2000](#)), des cellules endothéliales vasculaires ([Denby 2005](#)), ou encore des hépatocytes ([Nathwani 2009](#)). Le bénéfice observé semble toutefois dépendre du sérotype utilisé, et potentiellement du modèle d'étude. Ainsi, ces molécules n'ont pas d'effets sur la transduction par un AAVr2/8 chez la souris ([Finn 2010](#)), ni sur un vecteur AAVr2/9 SERCA2a injecté chez un modèle de rat atteint de défaillance cardiaque ([Chaanine 2014](#)). De manière intéressante, les inhibiteurs du protéasome sont également décrits pour leur efficacité dans des modèles animaux de la DMD, que ce soit la souris mdx ([Bonuccelli 2003](#), [Gazzerro 2010](#)) ou le chien GRMD ([Araujo 2013](#)), indépendamment d'un traitement par thérapie génique. Il pourrait donc être intéressant de combiner un inhibiteur du protéasome à un vecteur AAVr dans le cadre de la DMD. Le bortezomib est une des molécules que nous avons envisagé d'utiliser en premier lieu. Mais compte tenu de nos résultats, de la toxicité importante et du coût prohibitif de cette molécule ([Bross 2004](#)), nous avons préféré nous tourner vers une thérapie moins risquée et plus ciblée.

Certaines « drogues épigénétiques », notamment des inhibiteurs d'HDAC auraient également pu s'avérer intéressantes, et ceci pour deux raisons : premièrement, ces molécules sont capables de réactiver l'expression de génomes d'AAVr inhibés épigénétiquement dans des modèles cellulaires particuliers (cellules transduites de manière stable, cellules cancéreuses) ([Chen 1997](#), [Okada 2006](#)) ; de plus, cette classe de molécule entraîne un effet thérapeutique notable chez les souris mdx (**Tableau 3**). Même s'il demeure possible que des formes génomiques particulières de l'AAVr puissent être réactivées par ces drogues, les résultats de notre étude épigénétique ne nous ont pas poussés à les utiliser.

La réponse immunitaire dirigée contre la capsid du vecteur ou la protéine transgénique est l'un des principaux obstacles à considérer lors du développement d'un protocole de thérapie génique ([Manno 2006](#), [Mendell 2010](#), [Mingozzi 2013](#)). Lors de plusieurs essais cliniques utilisant des vecteurs AAVr, l'utilisation de drogues immunosuppressives a permis indirectement de maintenir l'expression du transgène à long terme, en limitant la formation d'anticorps neutralisant et la destruction des cellules transduites ([Gaudet 2013](#), [Nathwani 2014](#)). Différents modes de traitement ont été utilisés : une injection préventive d'immunosuppresseurs au moment de l'administration du vecteur et maintenue pendant une certaine période ([Jiang 2006](#), [Gaudet 2013](#)) ; des injections uniquement dans le cas d'une élévation des enzymes hépatiques, signe d'une potentielle toxicité ([Nathwani 2014](#)). Les effets de ces molécules sur les différentes étapes de la transduction sont peu connus. Une étude a tout de même démontré le potentiel inhibiteur du mycophénolate mofétil (MMF) sur la synthèse du second brin d'un vecteur AAVr ([Montenegro-Miranda 2011](#)).

Des méthodes moins conventionnelles peuvent également s'avérer intéressantes. L'injection de polymères d'acide inosinique ou de lysine quelques minutes avant l'administration du vecteur AAVr chez la souris saine permet une nette augmentation de la transduction et de l'expression d'un transgène muSeAP ([Moulay 2010](#)). Même si cette approche présente certainement des risques importants de toxicité, elle pourrait favoriser l'internalisation des particules d'AAVr dans les cellules musculaires en modifiant leur charge de surface.

## Molécules testées dans le cadre de la thérapie génique de la DMD

La prednisolone, également connue pour ses propriétés immunosuppressives et déjà utilisée en routine chez les patients DMD (**Introduction partie 2.1.2**), pourrait elle aussi avoir un impact sur la persistance et la transduction des vecteurs AAVr. Dans le domaine de la thérapie génique non-virale, l'internalisation cellulaire des OA fait appel à des mécanismes peu caractérisés, mais est probablement favorisée par la perméabilité membranaire des fibres musculaires dystrophiques ([Heemskerk 2010](#)). La prednisolone contribuant potentiellement à stabiliser le sarcolemme chez les patients DMD, elle pourrait diminuer cette incorporation. Une étude conduite sur des myoblastes dérivés de patients DMD et des souris mdx a toutefois permis de réfuter cette hypothèse ([Verhaart 2012](#)). Toujours dans le domaine des antisens, le dantrolène (une molécule connue pour son effet inhibiteur sur le récepteur RyR, [Zhao 2001](#)) semble en revanche capable d'augmenter l'efficacité du saut d'exon sans pour autant avoir d'effets notables sur le phénotype mdx ([Kendall 2012](#)). En revanche, son association avec un AAVr exprimant un transgène dédié au saut d'exon pourrait clairement être envisagée.

Concernant la thérapie génique virale chez le chien GRMD, plusieurs études ont déjà fait mention de l'utilisation d'immunosuppresseurs en amont d'une injection IM de vecteur AAVr ([Wang 2007](#), [Shin 2013](#)). Le traitement adopté pour ces études combinait la cyclosporine au MMF, et débutait une semaine avant l'administration du vecteur. Les auteurs n'ont toutefois noté aucune amélioration phénotypique dans les muscles n'ayant pas reçu de vecteur, ce qui plaide contre un effet bénéfique du seul traitement immunosuppresseur ([Shin 2013](#)). Dans le même cadre, la rapamycine a été sélectionnée pour ses propriétés immunosuppressives et a été administrée à des souris mdx 48 heures avant une injection d'un vecteur adénoviral exprimant l'ADNc *Dmd* ([Eghtesad 2012](#)). Dans cette étude, même si la réponse immunitaire contre le transgène a pu être réduite de manière significative, l'augmentation de l'expression du transgène paraissait dépendre moins de la rapamycine en elle-même que des billes de copolymère ayant permis son administration. Au vu de la bibliographie actuelle, aucune étude formelle n'a été publiée pour les vecteurs AAVr dans les muscles DMD. Les seuls résultats disponibles proviennent d'une étude préclinique annexe à l'essai thérapeutique mentionné dans ce manuscrit ([Mendell 2010](#)). Ils semblent n'indiquer aucune influence de la prednisolone sur la persistance et l'efficacité du vecteur chez la souris mdx ([Bowles 2012](#), *Supplementary materials & methods*).

## Originalité de notre protocole

En comparaison avec les études précédentes, notre protocole se veut novateur en faisant débiter le traitement pharmacologique suffisamment longtemps avant l'injection du vecteur AAVr. Notre objectif est véritablement d'augmenter la permissivité du tissu musculaire déficient en dystrophine vis à vis des vecteurs AAVr en amont de leur administration. Dans cette optique, les résultats de notre **Étude I** suggèrent qu'au moins deux paramètres phénotypiques devraient être améliorés : la nécrose cellulaire provoquant l'élimination des génomes recombinants, et le stress oxydatif endommageant l'ARNm transgénique. Pour ce faire, nous avons sélectionné le NAC, un antioxydant puissant capable d'améliorer ces deux phénotypes chez la souris mdx ([de Senzi Moraes Pinto 2013](#), [Williams 2007](#), [Whitehead 2008](#)). Nos résultats préliminaires après 4 semaines de traitement suggèrent que le NAC n'a pas d'effet sur l'anisocytose observée dans un muscle appendiculaire antérieur (le biceps) et postérieur (le TA) (**Figures 42**). Ce paramètre reflétant l'état pathologique général du muscle, il est possible que son amélioration nécessite un traitement plus long ou plus drastique. De plus, il est sans doute difficile d'inverser complètement ce processus, car il résulte en partie de la présence de fibres hypertrophiques formées par régénération et fusion successives de cellules satellites.

En revanche, notre protocole de traitement au NAC semble déjà avoir eu des effets positifs sur le stress oxydatif après 4 semaines. Le TA des souris mdx4Cv traitées montre en effet moins de cassures double brin de l'ADN (**Figure 43**). Concernant le biceps et le coeur, nous n'avons pas observé de nette différence entre les muscles B6 et mdx4Cv. Ceci pourrait être dû à une atteinte histologique moins développée dans ces tissus, illustrée par l'anisocytose légèrement plus faible mesurée dans le biceps. Toutefois, cela peut aussi refléter la variabilité inter-organe de notre protocole d'immunofluorescence, ou de la biodisponibilité du NAC après une administration *per os*.

Nous pourrions également nous poser la question de la variabilité de l'effet thérapeutique du NAC entre les différents muscles des souris mdx4Cv. Agissant sur le stress oxydatif, le NAC n'aura probablement pas le même effet sur les muscles lents et rapides. En effet, les fibres rapides sont connues pour être moins résistantes à une augmentation du stress oxydatif ([Anderson 2006](#)), et dégèrent d'ailleurs plus rapidement chez les patients DMD ([Webster](#)

[1988](#)). Il est donc possible d'imaginer que le NAC aura un effet plus marqué sur les muscles enrichis en fibres rapides (TA, quadriceps) que sur ceux enrichis en fibres lentes (SOL).

Dans la suite de ce projet, par le suivi cinétique de l'expression du transgène rapporteur muSeAP, nous allons pouvoir évaluer l'effet de ce composé pharmacologique sur le maintien d'un niveau suffisant de génomes recombinants et d'ARNm transgénique pour permettre l'expression à long terme du transgène dans les muscles déficients en dystrophine. À terme, nous espérons que ce type d'approche permette de diminuer la dose efficace de vecteur AAVr à injecter aux futurs patients DMD, afin de réduire au maximum les risques de toxicité liés à cette approche thérapeutique novatrice.

## Conclusion générale

Ce travail de thèse a été l'occasion d'explorer en détail le devenir moléculaire des vecteurs AAVr dans les muscles déficients en dystrophine. Il a permis d'apporter certains arguments expliquant pourquoi cet environnement tissulaire n'est *a priori* pas favorable à une persistance et à une efficacité à long terme de ces vecteurs. En premier lieu, nous avons montré que les génomes d'AAVr sont progressivement perdus des muscles mdx4Cv, confirmant ainsi des résultats obtenus par d'autres équipes. Mais contrairement à ces précédentes études, nous avons mis en évidence que cette perte de génomes recombinants n'est pas le seul facteur responsable des moindres niveaux d'ARNm transgénique que nous avons mesurés dans les muscles atteints. En effet, nous avons démontré que le métabolisme post-transcriptionnel de cet ARNm devait également être considéré comme un facteur de restriction, potentiellement à cause des dommages oxydatifs qu'il subit en l'absence de dystrophine. Cette oxydation est à même d'entraîner sa déstabilisation par des mécanismes cytoplasmiques assurant le contrôle qualité des ARN cellulaires (le NGD par exemple). Au vu de l'expansion rapide des connaissances en épigénétique ou en épitranscriptomique, et des ruptures conceptuelles qu'elles sont susceptibles de réaliser ces prochaines années, il y a fort à parier que d'autres modes de régulation de l'expression du transgène seront prochainement mis en évidence.

Parallèlement, ce travail a permis d'apporter un argument supplémentaire dans le sens de « l'hypothèse limite », selon laquelle seule une expression du transgène suffisamment importante et suffisamment rapide peut être maintenue à long terme dans les muscles déficients en dystrophine. Cependant, compte tenu des doses de vecteur requises à l'heure actuelle pour atteindre un tel niveau d'expression, le développement de stratégies alternatives et novatrices se fait clairement ressentir. Les propriétés intrinsèques des particules de vecteur pourraient sans doute, dans une certaine mesure, être encore améliorées que ce soit au niveau de la capsid (afin de restreindre au maximum la transduction aux cellules d'intérêt et d'optimiser le trafic cytoplasmique des particules) ou du génome recombinant (afin de maximiser l'efficacité du promoteur et des séquences codantes). Toutefois, nous pensons qu'il pourrait être tout aussi pertinent de chercher à optimiser le contexte tissulaire dans lequel ces vecteurs seront injectés. Traiter le muscle déficient en dystrophine par un ou plusieurs composés d'intérêt en amont de

l'injection du vecteur AAVr pourrait rendre le tissu plus permissif à ce vecteur, et permettre ainsi d'augmenter l'indice thérapeutique du produit de thérapie génique. En d'autres termes, restaurer une certaine homéostasie à l'échelle tissulaire pourrait s'avérer décisif, étant données les facultés de persistance des vecteurs AAVr dans un muscle sain.

Nous avons débuté la mise au point d'un tel protocole dans un modèle murin de la DMD. Il est probable que les paramètres que nous avons choisis pour cette étude (nature du composé pharmacologique, période de pré-traitement, dose de vecteur administrée, *etc*) ne soient pas les plus efficaces et requièrent par la suite d'être optimisés. En cas de succès néanmoins, notre étude permettra d'apporter une première preuve de la faisabilité et de la pertinence de ce type d'approche.



# Bibliographie

- A -

- Acharyya, S. *et al.* TNF inhibits Notch-1 in skeletal muscle cells by Ezh2 and DNA methylation mediated repression: implications in duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE* **5**, e12479 (2010).
- Acsadi, G. *et al.* Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* **352**, 815–818 (1991).
- Acsadi, G. *et al.* Dystrophin expression in muscles of mdx mice after adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Hum. Gene Ther.* **7**, 129–140 (1996).
- Adachi, K. & Nakai, H. in *DNA Repair and Human Health* (ed. Vengrova, S.) (InTech, 2011). at <<http://www.intechopen.com/books/dna-repair-and-human-health/the-role-of-dna-repair-pathways-in-adenovirus-associated-virus-infection-and-viral-genome-replication-rec>>
- Adamo, C. M. *et al.* Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 19079–19083 (2010).
- Agarkova, I. *et al.* The molecular composition of the sarcomeric M-band correlates with muscle fiber type. *Eur. J. Cell Biol.* **83**, 193–204 (2004).
- Aldi, S., Robador, P. A., Tomita, K., Di Lorenzo, A. & Levi, R. IgE receptor-mediated mast-cell renin release. *Am. J. Pathol.* **184**, 376–381 (2014).
- Alexander, I. E., Russell, D. W. & Miller, A. D. DNA-damaging agents greatly increase the transduction of nondividing cells by adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* **68**, 8282–8287 (1994).
- Alexander, M. R. & Owens, G. K. Epigenetic control of smooth muscle cell differentiation and phenotypic switching in vascular development and disease. *Annu. Rev. Physiol.* **74**, 13–40 (2012).
- Ali, S. R. *et al.* Existing cardiomyocytes generate cardiomyocytes at a low rate after birth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 8850–8855 (2014).
- Allen, D. G., Gervasio, O. L., Yeung, E. W. & Whitehead, N. P. Calcium and the damage pathways in muscular dystrophy. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **88**, 83–91 (2010).
- Ambrósio, C. E. *et al.* Ringo, a Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) dog with absent dystrophin but normal strength. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 892–893 (2008).
- Amirouche, A. *et al.* Activation of p38 signaling increases utrophin A expression in skeletal muscle via the RNA-binding protein KSRP and inhibition of AU-rich element-mediated mRNA decay: implications for novel DMD therapeutics. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3093–3111 (2013).
- Anant, S. *et al.* Novel role for RNA-binding protein CUGBP2 in mammalian RNA editing. CUGBP2 modulates C to U editing of apolipoprotein B mRNA by interacting with apobec-1 and ACF, the apobec-1 complementation factor. *J. Biol. Chem.* **276**, 47338–47351 (2001).
- Anderson, E. J. & Neuffer, P. D. Type II skeletal myofibers possess unique properties that potentiate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **290**, C844–851 (2006).
- Anderson, J. E., McIntosh, L. M. & Poettcker, R. Deflazacort but not prednisone improves both muscle repair and fiber growth in diaphragm and limb muscle in vivo in the mdx dystrophic mouse. *Muscle Nerve* **19**, 1576–1585 (1996).
- Araujo, K. P. C. *et al.* Bortezomib (PS-341) treatment decreases inflammation and partially rescues the expression of the dystrophin-glycoprotein complex in GRMD dogs. *PLoS ONE* **8**, e61367 (2013).
- Arning, L. *et al.* Transcriptional profiles from patients with dystrophinopathies and limb girdle muscular dystrophies as determined by qRT-PCR. *J. Neurol.* **251**, 72–78 (2004).
- Arnold, L. *et al.* Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *J. Exp. Med.* **204**, 1057–1069 (2007).
- Ascah, A. *et al.* Stress-induced opening of the permeability transition pore in the dystrophin-deficient heart is attenuated by acute treatment with sildenafil. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **300**, H144–153 (2011).
- Asokan, A. *et al.* Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. *Nat. Biotechnol.* **28**, 79–82 (2010).
- Asokan, A., Schaffer, D. V. & Samulski, R. J. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol. Ther.* **20**, 699–708 (2012).
- Atchison, R. W., Casto, B. C. & Hammon, W. M. ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science* **149**, 754–756 (1965).

- Ayrapetov, M. K., Gursoy-Yuzugullu, O., Xu, C., Xu, Y. & Price, B. D. DNA double-strand breaks promote methylation of histone H3 on lysine 9 and transient formation of repressive chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 9169–9174 (2014).
- Ayuso, E. *et al.* Manufacturing and characterization of a recombinant adeno-associated virus type 8 reference standard material. *Hum. Gene Ther.* **25**, 977–987 (2014).
- Ayuso, E., Mingozi, F. & Bosch, F. Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* **10**, 423–436 (2010).

- B -

- Bakay, M., Zhao, P., Chen, J. & Hoffman, E. P. A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. *Neuromuscul. Disord.* **12 Suppl 1**, S125–141 (2002).
- Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K. & Baudino, T. A. Determination of cell types and numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1883–1891 (2007).
- Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381–395 (2011).
- Bantel-Schaal, U., Hub, B. & Kartenbeck, J. Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. *J. Virol.* **76**, 2340–2349 (2002).
- Barberi, L. *et al.* Age-dependent alteration in muscle regeneration: the critical role of tissue niche. *Biogerontology* **14**, 273–292 (2013).
- Barohn, R. J., Levine, E. J., Olson, J. O. & Mendell, J. R. Gastric hypomotility in Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **319**, 15–18 (1988).
- Barth, T. K. & Imhof, A. Fast signals and slow marks: the dynamics of histone modifications. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 618–626 (2010).
- Bartoli, M. *et al.* Noninvasive monitoring of therapeutic gene transfer in animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther.* **13**, 20–28 (2006).
- Barua, B., Winkelmann, D. A., White, H. D. & Hitchcock-DeGregori, S. E. Regulation of actin-myosin interaction by conserved periodic sites of tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 18425–18430 (2012).
- Baylor, S. M. & Hollingworth, S. Intracellular calcium movements during excitation-contraction coupling in mammalian slow-twitch and fast-twitch muscle fibers. *J. Gen. Physiol.* **139**, 261–272 (2012).
- Beauchamp, P. *et al.* Electrical propagation in synthetic ventricular myocyte strands from germline connexin43 knockout mice. *Circ. Res.* **95**, 170–178 (2004).
- Becker, P. D. med P. E. & Kiener, D. phil F. Eine neue x-chromosomale Muskeldystrophie. *Arch für Psychiatrie und Zeitschrift Neurologie* **193**, 427–448 (1955).
- Behrmann, E. *et al.* Structure of the rigor actin-tropomyosin-myosin complex. *Cell* **150**, 327–338 (2012).
- Beltrami, A. P. *et al.* Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell* **114**, 763–776 (2003).
- Benchaouir, R. *et al.* Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell* **1**, 646–657 (2007).
- Bennett, J. *et al.* AAV2 gene therapy readministration in three adults with congenital blindness. *Sci Transl Med* **4**, 120ra15 (2012).
- Bennett, P. M., Maggs, A. M., Baines, A. J. & Pinder, J. C. The transitional junction: a new functional subcellular domain at the intercalated disc. *Mol. Biol. Cell* **17**, 2091–2100 (2006).
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., Dumont, N. A. & Rudnicki, M. A. Cellular dynamics in the muscle satellite cell niche. *EMBO Rep.* **14**, 1062–1072 (2013).
- Bentzinger, C. F., Wang, Y. X. & Rudnicki, M. A. Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
- Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science* **324**, 98–102 (2009).
- Berkemeier, F. *et al.* Fast-folding alpha-helices as reversible strain absorbers in the muscle protein myomesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 14139–14144 (2011).
- Berns, K. I. & Rose, J. A. Evidence for a single-stranded adenovirus-associated virus genome: isolation and

- separation of complementary single strands. *J. Virol.* **5**, 693–699 (1970).
- Bernstein, B. E. *et al.* A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315–326 (2006).
  - Bertolotto, A. *et al.* Laminin and fibronectin distribution in normal and pathological human muscle. *J. Neurol. Sci.* **60**, 377–382 (1983).
  - Bertolotto, A., Palmucci, L., Mongini, T., Schiffer, D. & Caterson, B. Chondroitin, chondroitin 6-sulphate, chondroitin 4-sulphate and dermatan sulphate proteoglycans in normal and pathological human muscle. *J. Neurol. Sci.* **81**, 247–259 (1987).
  - Bessou, C., Giuglia, J. B., Franks, C. J., Holden-Dye, L. & Ségalat, L. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics* **2**, 61–72 (1998).
  - Bestor, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 2395–2402 (2000).
  - Bird, A., Taggart, M., Frommer, M., Miller, O. J. & Macleod, D. A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* **40**, 91–99 (1985).
  - Bird, A. P. DNA methylation and the frequency of CpG in animal DNA. *Nucleic Acids Res.* **8**, 1499–1504 (1980).
  - Bird, A. P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**, 209–213 (1986).
  - Bish, L. T. *et al.* Long-term restoration of cardiac dystrophin expression in golden retriever muscular dystrophy following rAAV6-mediated exon skipping. *Mol. Ther.* **20**, 580–589 (2012).
  - Blacklow, N. R., Hoggan, M. D. & Rowe, W. P. Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **58**, 1410–1415 (1967).
  - Bladen, C. L. *et al.* The TREAT-NMD DMD Global Database: analysis of more than 7,000 Duchenne muscular dystrophy mutations. *Hum. Mutat.* **36**, 395–402 (2015).
  - Boateng, S. Y., Senyo, S. E., Qi, L., Goldspink, P. H. & Russell, B. Myocyte remodeling in response to hypertrophic stimuli requires nucleocytoplasmic shuttling of muscle LIM protein. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **47**, 426–435 (2009).
  - Boland, B. J., Silbert, P. L., Groover, R. V., Wollan, P. C. & Silverstein, M. D. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Neurol.* **14**, 7–12 (1996).
  - Bonen, A. *et al.* Palmitate transport and fatty acid transporters in red and white muscles. *Am. J. Physiol.* **275**, E471–478 (1998).
  - Bonilla, E. *et al.* Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin at the muscle cell surface. *Cell* **54**, 447–452 (1988).
  - Bonuccelli, G. *et al.* Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am. J. Pathol.* **163**, 1663–1675 (2003).
  - Borrmann, C. M. *et al.* The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adherens molecules in the intercalated disk. *Eur. J. Cell Biol.* **85**, 469–485 (2006).
  - Bostick, B., Ghosh, A., Yue, Y., Long, C. & Duan, D. Systemic AAV-9 transduction in mice is influenced by animal age but not by the route of administration. *Gene Ther.* **14**, 1605–1609 (2007).
  - Bottinelli, R., Canepari, M., Reggiani, C. & Stienen, G. J. Myofibrillar ATPase activity during isometric contraction and isomyosin composition in rat single skinned muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **481** ( Pt 3), 663–675 (1994).
  - Bovolenta, M. *et al.* The DMD locus harbours multiple long non-coding RNAs which orchestrate and control transcription of muscle dystrophin mRNA isoforms. *PLoS ONE* **7**, e45328 (2012).
  - Bowles, D. E. *et al.* Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol. Ther.* **20**, 443–455 (2012).
  - Boyett, M. R. & Dobrzynski, H. The sinoatrial node is still setting the pace 100 years after its discovery. *Circ. Res.* **100**, 1543–1545 (2007).
  - Brack, A. S., Conboy, I. M., Conboy, M. J., Shen, J. & Rando, T. A. A temporal switch from notch to Wnt signaling in muscle stem cells is necessary for normal adult myogenesis. *Cell Stem Cell* **2**, 50–59 (2008).
  - Brack, A. S. & Rando, T. A. Tissue-specific stem cells: lessons from the skeletal muscle satellite cell. *Cell Stem Cell* **10**, 504–514 (2012).
  - Bradley, W. G., Hudgson, P., Larson, P. F., Papapetropoulos, T. A. & Jenkison, M. Structural changes in the

- early stages of Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* **35**, 451–455 (1972).
- Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K. & Brecht, D. S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **82**, 743–752 (1995).
  - Bresolin, N. *et al.* Cognitive impairment in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscular Disorders* **4**, 359–369 (1994).
  - Briata, P. *et al.* p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol. Cell* **20**, 891–903 (2005).
  - Briguet, A., Courdier-Fruh, I., Foster, M., Meier, T. & Magyar, J. P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the mdx-mouse. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 675–682 (2004).
  - Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. & Sheu, S.-S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **287**, C817–833 (2004).
  - Bross, P. F. *et al.* Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3954–3964 (2004).
  - Brunk, B. P., Goldhamer, D. J. & Emerson, C. P. Regulated demethylation of the myoD distal enhancer during skeletal myogenesis. *Dev. Biol.* **177**, 490–503 (1996).
  - Bruusgaard, J. C., Liestøl, K., Ekmark, M., Kollstad, K. & Gundersen, K. Number and spatial distribution of nuclei in the muscle fibres of normal mice studied in vivo. *J. Physiol. (Lond.)* **551**, 467–478 (2003).
  - Bryant, L. M. *et al.* Lessons learned from the clinical development and market authorization of Glybera. *Hum Gene Ther Clin Dev* **24**, 55–64 (2013).
  - Buchthal, F. & Schmalbruch, H. Contraction times and fibre types in intact human muscle. *Acta Physiol. Scand.* **79**, 435–452 (1970).
  - Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A. & Moore, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 1189–1192 (1984).
  - Bustin, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J. Mol. Endocrinol.* **25**, 169–193 (2000).
  - Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J. Mol. Endocrinol.* **29**, 23–39 (2002).
  - Buyse, G. M. *et al.* Long-term blinded placebo-controlled study of SNT-MC17/idebenone in the dystrophin deficient mdx mouse: cardiac protection and improved exercise performance. *Eur. Heart J.* **30**, 116–124 (2009).
  - Buyse, G. M. *et al.* 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. *Lancet* **385**, 1748–1757 (2015).

- C -

- Campbell, W. G. *et al.* Differential global gene expression in red and white skeletal muscle. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **280**, C763–768 (2001).
- Can, T. *et al.* Proteomic analysis of laser capture microscopy purified myotendinous junction regions from muscle sections. *Proteome Sci* **12**, 25 (2014).
- Cao, M., You, H. & Hermonat, P. L. The X gene of adeno-associated virus 2 (AAV2) is involved in viral DNA replication. *PLoS ONE* **9**, e104596 (2014).
- Caremani, M., Melli, L., Dolfi, M., Lombardi, V. & Linari, M. The working stroke of the myosin II motor in muscle is not tightly coupled to release of orthophosphate from its active site. *J. Physiol. (Lond.)* **591**, 5187–5205 (2013).
- Caretti, G., Di Padova, M., Micales, B., Lyons, G. E. & Sartorelli, V. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* **18**, 2627–2638 (2004).
- Carpenter, J. L. *et al.* Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency. *Am. J. Pathol.* **135**, 909–919 (1989).
- Castello, A. *et al.* Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393–1406 (2012).
- Castillo, A., Nowak, R., Littlefield, K. P., Fowler, V. M. & Littlefield, R. S. A nebulin ruler does not dictate thin filament lengths. *Biophys. J.* **96**, 1856–1865 (2009).

- Cataldi, M. P. & McCarty, D. M. Differential effects of DNA double-strand break repair pathways on single-strand and self-complementary adeno-associated virus vector genomes. *J. Virol.* **84**, 8673–8682 (2010).
- Cataldi, M. P. & McCarty, D. M. Hairpin-end conformation of adeno-associated virus genome determines interactions with DNA-repair pathways. *Gene Ther.* **20**, 686–693 (2013).
- Celik, A., Kervestin, S. & Jacobson, A. NMD: At the crossroads between translation termination and ribosome recycling. *Biochimie* **114**, 2–9 (2015).
- Cervelli, T. *et al.* Processing of recombinant AAV genomes occurs in specific nuclear structures that overlap with foci of DNA-damage-response proteins. *J. Cell. Sci.* **121**, 349–357 (2008).
- Chaanine, A. H. *et al.* Effect of bortezomib on the efficacy of AAV9.SERCA2a treatment to preserve cardiac function in a rat pressure-overload model of heart failure. *Gene Ther.* **21**, 379–386 (2014).
- Chakkalakal, J. V., Jones, K. M., Basson, M. A. & Brack, A. S. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. *Nature* **490**, 355–360 (2012).
- Chamberlain, J. S. & Rando T. A. Duchenne Muscular Dystrophy: Advances in Therapeutics. *CRC Press*, Feb. 27<sup>th</sup>, 2006.
- Chamberlain, J. S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D. & Faulkner, J. A. Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J.* **21**, 2195–2204 (2007).
- Chandler, R. J. *et al.* Vector design influences hepatic genotoxicity after adeno-associated virus gene therapy. *J. Clin. Invest.* **125**, 870–880 (2015).
- Chandrasekharan, K. *et al.* A human-specific deletion in mouse Cmah increases disease severity in the mdx model of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med* **2**, 42ra54 (2010).
- Chang, Y. *et al.* Messenger RNA oxidation occurs early in disease pathogenesis and promotes motor neuron degeneration in ALS. *PLoS ONE* **3**, e2849 (2008).
- Chapman, V. M., Miller, D. R., Armstrong, D. & Caskey, C. T. Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1292–1296 (1989).
- Chen, C.-C., Wang, K.-Y. & Shen, C.-K. J. DNA 5-methylcytosine demethylation activities of the mammalian DNA methyltransferases. *J. Biol. Chem.* **288**, 9084–9091 (2013).
- Chen, P., Tian, J., Kovessi, I. & Bruder, J. T. Promoters influence the kinetics of transgene expression following adenovector gene delivery. *J Gene Med* **10**, 123–131 (2008).
- Chen, S.-E., Jin, B. & Li, Y.-P. TNF-alpha regulates myogenesis and muscle regeneration by activating p38 MAPK. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **292**, C1660–1671 (2007).
- Chen, W. Y., Bailey, E. C., McCune, S. L., Dong, J. Y. & Townes, T. M. Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 5798–5803 (1997).
- Chen, Y. *et al.* Functional disruption of the dystrophin gene in rhesus monkey using CRISPR/Cas9. *Hum. Mol. Genet.* (2015). doi:10.1093/hmg/ddv120
- Chen, Y. *et al.* Mitofusin 2-containing mitochondrial-reticular microdomains direct rapid cardiomyocyte bioenergetic responses via interorganelle Ca(2+) crosstalk. *Circ. Res.* **111**, 863–875 (2012).
- Chen, Z.-Y., Riu, E., He, C.-Y., Xu, H. & Kay, M. A. Silencing of episomal transgene expression in liver by plasmid bacterial backbone DNA is independent of CpG methylation. *Mol. Ther.* **16**, 548–556 (2008).
- Chen, Z. Y., He, C. Y., Meuse, L. & Kay, M. A. Silencing of episomal transgene expression by plasmid bacterial DNA elements in vivo. *Gene Ther.* **11**, 856–864 (2004).
- Choi, T., Huang, M., Gorman, C. & Jaenisch, R. A generic intron increases gene expression in transgenic mice. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3070–3074 (1991).
- Cirak, S. *et al.* 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 (2011).
- Cohn, R. D. *et al.* Angiotensin II type 1 receptor blockade attenuates TGF-beta-induced failure of muscle regeneration in multiple myopathic states. *Nat. Med.* **13**, 204–210 (2007).
- Colussi, C. *et al.* The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces cardiac arrhythmias in dystrophic mice. *Cardiovasc. Res.* **87**, 73–82 (2010).
- Colussi, C. *et al.* Nitric oxide deficiency determines global chromatin changes in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.* **23**, 2131–2141 (2009).
- Colussi, C. *et al.* HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 19183–19187 (2008).

- Consalvi, S. *et al.* Preclinical studies in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy with the histone deacetylase inhibitor givinostat. *Mol. Med.* **19**, 79–87 (2013).
- Corcoran, G. B. *et al.* Effects of N-acetylcysteine on the disposition and metabolism of acetaminophen in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **232**, 857–863 (1985).
- Crespo, L. M., Grantham, C. J. & Cannell, M. B. Kinetics, stoichiometry and role of the Na-Ca exchange mechanism in isolated cardiac myocytes. *Nature* **345**, 618–621 (1990).
- Csont, T. *et al.* Biglycan protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury: role of nitric oxide. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **48**, 649–652 (2010).
- Cullen, M. J. & Mastaglia, F. L. Morphological changes in dystrophic muscle. *Br. Med. Bull.* **36**, 145–122 (1980).

- D -

- Dadgar, S. *et al.* Asynchronous remodeling is a driver of failed regeneration in Duchenne muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* **207**, 139–158 (2014).
- Danko, I., Chapman, V. & Wolff, J. A. The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy. *Pediatr. Res.* **32**, 128–131 (1992).
- Danowski, B. A., Imanaka-Yoshida, K., Sanger, J. M. & Sanger, J. W. Costameres are sites of force transmission to the substratum in adult rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* **118**, 1411–1420 (1992).
- Davis, H. L., Whalen, R. G. & Demeneix, B. A. Direct gene transfer into skeletal muscle in vivo: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum. Gene Ther.* **4**, 151–159 (1993).
- Davis, J., Burr, A. R., Davis, G. F., Birnbaumer, L. & Molkentin, J. D. A TRPC6-dependent pathway for myofibroblast transdifferentiation and wound healing in vivo. *Dev. Cell* **23**, 705–715 (2012).
- Dawson, J. M., Tyler, K. R. & Hudlicka, O. A comparison of the microcirculation in rat fast glycolytic and slow oxidative muscles at rest and during contractions. *Microvasc. Res.* **33**, 167–182 (1987).
- de Brito, O. M. & Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605–610 (2008).
- Decary, S. *et al.* Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul. Disord.* **10**, 113–120 (2000).
- de Klerk, E. *et al.* Assessing the translational landscape of myogenic differentiation by ribosome profiling. *Nucleic Acids Res.* **43**, 4408–4428 (2015).
- de Klerk, E. & Hoen, P. A. C. 't. Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing. *Trends Genet.* **31**, 128–139 (2015).
- Delbono, O. & Meissner, G. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in rat slow- and fast-twitch muscles. *J. Membr. Biol.* **151**, 123–130 (1996).
- Dellavalle, A. *et al.* Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 255–267 (2007).
- Denard, J. *et al.* Human galectin 3 binding protein interacts with recombinant adeno-associated virus type 6. *J. Virol.* **86**, 6620–6631 (2012).
- Denard, J. *et al.* C-reactive protein (CRP) is essential for efficient systemic transduction of recombinant adeno-associated virus vector 1 (rAAV-1) and rAAV-6 in mice. *J. Virol.* **87**, 10784–10791 (2013).
- Denby, L., Nicklin, S. A. & Baker, A. H. Adeno-associated virus (AAV)-7 and -8 poorly transduce vascular endothelial cells and are sensitive to proteasomal degradation. *Gene Ther.* **12**, 1534–1538 (2005).
- Denti, M. A. *et al.* Body-wide gene therapy of Duchenne muscular dystrophy in the mdx mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 3758–3763 (2006).
- Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **22**, 1775–1789 (2012).
- de Senzi Moraes Pinto, R. *et al.* N-Acetylcysteine treatment reduces TNF- $\alpha$  levels and myonecrosis in diaphragm muscle of mdx mice. *Clinical Nutrition* **32**, 472–475 (2013).
- Desguerre, I. *et al.* Endomysial fibrosis in Duchenne muscular dystrophy: a marker of poor outcome associated with macrophage alternative activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **68**, 762–773 (2009).
- Di Foggia, V. *et al.* Bmi1 enhances skeletal muscle regeneration through MT1-mediated oxidative stress protection in a mouse model of dystrophinopathy. *J. Exp. Med.* **211**, 2617–2633 (2014).

- Ding, W., Zhang, L. N., Yeaman, C. & Engelhardt, J. F. rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. *Mol. Ther.* **13**, 671–682 (2006).
- Dismuke, D. J., Tenenbaum, L. & Samulski, R. J. Biosafety of recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther* **13**, 434–452 (2013).
- Doma, M. K. & Parker, R. Endonucleolytic cleavage of eukaryotic mRNAs with stalls in translation elongation. *Nature* **440**, 561–564 (2006).
- Dominissini, D. *et al.* Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature* **485**, 201–206 (2012).
- Donsante, A. *et al.* AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* **317**, 477 (2007).
- Dorchies, O. M. *et al.* Green tea extract and its major polyphenol (-)-epigallocatechin gallate improve muscle function in a mouse model for Duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **290**, C616–625 (2006).
- Douar, A. M., Poulard, K., Stockholm, D. & Danos, O. Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. *J. Virol.* **75**, 1824–1833 (2001).
- Douglas, A. G. L. & Wood, M. J. A. RNA splicing: disease and therapy. *Brief Funct Genomics* **10**, 151–164 (2011).
- Downey, J. *et al.* Prospective heterotopic ossification progenitors in adult human skeletal muscle. *Bone* **71**, 164–170 (2015).
- Dressman, D. *et al.* Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1631–1646 (2002).
- Duan, D. *et al.* Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. *J. Virol.* **73**, 10371–10376 (1999).
- Duan, D., Yue, Y., Yan, Z., Yang, J. & Engelhardt, J. F. Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. *J. Clin. Invest.* **105**, 1573–1587 (2000).
- Duboc, D. *et al.* Perindopril preventive treatment on mortality in Duchenne muscular dystrophy: 10 years' follow-up. *Am. Heart J.* **154**, 596–602 (2007).
- Duchenne G. B. *De l'électrisation localisée et de son application à la pathologie et à la thérapeutique.* Deuxième édition, publiée par J.-B. Baillière, Paris (1861).
- Duchenne G. B. *De la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclérosique.* Archives générales de médecine, Paris (Janvier 1868).
- Dumont, N. A., Bentzinger, C. F., Sincennes, M.-C. & Rudnicki, M. A. Satellite Cells and Skeletal Muscle Regeneration. *Compr Physiol* **5**, 1027–1059 (2015).
- Dunant, P. *et al.* Expression of dystrophin driven by the 1.35-kb MCK promoter ameliorates muscular dystrophy in fast, but not in slow muscles of transgenic mdx mice. *Mol. Ther.* **8**, 80–89 (2003).
- Dunckley, M. G., Wells, D. J., Walsh, F. S. & Dickson, G. Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum. Mol. Genet.* **2**, 717–723 (1993).

- E -

- Eagle, M. *et al.* Managing Duchenne muscular dystrophy--the additive effect of spinal surgery and home nocturnal ventilation in improving survival. *Neuromuscul. Disord.* **17**, 470–475 (2007).
- Eghtesad, S., Jhunjhunwala, S., Little, S. R. & Clemens, P. R. Effect of rapamycin on immunity induced by vector-mediated dystrophin expression in mdx skeletal muscle. *Sci Rep* **2**, 399 (2012).
- Ehrhardt, A., Xu, H. & Kay, M. A. Episomal Persistence of Recombinant Adenoviral Vector Genomes during the Cell Cycle In Vivo. *J Virol* **77**, 7689–7695 (2003).
- El-Shafey, A. F., Armstrong, A. E., Terrill, J. R., Grounds, M. D. & Arthur, P. G. Screening for increased protein thiol oxidation in oxidatively stressed muscle tissue. *Free Radic. Res.* **45**, 991–999 (2011).
- Emery, A. E. Muscle histology and creatine kinase levels in the foetus in Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **266**, 472–473 (1977).
- Engel, A. G. & Arahata, K. Mononuclear cells in myopathies: quantitation of functionally distinct subsets, recognition of antigen-specific cell-mediated cytotoxicity in some diseases, and implications for the pathogenesis of the different inflammatory myopathies. *Hum. Pathol.* **17**, 704–721 (1986).

- Engel, F. B., Schebesta, M. & Keating, M. T. Anillin localization defect in cardiomyocyte binucleation. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 601–612 (2006).
- Ermolova, N. V. *et al.* Long-term administration of the TNF blocking drug Remicade (cV1q) to mdx mice reduces skeletal and cardiac muscle fibrosis, but negatively impacts cardiac function. *Neuromuscul. Disord.* **24**, 583–595 (2014).
- Ervasti, J. M. Costameres: the Achilles' heel of Herculean muscle. *J. Biol. Chem.* **278**, 13591–13594 (2003).
- Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G. & Campbell, K. P. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* **345**, 315–319 (1990).
- Escher, G. *et al.* Demethylation using the epigenetic modifier, 5-azacytidine, increases the efficiency of transient transfection of macrophages. *J. Lipid Res.* **46**, 356–365 (2005).
- Estigoy, C. B. *et al.* Intercalated discs: multiple proteins perform multiple functions in non-failing and failing human hearts. *Biophys Rev* **1**, 43–49 (2009).

- F -

- Fabb, S. A., Wells, D. J., Serpente, P. & Dickson, G. 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 (2002).
- Fairclough, R. J., Perkins, K. J. & Davies, K. E. Pharmacologically targeting the primary defect and downstream pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Curr Gene Ther* **12**, 206–244 (2012).
- Fairclough, R. J., Wood, M. J. & Davies, K. E. Therapy for Duchenne muscular dystrophy: renewed optimism from genetic approaches. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 373–378 (2013).
- Ferrier, P., Bamatter, F. & Klein, D. MUSCULAR DYSTROPHY (DUCHENNE) IN A GIRL WITH TURNER'S SYNDROME. *J. Med. Genet.* **2**, 38–46 (1965).
- Figueroa, A. *et al.* Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4991–5004 (2003).
- Finn, J. D. *et al.* Proteasome inhibitors decrease AAV2 capsid derived peptide epitope presentation on MHC class I following transduction. *Mol. Ther.* **18**, 135–142 (2010).
- Fleischer, S., Ogunbunmi, E. M., Dixon, M. C. & Fleer, E. A. Localization of Ca<sup>2+</sup> release channels with ryanodine in junctional terminal cisternae of sarcoplasmic reticulum of fast skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 7256–7259 (1985).
- Flotte, T. R. Birth of a new therapeutic platform: 47 years of adeno-associated virus biology from virus discovery to licensed gene therapy. *Mol. Ther.* **21**, 1976–1981 (2013).
- Foster, H. *et al.* 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 (2008).
- Fougousse, F. *et al.* Phenotypic correction of alpha-sarcoglycan deficiency by intra-arterial injection of a muscle-specific serotype 1 rAAV vector. *Mol. Ther.* **15**, 53–61 (2007).
- Frangogiannis, N. G. *et al.* Resident cardiac mast cells degranulate and release preformed TNF-alpha, initiating the cytokine cascade in experimental canine myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* **98**, 699–710 (1998).
- Frank, E. & Fischbach, G. D. Early events in neuromuscular junction formation in vitro: induction of acetylcholine receptor clusters in the postsynaptic membrane and morphology of newly formed synapses. *J. Cell Biol.* **83**, 143–158 (1979).
- Frankel, K. A. & Rosser, R. J. The pathology of the heart in progressive muscular dystrophy: epimyocardial fibrosis. *Hum. Pathol.* **7**, 375–386 (1976).
- Franzini-Armstrong, C., Protasi, F. & Ramesh, V. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys. J.* **77**, 1528–1539 (1999).
- Friedrichs, M. *et al.* BMP signaling balances proliferation and differentiation of muscle satellite cell descendants. *BMC Cell Biol.* **12**, 26 (2011).

- G -

- Galvagni, F., Cartocci, E. & Oliviero, S. The dystrophin promoter is negatively regulated by YY1 in undifferentiated muscle cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 33708–33713 (1998).
- Gaud, A. *et al.* Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans*. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 365–370 (2004).
- Gaudesius, G., Miragoli, M., Thomas, S. P. & Rohr, S. Coupling of cardiac electrical activity over extended distances by fibroblasts of cardiac origin. *Circ. Res.* **93**, 421–428 (2003).
- Gaudet, D. *et al.* Efficacy and long-term safety of alipogene tiparvovec (AAV1-LPLS447X) gene therapy for lipoprotein lipase deficiency: an open-label trial. *Gene Ther.* **20**, 361–369 (2013).
- Gazzero, E. *et al.* Therapeutic potential of proteasome inhibition in Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Am. J. Pathol.* **176**, 1863–1877 (2010).
- Gee, S. H. *et al.* Interaction of muscle and brain sodium channels with multiple members of the syntrophin family of dystrophin-associated proteins. *J. Neurosci.* **18**, 128–137 (1998).
- Geisinger, H. D., Rao, P. V. & McDonald-Taylor, C. K. ‘mdx’ mouse myopathy: histopathological, morphometric and histochemical observations on young mice. *J. Comp. Pathol.* **102**, 249–263 (1990).
- Gernoux, G. *et al.* 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 (2015).
- Gersch, C. *et al.* Mast cells and macrophages in normal C57/BL/6 mice. *Histochem. Cell Biol.* **118**, 41–49 (2002).
- Gervásio, O. L., Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Phillips, W. D. & Allen, D. G. TRPC1 binds to caveolin-3 and is regulated by Src kinase - role in Duchenne muscular dystrophy. *J. Cell. Sci.* **121**, 2246–2255 (2008).
- Geula, S. *et al.* Stem cells. m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science* **347**, 1002–1006 (2015).
- Gieseler, K., Grisoni, K. & Ségalat, L. Genetic suppression of phenotypes arising from mutations in dystrophin-related genes in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Biol.* **10**, 1092–1097 (2000).
- Gilgenkrantz, H. *et al.* Positive and negative regulatory DNA elements including a CCArGG box are involved in the cell type-specific expression of the human muscle dystrophin gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 10823–10830 (1992).
- Gillies, A. R. & Lieber, R. L. Structure and function of the skeletal muscle extracellular matrix. *Muscle Nerve* **44**, 318–331 (2011).
- Giordani, L. & Puri, P. L. Epigenetic control of skeletal muscle regeneration: Integrating genetic determinants and environmental changes. *FEBS J.* **280**, 4014–4025 (2013).
- Goemans, N. M. *et al.* Systemic administration of PRO051 in Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1513–1522 (2011).
- Gokhin, D. S. *et al.* Tropomodulin isoforms regulate thin filament pointed-end capping and skeletal muscle physiology. *J. Cell Biol.* **189**, 95–109 (2010).
- Gokhin, D. S., Tierney, M. T., Sui, Z., Sacco, A. & Fowler, V. M. Calpain-mediated proteolysis of tropomodulin isoforms leads to thin filament elongation in dystrophic skeletal muscle. *Mol. Biol. Cell* **25**, 852–865 (2014).
- Goldberg, I. J., Trent, C. M. & Schulze, P. C. Lipid metabolism and toxicity in the heart. *Cell Metab.* **15**, 805–812 (2012).
- Goldsmith, E. C. *et al.* Organization of fibroblasts in the heart. *Dev. Dyn.* **230**, 787–794 (2004).
- Gong, C., Kim, Y. K., Woeller, C. F., Tang, Y. & Maquat, L. E. SMD and NMD are competitive pathways that contribute to myogenesis: effects on PAX3 and myogenin mRNAs. *Genes Dev.* **23**, 54–66 (2009).
- Gong, M. C. *et al.* Calcium-independent phospholipase A2 modulates cytosolic oxidant activity and contractile function in murine skeletal muscle cells. *J. Appl. Physiol.* **100**, 399–405 (2006).
- Gouda, Z. A., Elewa, Y. H. A. & Selim, A. O. Histological architecture of cardiac myofibers composing the left ventricle of murine heart. *Journal of Histology and Histopathology* **2**, 2 (2015).
- Gourdie, R. G., Green, C. R. & Severs, N. J. Gap junction distribution in adult mammalian myocardium revealed by an anti-peptide antibody and laser scanning confocal microscopy. *J. Cell. Sci.* **99** ( Pt 1), 41–55 (1991).
- Goyenvallé, A. *et al.* Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. *Nat. Med.* **21**, 270–275 (2015).
- Goyenvallé, A. *et al.* Rescue of severely affected dystrophin/utrophin-deficient mice through scAAV-U7snRNA-mediated exon skipping. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2559–2571 (2012).
- Goyenvallé, A. *et al.* Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. *Science* **306**,

1796–1799 (2004).

- Gracey Maniar, L. E. *et al.* Minicircle DNA vectors achieve sustained expression reflected by active chromatin and transcriptional level. *Mol. Ther.* **21**, 131–138 (2013).
- Grady, R. M. *et al.* Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **90**, 729–738 (1997).
- Greenbaum, R. A., Ho, S. Y., Gibson, D. G., Becker, A. E. & Anderson, R. H. Left ventricular fibre architecture in man. *Br Heart J* **45**, 248–263 (1981).
- Greenberg, C. R. *et al.* Gene studies in newborn males with Duchenne muscular dystrophy detected by neonatal screening. *Lancet* **2**, 425–427 (1988).
- Greenhaff, P. L., Söderlund, K., Ren, J. M. & Hultman, E. Energy metabolism in single human muscle fibres during intermittent contraction with occluded circulation. *J. Physiol. (Lond.)* **460**, 443–453 (1993).
- Gregorevic, P. *et al.* rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat. Med.* **12**, 787–789 (2006).
- Gregorevic, P., Blankinship, M. J., Allen, J. M. & Chamberlain, J. S. Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol. Ther.* **16**, 657–664 (2008).
- Gregorevic, P. *et al.* Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* **10**, 828–834 (2004).
- Grieger, J. C. & Samulski, R. J. Adeno-associated virus vectorology, manufacturing, and clinical applications. *Meth. Enzymol.* **507**, 229–254 (2012).
- Guo, C. *et al.* Absence of alpha 7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 989–998 (2006).
- Guo, J. U., Su, Y., Zhong, C., Ming, G. & Song, H. Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* **145**, 423–434 (2011).

## - H -

- Haberland, M., Montgomery, R. L. & Olson, E. N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 32–42 (2009).
- Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* **302**, 415–419 (2003).
- Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N. Engl. J. Med.* **346**, 1185–1193 (2002).
- Hacein-Bey-Abina, S. *et al.* A modified  $\gamma$ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1407–1417 (2014).
- Hahn, M. A., Wu, X., Li, A. X., Hahn, T. & Pfeifer, G. P. Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PLoS ONE* **6**, e18844 (2011).
- Hahnel, A. C. *et al.* Two alkaline phosphatase genes are expressed during early development in the mouse embryo. *Development* **110**, 555–564 (1990).
- Haidet, A. M. *et al.* 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 (2008).
- Hamilton, M. T., Etienne, J., McClure, W. C., Pavey, B. S. & Holloway, A. K. Role of local contractile activity and muscle fiber type on LPL regulation during exercise. *Am. J. Physiol.* **275**, E1016–1022 (1998).
- Hansford, R. G., Moreno-Sánchez, R. & Lewartowski, B. Activation of pyruvate dehydrogenase complex by Ca<sup>2+</sup> in intact heart, cardiac myocytes, and cardiac mitochondria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **573**, 240–253 (1989).
- Hanson, J. & Huxley, H. E. Structural basis of the cross-striations in muscle. *Nature* **172**, 530–532 (1953).
- Harper, S. Q. *et al.* Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat. Med.* **8**, 253–261 (2002).
- Haslett, J. N. *et al.* Gene expression comparison of biopsies from Duchenne muscular dystrophy (DMD) and normal skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 15000–15005 (2002).
- Hau, H. H. *et al.* Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J. Cell. Biochem.* **100**, 1477–1492 (2007).
- Hauck, B., Zhao, W., High, K. & Xiao, W. Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J. Virol.* **78**, 13678–13686 (2004).

- Hausburg, M. A. *et al.* Post-transcriptional regulation of satellite cell quiescence by TTP-mediated mRNA decay. *Elife* **4**, e03390 (2015).
- Hayashi, T. *et al.* Three-dimensional electron microscopy reveals new details of membrane systems for Ca<sup>2+</sup> signaling in the heart. *J. Cell. Sci.* **122**, 1005–1013 (2009).
- Hayashita-Kinoh, H. *et al.* Intra-amniotic rAAV-mediated microdystrophin gene transfer improves canine X-linked muscular dystrophy and may induce immune tolerance. *Mol. Ther.* **23**, 627–637 (2015).
- Heemskerk, H. *et al.* Preclinical PK and PD studies on 2'-O-methyl-phosphorothioate RNA antisense oligonucleotides in the mdx mouse model. *Mol. Ther.* **18**, 1210–1217 (2010).
- Hejnar, J. *et al.* Inhibition of the rous sarcoma virus long terminal repeat-driven transcription by in vitro methylation: different sensitivity in permissive chicken cells versus mammalian cells. *Virology* **255**, 171–181 (1999).
- Heller, K. N. *et al.* AAV-mediated overexpression of human  $\alpha 7$  integrin leads to histological and functional improvement in dystrophic mice. *Mol. Ther.* **21**, 520–525 (2013).
- Hendriksen, J. G. M. & Vles, J. S. H. Neuropsychiatric disorders in males with duchenne muscular dystrophy: frequency rate of attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD), autism spectrum disorder, and obsessive-compulsive disorder. *J. Child Neurol.* **23**, 477–481 (2008).
- Henricson, E. K. *et al.* The cooperative international neuromuscular research group Duchenne natural history study: glucocorticoid treatment preserves clinically meaningful functional milestones and reduces rate of disease progression as measured by manual muscle testing and other commonly used clinical trial outcome measures. *Muscle Nerve* **48**, 55–67 (2013).
- Hermonat, P. L. & Muzyczka, N. Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 6466–6470 (1984).
- Herrmann, S., Layh, B. & Ludwig, A. Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **51**, 997–1006 (2011).
- Herum, K. M. *et al.* Syndecan-4 signaling via NFAT regulates extracellular matrix production and cardiac myofibroblast differentiation in response to mechanical stress. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **54**, 73–81 (2013).
- Hidalgo, C., Sánchez, G., Barrientos, G. & Aracena-Parks, P. A transverse tubule NADPH oxidase activity stimulates calcium release from isolated triads via ryanodine receptor type 1 S -glutathionylation. *J. Biol. Chem.* **281**, 26473–26482 (2006).
- Hiragami-Hamada, K. *et al.* The molecular basis for stability of heterochromatin-mediated silencing in mammals. *Epigenetics Chromatin* **2**, 14 (2009).
- Hirn, C., Shapovalov, G., Petermann, O., Roulet, E. & Ruegg, U. T. Nav1.4 deregulation in dystrophic skeletal muscle leads to Na<sup>+</sup> overload and enhanced cell death. *J. Gen. Physiol.* **132**, 199–208 (2008).
- Hodges, B. L. *et al.* Altered expression of the alpha7beta1 integrin in human and murine muscular dystrophies. *J. Cell. Sci.* **110** ( Pt 22), 2873–2881 (1997).
- Hodgetts, S., Radley, H., Davies, M. & Grounds, M. D. Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* **16**, 591–602 (2006).
- Hofer, T. *et al.* Hydrogen peroxide causes greater oxidation in cellular RNA than in DNA. *Biol. Chem.* **386**, 333–337 (2005).
- Hofer, T. *et al.* Increased iron content and RNA oxidative damage in skeletal muscle with aging and disuse atrophy. *Exp. Gerontol.* **43**, 563–570 (2008).
- Hori, Y. S. *et al.* Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **338**, 784–794 (2011).
- Howald, H., Hoppeler, H., Claassen, H., Mathieu, O. & Straub, R. Influences of endurance training on the ultrastructural composition of the different muscle fiber types in humans. *Pflugers Arch.* **403**, 369–376 (1985).
- Huang, C.-F., Chen, Y.-C., Yeh, H.-I. & Chen, S.-A. Mononucleated and binucleated cardiomyocytes in left atrium and pulmonary vein have different electrical activity and calcium dynamics. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **108**, 64–73 (2012).
- Huang, P., Zhao, X. S., Fields, M., Ransohoff, R. M. & Zhou, L. Imatinib attenuates skeletal muscle dystrophy in mdx mice. *FASEB J.* **23**, 2539–2548 (2009).
- Huebener, P. *et al.* CD44 is critically involved in infarct healing by regulating the inflammatory and fibrotic response. *J. Immunol.* **180**, 2625–2633 (2008).

- I -

- Iacovoni, J. S. *et al.* High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J.* **29**, 1446–1457 (2010).
- Ichas, F., Jouaville, L. S. & Mazat, J. P. Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* **89**, 1145–1153 (1997).
- Ieronimakis, N. *et al.* Coronary adventitial cells are linked to perivascular cardiac fibrosis via TGFβ1 signaling in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **63**, 122–134 (2013).
- Illingworth, R. *et al.* A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biol.* **6**, e22 (2008).
- Illingworth, R. S. *et al.* Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet.* **6**, e1001134 (2010).
- Im, W. B. *et al.* Differential expression of dystrophin isoforms in strains of mdx mice with different mutations. *Hum. Mol. Genet.* **5**, 1149–1153 (1996).
- Inagaki, K. *et al.* Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.* **14**, 45–53 (2006).
- Inesi, G., Chen, L., Sumbilla, C., Lewis, D. & Kirtley, M. E. Ca<sup>2+</sup> binding and translocation by the sarcoplasmic reticulum ATPase: functional and structural considerations. *Biosci. Rep.* **15**, 327–339 (1995).
- Ingolia, N. T., Lareau, L. F. & Weissman, J. S. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell* **147**, 789–802 (2011).
- Iwasaki, T., Terrill, J., Shavlakadze, T., Grounds, M. D. & Arthur, P. G. Visualizing and quantifying oxidized protein thiols in tissue sections: a comparison of dystrophic mdx and normal skeletal mouse muscles. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 1408–1416 (2013).

- J -

- Jackman, M. R. & Willis, W. T. Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* **270**, C673–678 (1996).
- Jansson, E. & Sylvén, C. Myoglobin concentration in single type I and type II muscle fibres in man. *Histochemistry* **78**, 121–124 (1983).
- Jiang, C. *et al.* Notch signaling deficiency underlies age-dependent depletion of satellite cells in muscular dystrophy. *Dis Model Mech* **7**, 997–1004 (2014).
- Jiang, H. *et al.* Effects of transient immunosuppression on adenoassociated, virus-mediated, liver-directed gene transfer in rhesus macaques and implications for human gene therapy. *Blood* **108**, 3321–3328 (2006).
- Joe, A. W. B. *et al.* Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat. Cell Biol.* **12**, 153–163 (2010).
- Johnson, J. S. & Samulski, R. J. Enhancement of Adeno-Associated Virus Infection by Mobilizing Capsids into and Out of the Nucleolus. *J Virol* **83**, 2632–2644 (2009).
- Johnson, M. A., Polgar, J., Weightman, D. & Appleton, D. Data on the distribution of fibre types in thirty-six human muscles. An autopsy study. *J. Neurol. Sci.* **18**, 111–129 (1973).
- Jones, N. C. *et al.* The p38alpha/beta MAPK functions as a molecular switch to activate the quiescent satellite cell. *J. Cell Biol.* **169**, 105–116 (2005).
- Jorgensen, A. *et al.* Increased systemic oxidatively generated DNA and RNA damage in schizophrenia. *Psychiatry Res* **209**, 417–423 (2013).
- Juan, A. H. *et al.* Polycomb EZH2 controls self-renewal and safeguards the transcriptional identity of skeletal muscle stem cells. *Genes Dev.* **25**, 789–794 (2011).

- K -

- Kaepfel, C. *et al.* A largely random AAV integration profile after LPLD gene therapy. *Nat. Med.* **19**, 889–891

- (2013).
- Kalyanaraman, B. *et al.* Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* **52**, 1–6 (2012).
  - Kaprielian, R. R., Stevenson, S., Rothery, S. M., Cullen, M. J. & Severs, N. J. Distinct patterns of dystrophin organization in myocyte sarcolemma and transverse tubules of normal and diseased human myocardium. *Circulation* **101**, 2586–2594 (2000).
  - Karimi, M. M. *et al.* DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mESCs. *Cell Stem Cell* **8**, 676–687 (2011).
  - Katahira, J. Nuclear export of messenger RNA. *Genes (Basel)* **6**, 163–184 (2015).
  - Kawanabe, Y., Hashimoto, N. & Masaki, T. Characterization of Ca<sup>2+</sup> channels involved in ET-1-induced transactivation of EGF receptors. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**, H2671–2675 (2002).
  - Kendall, G. C. *et al.* Dantrolene enhances antisense-mediated exon skipping in human and mouse models of Duchenne muscular dystrophy. *Sci Transl Med* **4**, 164ra160 (2012).
  - Kervestin, S. & Jacobson, A. NMD: a multifaceted response to premature translational termination. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 700–712 (2012).
  - Khairallah, R. J. *et al.* Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. *Sci Signal* **5**, ra56 (2012).
  - Kim, J. *et al.* Intermuscular adipose tissue-free skeletal muscle mass: estimation by dual-energy X-ray absorptiometry in adults. *J. Appl. Physiol.* **97**, 655–660 (2004).
  - Kim, Y. K., Furic, L., Desgroseillers, L. & Maquat, L. E. Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* **120**, 195–208 (2005).
  - Kimura, E., Li, S., Gregorevic, P., Fall, B. M. & Chamberlain, J. S. Dystrophin delivery to muscles of mdx mice using lentiviral vectors leads to myogenic progenitor targeting and stable gene expression. *Mol. Ther.* **18**, 206–213 (2010).
  - King, W. M. *et al.* Orthopedic outcomes of long-term daily corticosteroid treatment in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology* **68**, 1607–1613 (2007).
  - Klamut, H. J., Bosnoyan-Collins, L. O., Worton, R. G. & Ray, P. N. A muscle-specific enhancer within intron 1 of the human dystrophin gene is functionally dependent on single MEF-1/E box and MEF-2/AT-rich sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1618–1625 (1997).
  - Klamut, H. J. *et al.* Myogenic regulation of dystrophin gene expression. *Br. Med. Bull.* **45**, 681–702 (1989).
  - Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. & Hocevar, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. *Toxicol Pathol* **38**, 96–109 (2010).
  - Kleopa, K. A., Drousiotou, A., Mavrikiou, E., Ormiston, A. & Kyriakides, T. Naturally occurring utrophin correlates with disease severity in Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1623–1628 (2006).
  - Klymiuk, N. *et al.* Dystrophin-deficient pigs provide new insights into the hierarchy of physiological derangements of dystrophic muscle. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 4368–4382 (2013).
  - Knipe, D. M. *et al.* Snapshots: chromatin control of viral infection. *Virology* **435**, 141–156 (2013).
  - Knöll, R. *et al.* The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell* **111**, 943–955 (2002).
  - Kobzik, L., Reid, M. B., Bredt, D. S. & Stamler, J. S. Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* **372**, 546–548 (1994).
  - Kocica, M. J. *et al.* The helical ventricular myocardial band: global, three-dimensional, functional architecture of the ventricular myocardium. *Eur J Cardiothorac Surg* **29 Suppl 1**, S21–40 (2006).
  - Koenig, M. *et al.* 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 (1987).
  - Koenig, M., Monaco, A. P. & Kunkel, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell* **53**, 219–228 (1988).
  - Koo, T. *et al.* Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med* **13**, 497–506 (2011).
  - Koo, T., Popplewell, L., Athanasopoulos, T. & Dickson, G. 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 (2014).
  - Korge, P. *et al.* Protective role of transient pore openings in calcium handling by cardiac mitochondria. *J. Biol. Chem.* **286**, 34851–34857 (2011).

- Kornegay, J. N., Tuler, S. M., Miller, D. M. & Levesque, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. *Muscle Nerve* **11**, 1056–1064 (1988).
- Kornegay, J. N. *et al.* Widespread muscle expression of an AAV9 human mini-dystrophin vector after intravenous injection in neonatal dystrophin-deficient dogs. *Mol. Ther.* **18**, 1501–1508 (2010).
- Kornegay, J. N. *et al.* Pharmacologic management of Duchenne muscular dystrophy: target identification and preclinical trials. *ILAR J* **55**, 119–149 (2014).
- Krumm, A., Hickey, L. B. & Groudine, M. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II defines a general rate-limiting step after transcription initiation. *Genes Dev.* **9**, 559–572 (1995).
- Kucherenko, M. M., Marrone, A. K., Rishko, V. M., Magliarelli, H. de F. & Shcherbata, H. R. Stress and muscular dystrophy: a genetic screen for dystroglycan and dystrophin interactors in *Drosophila* identifies cellular stress response components. *Dev. Biol.* **352**, 228–242 (2011).
- Köhl, U. *et al.* Role of muscle fibroblasts in the deposition of type-IV collagen in the basal lamina of myotubes. *Differentiation* **28**, 164–172 (1984).
- Kumar, A. & Boriek, A. M. Mechanical stress activates the nuclear factor-kappaB pathway in skeletal muscle fibers: a possible role in Duchenne muscular dystrophy. *FASEB J.* **17**, 386–396 (2003).
- Kuno, A. *et al.* Resveratrol improves cardiomyopathy in dystrophin-deficient mice through SIRT1 protein-mediated modulation of p300 protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 5963–5972 (2013).
- Kushmerick, M. J., Meyer, R. A. & Brown, T. R. Regulation of oxygen consumption in fast- and slow-twitch muscle. *Am. J. Physiol.* **263**, C598–606 (1992).

- L -

- Lai, Y. *et al.* 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 (2009).
- Lai, Y., Yue, Y., Liu, M. & Duan, D. Synthetic intron improves transduction efficiency of trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* **17**, 1036–1042 (2006).
- Lai, Y., Zhao, J., Yue, Y., Wasala, N. B. & Duan, D. Partial restoration of cardiac function with  $\Delta$ PDZ nNOS in aged mdx model of Duchenne cardiomyopathy. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3189–3199 (2014).
- Lange, S. *et al.* The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover. *Science* **308**, 1599–1603 (2005).
- Lapidos, K. A., Kakkar, R. & McNally, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ. Res.* **94**, 1023–1031 (2004).
- Larcher, T. *et al.* Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. *PLoS ONE* **9**, e110371 (2014).
- Latil, M. *et al.* Skeletal muscle stem cells adopt a dormant cell state post mortem and retain regenerative capacity. *Nat Commun* **3**, 903 (2012).
- Lee, S. *et al.* Global mapping of translation initiation sites in mammalian cells at single-nucleotide resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, E2424–2432 (2012).
- Lefaucheur, J. P., Pastoret, C. & Sebille, A. Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat. Rec.* **242**, 70–76 (1995).
- Léger, A. *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated transgene expression is independent of DNA methylation in primate liver and skeletal muscle. *PLoS ONE* **6**, e20881 (2011).
- Le Guiner, C. *et al.* 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 (2014).
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E. & Moore, M. J. The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.* **20**, 4987–4997 (2001).
- Le Hir, M. *et al.* AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. *Mol. Ther.* **21**, 1551–1558 (2013).
- Lehman, W., Rosol, M., Tobacman, L. S. & Craig, R. Troponin organization on relaxed and activated thin filaments revealed by electron microscopy and three-dimensional reconstruction. *J. Mol. Biol.* **307**, 739–744 (2001).
- Lemos, D. R. *et al.* Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated

- apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat. Med.* **21**, 786–794 (2015).
- Lentz, T. B. & Samulski, R. J. Insight into the mechanism of inhibition of adeno-associated virus by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *J. Virol.* **89**, 181–194 (2015).
  - Lepper, C., Partridge, T. A. & Fan, C.-M. An absolute requirement for Pax7-positive satellite cells in acute injury-induced skeletal muscle regeneration. *Development* **138**, 3639–3646 (2011).
  - Li, F., Wang, X., Capasso, J. M. & Gerdes, A. M. Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **28**, 1737–1746 (1996).
  - Li, H. *et al.* Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* **117**, 3311–3319 (2011).
  - Li, H. *et al.* Reverse engineering of the giant muscle protein titin. *Nature* **418**, 998–1002 (2002).
  - Li, W. *et al.* Engineering and selection of shuffled AAV genomes: a new strategy for producing targeted biological nanoparticles. *Mol. Ther.* **16**, 1252–1260 (2008).
  - Li, X., Eastman, E. M., Schwartz, R. J. & Draghia-Akli, R. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat. Biotechnol.* **17**, 241–245 (1999).
  - Li, Z., Marchand, P., Humbert, J., Babinet, C. & Paulin, D. Desmin sequence elements regulating skeletal muscle-specific expression in transgenic mice. *Development* **117**, 947–959 (1993).
  - Liadaki, K. *et al.*  $\beta 4$  integrin marks interstitial myogenic progenitor cells in adult murine skeletal muscle. *J. Histochem. Cytochem.* **60**, 31–44 (2012).
  - Lieberman, P. M. Chromatin organization and virus gene expression. *J. Cell. Physiol.* **216**, 295–302 (2008).
  - Light, N. & Champion, A. E. Characterization of muscle epimysium, perimysium and endomysium collagens. *Biochem J* **219**, 1017–1026 (1984).
  - Lin, C. *et al.* Cypher/ZASP is a novel A-kinase anchoring protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 29403–29413 (2013).
  - Liu, H. *et al.* TIMP3: a physiological regulator of adult myogenesis. *J. Cell. Sci.* **123**, 2914–2921 (2010).
  - Liu, J. *et al.* A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 93–95 (2014).
  - Liu, L. *et al.* Chromatin modifications as determinants of muscle stem cell quiescence and chronological aging. *Cell Rep* **4**, 189–204 (2013).
  - Liu, M. *et al.* Adeno-associated virus-mediated microdystrophin expression protects young mdx muscle from contraction-induced injury. *Mol. Ther.* **11**, 245–256 (2005).
  - Liu, S. *et al.* Setdb1 is required for germline development and silencing of H3K9me3-marked endogenous retroviruses in primordial germ cells. *Genes Dev.* **28**, 2041–2055 (2014).
  - Lostal, W., Kodippili, K., Yue, Y. & Duan, D. Full-length dystrophin reconstitution with adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* **25**, 552–562 (2014).
  - Lovric, J. *et al.* Terminal differentiation of cardiac and skeletal myocytes induces permissivity to AAV transduction by relieving inhibition imposed by DNA damage response proteins. *Mol. Ther.* **20**, 2087–2097 (2012).
  - Lu, L. *et al.* A Novel YY1-miR-1 regulatory circuit in skeletal myogenesis revealed by genome-wide prediction of YY1-miRNA network. *PLoS ONE* **7**, e27596 (2012).
  - Luff, A. R. & Atwood, H. L. Changes in the sarcoplasmic reticulum and transverse tubular system of fast and slow skeletal muscles of the mouse during postnatal development. *J. Cell Biol.* **51**, 369–383 (1971).
  - Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F. & Richmond, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
  - Lund, T. C., Grange, R. W. & Lowe, D. A. Telomere shortening in diaphragm and tibialis anterior muscles of aged mdx mice. *Muscle Nerve* **36**, 387–390 (2007).

- M -

- Maass, A. *et al.* Rational promoter selection for gene transfer into cardiac cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **35**, 823–831 (2003).
- Maelandsmo, G. M. *et al.* Use of a murine secreted alkaline phosphatase as a non-immunogenic reporter gene in mice. *J Gene Med* **7**, 307–315 (2005).
- Mah, C. *et al.* Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression. *J. Virol.* **72**, 9835–9843 (1998).

- Mahmoud, A. I. *et al.* Meis1 regulates postnatal cardiomyocyte cell cycle arrest. *Nature* **497**, 249–253 (2013).
- Majmundar, A. J. *et al.* O(2) regulates skeletal muscle progenitor differentiation through phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 36–49 (2012).
- Mal, A. K. Histone methyltransferase Suv39h1 represses MyoD-stimulated myogenic differentiation. *EMBO J.* **25**, 3323–3334 (2006).
- Mallouk, N., Jacquemond, V. & Allard, B. Elevated subsarcolemmal Ca<sup>2+</sup> in mdx mouse skeletal muscle fibers detected with Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 4950–4955 (2000).
- Mandon, E. C., Trueman, S. F. & Gilmore, R. Protein translocation across the rough endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).
- Manes, T., Glade, K., Ziomek, C. A. & Millán, J. L. Genomic structure and comparison of mouse tissue-specific alkaline phosphatase genes. *Genomics* **8**, 541–554 (1990).
- Manini, T. M. *et al.* Reduced physical activity increases intermuscular adipose tissue in healthy young adults. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 377–384 (2007).
- Manno, C. S. *et al.* Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med.* **12**, 342–347 (2006).
- Markham, L. W., Kinnett, K., Wong, B. L., Woodrow Benson, D. & Cripe, L. H. Corticosteroid treatment retards development of ventricular dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 365–370 (2008).
- Marshall, N. F. & Price, D. H. Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem.* **270**, 12335–12338 (1995).
- Martins, A. S., Shkryl, V. M., Nowycky, M. C. & Shirokova, N. Reactive oxygen species contribute to Ca<sup>2+</sup> signals produced by osmotic stress in mouse skeletal muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)* **586**, 197–210 (2008).
- Matera, A. G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 108–121 (2014).
- Mathew, S. J. *et al.* Connective tissue fibroblasts and Tcf4 regulate myogenesis. *Development* **138**, 371–384 (2011).
- Matsumura, K. *et al.* Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *J. Clin. Invest.* **92**, 866–871 (1993).
- Mauro, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* **9**, 493–495 (1961).
- Mays, L. E. *et al.* Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8<sup>+</sup> T cell response to vector encoded proteins. *J. Immunol.* **182**, 6051–6060 (2009).
- Mays, L. E. *et al.* AAV8 induces tolerance in murine muscle as a result of poor APC transduction, T cell exhaustion, and minimal MHCI upregulation on target cells. *Mol. Ther.* **22**, 28–41 (2014).
- McArdle, A., Pattwell, D., Vasilaki, A., Griffiths, R. D. & Jackson, M. J. Contractile activity-induced oxidative stress: cellular origin and adaptive responses. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **280**, C621–627 (2001).
- McDouall, R. M., Dunn, M. J. & Dubowitz, V. Nature of the mononuclear infiltrate and the mechanism of muscle damage in juvenile dermatomyositis and Duchenne muscular dystrophy. *J. Neurol. Sci.* **99**, 199–217 (1990).
- McGreevy, J. W., Hakim, C. H., McIntosh, M. A. & Duan, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis. Model. Mech.* **8**, 195–213 (2015).
- Megeney, L. A., Kablar, B., Garrett, K., Anderson, J. E. & Rudnicki, M. A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev.* **10**, 1173–1183 (1996).
- Méjat, A. *et al.* Histone deacetylase 9 couples neuronal activity to muscle chromatin acetylation and gene expression. *Nat. Neurosci.* **8**, 313–321 (2005).
- Melnick, J. L., Mayor, H. D., Smith, K. O. & Rapp, F. Association of 20-Millimicron Particles with Adenoviruses. *J Bacteriol* **90**, 271–274 (1965).
- Mendell, J. R. *et al.* Dystrophin immunity in Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1429–1437 (2010).
- Mendell, J. R. *et al.* Eteplirsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy. *Ann. Neurol.* **74**, 637–647 (2013).
- Mendell, J. R. *et al.* A phase 1/2a follistatin gene therapy trial for becker muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **23**, 192–201 (2015).
- Mendell, J. R. *et al.* Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne’s muscular dystrophy. *N. Engl. J. Med.* **320**, 1592–1597 (1989).
- Mercier, S. *et al.* Genetic and clinical specificity of 26 symptomatic carriers for dystrophinopathies at pediatric

- age. *Eur. J. Hum. Genet.* **21**, 855–863 (2013).
- Meryon, E. On Granular and Fatty Degeneration of the Voluntary Muscles. *Med Chir Trans* **35**, 73–84.1 (1852).
  - Meyer, K. D. & Jaffrey, S. R. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 313–326 (2014).
  - Millay, D. P. *et al.* Genetic and pharmacologic inhibition of mitochondrial-dependent necrosis attenuates muscular dystrophy. *Nat. Med.* **14**, 442–447 (2008).
  - Miller, D. G., Petek, L. M. & Russell, D. W. Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat. Genet.* **36**, 767–773 (2004).
  - Minetti, G. C. *et al.* Functional and morphological recovery of dystrophic muscles in mice treated with deacetylase inhibitors. *Nat. Med.* **12**, 1147–1150 (2006).
  - Mingozi, F. & High, K. A. Immune responses to AAV vectors: overcoming barriers to successful gene therapy. *Blood* **122**, 23–36 (2013).
  - Mitchell, K. J. *et al.* Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat. Cell Biol.* **12**, 257–266 (2010).
  - Mobley, C. M. & Sealy, L. Role of the transcription start site core region and transcription factor YY1 in Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter activity. *J. Virol.* **72**, 6592–6601 (1998).
  - Mobley, C. M. & Sealy, L. The Rous sarcoma virus long terminal repeat promoter is regulated by TFII-I. *J. Virol.* **74**, 6511–6519 (2000).
  - Mofarrah, M. *et al.* Regulation of proliferation of skeletal muscle precursor cells by NADPH oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 559–574 (2008).
  - Mokri, B. & Engel, A. G. Duchenne dystrophy: electron microscopic findings pointing to a basic or early abnormality in the plasma membrane of the muscle fiber. *Neurology* **25**, 1111–1120 (1975).
  - Montenegro-Miranda, P. S., Bloemendaal, L. ten, Kunne, C., de Waart, D. R. & Bosma, P. J. Mycophenolate mofetil impairs transduction of single-stranded adeno-associated viral vectors. *Hum. Gene Ther.* **22**, 605–612 (2011).
  - Moore, M. J. & Proudfoot, N. J. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* **136**, 688–700 (2009).
  - Morales, M. G. *et al.* Inhibition of the angiotensin-converting enzyme decreases skeletal muscle fibrosis in dystrophic mice by a diminution in the expression and activity of connective tissue growth factor (CTGF/CCN-2). *Cell Tissue Res.* **353**, 173–187 (2013).
  - Morine, K. J. *et al.* Activin IIB receptor blockade attenuates dystrophic pathology in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Muscle Nerve* **42**, 722–730 (2010).
  - Moulay, G., Masurier, C., Bigey, P., Scherman, D. & Kichler, A. Soluble TNF- $\alpha$  receptor secretion from healthy or dystrophic mice after AAV6-mediated muscle gene transfer. *Gene Ther.* **17**, 1400–1410 (2010).
  - Moulay, G., Boutin, S., Masurier, C., Scherman, D. & Kichler, A. Polymers for improving the in vivo transduction efficiency of AAV2 vectors. *PLoS ONE* **5**, e15576 (2010).
  - Mourikis, P. *et al.* A critical requirement for notch signaling in maintenance of the quiescent skeletal muscle stem cell state. *Stem Cells* **30**, 243–252 (2012).
  - Mousavi, K. *et al.* eRNAs promote transcription by establishing chromatin accessibility at defined genomic loci. *Mol. Cell* **51**, 606–617 (2013).
  - Moyes, C. D., Mathieu-Costello, O. A., Tsuchiya, N., Filburn, C. & Hansford, R. G. Mitochondrial biogenesis during cellular differentiation. *Am. J. Physiol.* **272**, C1345–1351 (1997).
  - Mukhopadhyay, D., Houchen, C. W., Kennedy, S., Dieckgraefe, B. K. & Anant, S. Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Mol. Cell* **11**, 113–126 (2003).
  - Murphy, M. M., Lawson, J. A., Mathew, S. J., Hutcheson, D. A. & Kardon, G. Satellite cells, connective tissue fibroblasts and their interactions are crucial for muscle regeneration. *Development* **138**, 3625–3637 (2011).
  - Murray, J. M. *et al.* Linkage relationship of a cloned DNA sequence on the short arm of the X chromosome to Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **300**, 69–71 (1982).

- N -

- Nakae, Y. *et al.* Subcutaneous injection, from birth, of epigallocatechin-3-gallate, a component of green tea,

- limits the onset of muscular dystrophy in mdx mice: a quantitative histological, immunohistochemical and electrophysiological study. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 489–501 (2008).
- Nakae, Y. *et al.* Early onset of lipofuscin accumulation in dystrophin-deficient skeletal muscles of DMD patients and mdx mice. *J. Mol. Histol.* **35**, 489–499 (2004).
  - Nakagawa, T. *et al.* Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* **434**, 652–658 (2005).
  - Nakamura, K. *et al.* Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system. *Sci Rep* **4**, 5635 (2014).
  - Nash, K., Chen, W., McDonald, W. F., Zhou, X. & Muzyczka, N. Purification of host cell enzymes involved in adeno-associated virus DNA replication. *J. Virol.* **81**, 5777–5787 (2007).
  - Nathwani, A. C. *et al.* Enhancing transduction of the liver by adeno-associated viral vectors. *Gene Ther.* **16**, 60–69 (2009).
  - Nathwani, A. C. *et al.* Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N. Engl. J. Med.* **371**, 1994–2004 (2014).
  - Nathwani, A. C. *et al.* 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 (2011).
  - Neary, M. T. *et al.* Hypoxia signaling controls postnatal changes in cardiac mitochondrial morphology and function. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **74**, 340–352 (2014).
  - Neguembor, M. V., Jothi, M. & Gabellini, D. Long noncoding RNAs, emerging players in muscle differentiation and disease. *Skelet Muscle* **4**, 8 (2014).
  - Nickless, A. *et al.* Intracellular calcium regulates nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Med.* **20**, 961–966 (2014).
  - Nishida, A. *et al.* Tissue- and case-specific retention of intron 40 in mature dystrophin mRNA. *J. Hum. Genet.* (2015). doi:10.1038/jhg.2015.24
  - Noguchi, S. *et al.* cDNA microarray analysis of individual Duchenne muscular dystrophy patients. *Hum. Mol. Genet.* **12**, 595–600 (2003).
  - Nonnenmacher, M. & Weber, T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther.* **19**, 649–658 (2012).
  - Nonnenmacher, M. & Weber, T. Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. *Cell Host Microbe* **10**, 563–576 (2011).
  - Nonnenmacher, M. E., Cintrat, J.-C., Gillet, D. & Weber, T. Syntaxin 5-dependent retrograde transport to the trans-Golgi network is required for adeno-associated virus transduction. *J. Virol.* **89**, 1673–1687 (2015).
  - Nowrouzi, A. *et al.* Integration frequency and intermolecular recombination of rAAV vectors in non-human primate skeletal muscle and liver. *Mol. Ther.* **20**, 1177–1186 (2012).
  - Nudel, U., Robzyk, K. & Yaffe, D. Expression of the putative Duchenne muscular dystrophy gene in differentiated myogenic cell cultures and in the brain. *Nature* **331**, 635–638 (1988).

- O -

- Ochala, J., Gokhin, D. S., Iwamoto, H. & Fowler, V. M. Pointed-end capping by tropomodulin modulates actomyosin crossbridge formation in skeletal muscle fibers. *FASEB J.* **28**, 408–415 (2014).
- Odom, G. L., Gregorevic, P., Allen, J. M., Finn, E. & Chamberlain, J. S. Microtrophin delivery through rAAV6 increases lifespan and improves muscle function in dystrophic dystrophin/utrophin-deficient mice. *Mol. Ther.* **16**, 1539–1545 (2008).
- Ohnishi, T. *et al.* Phosphorylation of hUPF1 induces formation of mRNA surveillance complexes containing hSMG-5 and hSMG-7. *Mol. Cell* **12**, 1187–1200 (2003).
- Okada, T. *et al.* A histone deacetylase inhibitor enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in tumor cells. *Mol. Ther.* **13**, 738–746 (2006).
- Otto, A. *et al.* Canonical Wnt signalling induces satellite-cell proliferation during adult skeletal muscle regeneration. *J. Cell. Sci.* **121**, 2939–2950 (2008).
- Ousterout, D. G. *et al.* Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun* **6**, 6244 (2015).

- Ousterout, D. G. *et al.* Correction of dystrophin expression in cells from duchenne muscular dystrophy patients through genomic excision of exon 51 by zinc finger nucleases. *Mol. Ther.* **23**, 523–532 (2015).

- P -

- Pacak, C. A., Conlon, T., Mah, C. S. & Byrne, B. J. Relative persistence of AAV serotype 1 vector genomes in dystrophic muscle. *Genet Vaccines Ther* **6**, 14 (2008).
- Pajusola, K. *et al.* Cell-type-specific characteristics modulate the transduction efficiency of adeno-associated virus type 2 and restrain infection of endothelial cells. *J. Virol.* **76**, 11530–11540 (2002).
- Palacios, D., Summerbell, D., Rigby, P. W. J. & Boyes, J. Interplay between DNA methylation and transcription factor availability: implications for developmental activation of the mouse Myogenin gene. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 3805–3815 (2010).
- Pallafacchina, G. *et al.* An adult tissue-specific stem cell in its niche: a gene profiling analysis of in vivo quiescent and activated muscle satellite cells. *Stem Cell Res* **4**, 77–91 (2010).
- Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M. R., Allen, D. D. & Brinster, R. L. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 478–482 (1991).
- Pan, Q., Shai, O., Lee, L. J., Frey, B. J. & Blencowe, B. J. Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* **40**, 1413–1415 (2008).
- Pannérec, A., Marazzi, G. & Sassoon, D. Stem cells in the hood: the skeletal muscle niche. *Trends Mol Med* **18**, 599–606 (2012).
- Pappas, C. T., Krieg, P. A. & Gregorio, C. C. Nebulin regulates actin filament lengths by a stabilization mechanism. *J. Cell Biol.* **189**, 859–870 (2010).
- Park, S. H. *et al.* CpG methylation modulates tissue-specific expression of a transgene in chickens. *Theriogenology* **74**, 805–816.e1 (2010).
- Partridge, T. A. The mdx mouse model as a surrogate for Duchenne muscular dystrophy. *FEBS J.* **280**, 4177–4186 (2013).
- Passamano, L. *et al.* Improvement of survival in Duchenne Muscular Dystrophy: retrospective analysis of 835 patients. *Acta Myol* **31**, 121–125 (2012).
- Pastoret, C. & Sebillé, A. Age-related differences in regeneration of dystrophic (mdx) and normal muscle in the mouse. *Muscle Nerve* **18**, 1147–1154 (1995).
- Pauly, M. *et al.* AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am. J. Pathol.* **181**, 583–592 (2012).
- Pearson, C. M. Histopathological features of muscle in the preclinical stages of muscular dystrophy. *Brain* **85**, 109–120 (1962).
- Penaud-Budloo, M. *et al.* Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J. Virol.* **82**, 7875–7885 (2008).
- Peng, Z. Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1016–1027 (2005).
- Pennisi, E. Genomics. ENCODE project writes eulogy for junk DNA. *Science* **337**, 1159, 1161 (2012).
- Percival, J. M. *et al.* rAAV6-microdystrophin rescues aberrant Golgi complex organization in mdx skeletal muscles. *Traffic* **8**, 1424–1439 (2007).
- Percival, J. M., Siegel, M. P., Knowels, G. & Marcinek, D. J. Defects in mitochondrial localization and ATP synthesis in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy are not alleviated by PDE5 inhibition. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 153–167 (2013).
- Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M. & Sweeney, H. L. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 3710–3714 (1993).
- Petronilli, V. *et al.* Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys. J.* **76**, 725–734 (1999).
- Piao, Y. J. *et al.* Nox 2 stimulates muscle differentiation via NF-kappaB/iNOS pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **38**, 989–1001 (2005).
- Pimorady-Esfahani, A., Grounds, M. D. & McMenamin, P. G. Macrophages and dendritic cells in normal and regenerating murine skeletal muscle. *Muscle Nerve* **20**, 158–166 (1997).

- Pinali, C. *et al.* Three-dimensional structure of the intercalated disc reveals plicate domain and gap junction remodeling in heart failure. *Biophys. J.* **108**, 498–507 (2015).
- Poon, E., Howman, E. V., Newey, S. E. & Davies, K. E. Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 3433–3439 (2002).
- Pope, A. J., Sands, G. B., Smaill, B. H. & LeGrice, I. J. Three-dimensional transmural organization of perimysial collagen in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **295**, H1243–H1252 (2008).
- Porrello, E. R. *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. *Science* **331**, 1078–1080 (2011).
- Porrua, O. & Libri, D. Transcription termination and the control of the transcriptome: why, where and how to stop. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 190–202 (2015).
- Prado, L. G. *et al.* Isoform diversity of giant proteins in relation to passive and active contractile properties of rabbit skeletal muscles. *J. Gen. Physiol.* **126**, 461–480 (2005).
- Puente, B. N. *et al.* The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. *Cell* **157**, 565–579 (2014).
- Puri, P. L. *et al.* Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis. *Mol. Cell* **8**, 885–897 (2001).
- Puri, P. L. *et al.* Differential roles of p300 and PCAF acetyltransferases in muscle differentiation. *Mol. Cell* **1**, 35–45 (1997).

- Q -

- Qiao, C. *et al.* 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 (2008).
- Qing, K. *et al.* Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines in vitro and transgenic mice in vivo. *J. Virol.* **77**, 2741–2746 (2003).
- Qing, K. *et al.* Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression. *J. Virol.* **75**, 8968–8976 (2001).
- Qing, K. *et al.* Role of tyrosine phosphorylation of a cellular protein in adeno-associated virus 2-mediated transgene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10879–10884 (1997).
- Quantin, B., Perricaudet, L. D., Tajbakhsh, S. & Mandel, J. L. Adenovirus as an expression vector in muscle cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2581–2584 (1992).
- Quinlan, J. G. *et al.* Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 491–496 (2004).

- R -

- Rabinowitz, J. E. *et al.* 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 (2002).
- Radley, H. G. & Grounds, M. D. Cromolyn administration (to block mast cell degranulation) reduces necrosis of dystrophic muscle in mdx mice. *Neurobiol. Dis.* **23**, 387–397 (2006).
- Ragot, T. *et al.* Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature* **361**, 647–650 (1993).
- Ramaswamy, K. S. *et al.* Lateral transmission of force is impaired in skeletal muscles of dystrophic mice and very old rats. *J. Physiol. (Lond.)* **589**, 1195–1208 (2011).
- Raper, S. E. *et al.* Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* **80**, 148–158 (2003).
- Rasmussen, E. B. & Lis, J. T. In vivo transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 7923–7927 (1993).
- Ravel-Chapuis, A., Vandromme, M., Thomas, J.-L. & Schaeffer, L. Postsynaptic chromatin is under neural control at the neuromuscular junction. *EMBO J.* **26**, 1117–1128 (2007).

- Rayment, I. *et al.* Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science* **261**, 58–65 (1993).
- Renault, V. *et al.* Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell* **1**, 132–139 (2002).
- Renjini, R., Gayathri, N., Nalini, A. & Srinivas Bharath, M. M. Oxidative damage in muscular dystrophy correlates with the severity of the pathology: role of glutathione metabolism. *Neurochem. Res.* **37**, 885–898 (2012).
- Richard, P. *et al.* Amphiphilic block copolymers promote gene delivery in vivo to pathological skeletal muscles. *Hum. Gene Ther.* **16**, 1318–1324 (2005).
- Rienks, M., Papageorgiou, A.-P., Frangogiannis, N. G. & Heymans, S. Myocardial extracellular matrix: an ever-changing and diverse entity. *Circ. Res.* **114**, 872–888 (2014).
- Riu, E., Chen, Z.-Y., Xu, H., He, C.-Y. & Kay, M. A. Histone modifications are associated with the persistence or silencing of vector-mediated transgene expression in vivo. *Mol. Ther.* **15**, 1348–1355 (2007).
- Rivera, V. M. *et al.* Long-term pharmacologically regulated expression of erythropoietin in primates following AAV-mediated gene transfer. *Blood* **105**, 1424–1430 (2005).
- Robey, T. E., Saiget, M. K., Reinecke, H. & Murry, C. E. Systems approaches to preventing transplanted cell death in cardiac repair. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **45**, 567–581 (2008).
- Rodgers, J. T. *et al.* mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G0 to G(Alert). *Nature* **510**, 393–396 (2014).
- Rodino-Klapac, L. R., Lee, J.-S., Mulligan, R. C., Clark, K. R. & Mendell, J. R. Lack of toxicity of alpha-sarcoglycan overexpression supports clinical gene transfer trial in LGMD2D. *Neurology* **71**, 240–247 (2008).
- Rodriguez, M. C. & Tamopolsky, M. A. Patients with dystrophinopathy show evidence of increased oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1217–1220 (2003).
- Romero, N. B. *et al.* Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* **15**, 1065–1076 (2004).
- Romitti, P. A. *et al.* Prevalence of Duchenne and Becker muscular dystrophies in the United States. *Pediatrics* **135**, 513–521 (2015).
- Rose, N. R. & Klose, R. J. Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 1362–1372 (2014).
- Rothbart, S. B. & Strahl, B. D. Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1839**, 627–643 (2014).
- Russell, D. W., Alexander, I. E. & Miller, A. D. DNA synthesis and topoisomerase inhibitors increase transduction by adeno-associated virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 5719–5723 (1995).
- Ryall, J. G. *et al.* The NAD(+)-dependent SIRT1 deacetylase translates a metabolic switch into regulatory epigenetics in skeletal muscle stem cells. *Cell Stem Cell* **16**, 171–183 (2015).
- Ryall, J. G. Metabolic reprogramming as a novel regulator of skeletal muscle development and regeneration. *FEBS J.* **280**, 4004–4013 (2013).
- Rybakova, I. N., Patel, J. R. & Ervasti, J. M. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J. Cell Biol.* **150**, 1209–1214 (2000).
- Rybalka, E., Timpani, C. A., Cooke, M. B., Williams, A. D. & Hayes, A. Defects in mitochondrial ATP synthesis in dystrophin-deficient mdx skeletal muscles may be caused by complex I insufficiency. *PLoS ONE* **9**, e115763 (2014).

- S -

- Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S. & Blau, H. M. Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature* **456**, 502–506 (2008).
- Sacco, A. *et al.* Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell* **143**, 1059–1071 (2010).
- Sainsbury, S., Bernecky, C. & Cramer, P. Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 129–143 (2015).
- Salva, M. Z. *et al.* Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol. Ther.* **15**, 320–329 (2007).
- Sambasivan, R. *et al.* Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration.

- Development* **138**, 3647–3656 (2011).
- Sander, M. *et al.* Functional muscle ischemia in neuronal nitric oxide synthase-deficient skeletal muscle of children with Duchenne muscular dystrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 13818–13823 (2000).
  - Sandström, M. E. *et al.* Role of reactive oxygen species in contraction-mediated glucose transport in mouse skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)* **575**, 251–262 (2006).
  - Sanlioglu, S. *et al.* Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J. Virol.* **74**, 9184–9196 (2000).
  - Sasse, P. *et al.* Perlecan is critical for heart stability. *Cardiovasc. Res.* **80**, 435–444 (2008).
  - Sato, P. Y. *et al.* Interactions between ankyrin-G, Plakophilin-2, and Connexin43 at the cardiac intercalated disc. *Circ. Res.* **109**, 193–201 (2011).
  - Savio-Galimberti, E. *et al.* Novel features of the rabbit transverse tubular system revealed by quantitative analysis of three-dimensional reconstructions from confocal images. *Biophys. J.* **95**, 2053–2062 (2008).
  - Schmidt, W. M. *et al.* DNA damage, somatic aneuploidy, and malignant sarcoma susceptibility in muscular dystrophies. *PLoS Genet.* **7**, e1002042 (2011).
  - Schnepf, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A. & Johnson, P. R. Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J. Virol.* **77**, 3495–3504 (2003).
  - Schoenauer, R. *et al.* Myomesin is a molecular spring with adaptable elasticity. *J. Mol. Biol.* **349**, 367–379 (2005).
  - Schulz, T. J. *et al.* Identification of inducible brown adipocyte progenitors residing in skeletal muscle and white fat. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 143–148 (2011).
  - Schwartz, R. A. *et al.* The Mre11/Rad50/Nbs1 complex limits adeno-associated virus transduction and replication. *J. Virol.* **81**, 12936–12945 (2007).
  - Schwerzmann, K., Hoppeler, H., Kayar, S. R. & Weibel, E. R. Oxidative capacity of muscle and mitochondria: correlation of physiological, biochemical, and morphometric characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1583–1587 (1989).
  - Scriven, D. R., Dan, P. & Moore, E. D. Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes. *Biophys. J.* **79**, 2682–2691 (2000).
  - Selsby, J. T., Morine, K. J., Pendrak, K., Barton, E. R. & Sweeney, H. L. Rescue of dystrophic skeletal muscle by PGC-1 $\alpha$  involves a fast to slow fiber type shift in the mdx mouse. *PLoS ONE* **7**, e30063 (2012).
  - Senyo, S. E. *et al.* Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature* **493**, 433–436 (2013).
  - Seto, E. & Yoshida, M. Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **6**, a018713 (2014).
  - Shan, X., Chang, Y. & Lin, C. G. Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression. *FASEB J.* **21**, 2753–2764 (2007).
  - Shan, X. & Lin, C.-L. G. Quantification of oxidized RNAs in Alzheimer’s disease. *Neurobiol. Aging* **27**, 657–662 (2006).
  - Shan, X., Tashiro, H. & Lin, C. G. The identification and characterization of oxidized RNAs in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci.* **23**, 4913–4921 (2003).
  - Sharp, N. J. *et al.* An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. *Genomics* **13**, 115–121 (1992).
  - Shcherbata, H. R. *et al.* Dissecting muscle and neuronal disorders in a Drosophila model of muscular dystrophy. *EMBO J.* **26**, 481–493 (2007).
  - Sheikh, F. *et al.* An FHL1-containing complex within the cardiomyocyte sarcomere mediates hypertrophic biomechanical stress responses in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 3870–3880 (2008).
  - Shimatsu, Y. *et al.* Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp. Anim.* **52**, 93–97 (2003).
  - Shin, J.-H., Bostick, B., Yue, Y., Hajjar, R. & Duan, D. SERCA2a gene transfer improves electrocardiographic performance in aged mdx mice. *J. Transl Med* **9**, 132 (2011).
  - Shin, J.-H. *et al.* Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of duchenne muscular dystrophy. *Mol. Ther.* **21**, 750–757 (2013).
  - Shkryl, V. M. *et al.* Reciprocal amplification of ROS and Ca(2+) signals in stressed mdx dystrophic skeletal muscle fibers. *Pflugers Arch.* **458**, 915–928 (2009).
  - Sicinski, P. *et al.* The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science* **244**, 1578–1580 (1989).
  - Simms, C. L., Hudson, B. H., Mosior, J. W., Rangwala, A. S. & Zaher, H. S. An active role for the ribosome in

- determining the fate of oxidized mRNA. *Cell Rep* **9**, 1256–1264 (2014).
- Simon, A. M., Hoppe, P. & Burden, S. J. Spatial restriction of AChR gene expression to subsynaptic nuclei. *Development* **114**, 545–553 (1992).
  - Sironi, M. *et al.* Trans-acting factors may cause dystrophin splicing misregulation in BMD skeletal muscles. *FEBS Lett.* **537**, 30–34 (2003).
  - Sironi, M. *et al.* The dystrophin gene is alternatively spliced throughout its coding sequence. *FEBS Lett.* **517**, 163–166 (2002).
  - Skelton, D., Satake, N. & Kohn, D. B. The enhanced green fluorescent protein (eGFP) is minimally immunogenic in C57BL/6 mice. *Gene Ther.* **8**, 1813–1814 (2001).
  - Snyder, R. O. *et al.* Efficient and stable adeno-associated virus-mediated transduction in the skeletal muscle of adult immunocompetent mice. *Hum. Gene Ther.* **8**, 1891–1900 (1997).
  - Song, M.-Y. *et al.* Sarcopenia and increased adipose tissue infiltration of muscle in elderly African American women. *Am. J. Clin. Nutr.* **79**, 874–880 (2004).
  - Song, S., Laipis, P. J., Berns, K. I. & Flotte, T. R. Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 4084–4088 (2001).
  - Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. & Kleinschmidt, J. A. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J. Virol.* **80**, 11040–11054 (2006).
  - Sonntag, F., Schmidt, K. & Kleinschmidt, J. A. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 10220–10225 (2010).
  - Sousa-Victor, P. *et al.* Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence. *Nature* **506**, 316–321 (2014).
  - Spamer, C. & Pette, D. Activity patterns of phosphofructokinase, glyceraldehydephosphate dehydrogenase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase in microdissected fast and slow fibres from rabbit psoas and soleus muscle. *Histochemistry* **52**, 201–216 (1977).
  - Spencer, M. J., Croall, D. E. & Tidball, J. G. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J. Biol. Chem.* **270**, 10909–10914 (1995).
  - Spencer, M. J., Montecino-Rodriguez, E., Dorshkind, K. & Tidball, J. G. Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. *Clin. Immunol.* **98**, 235–243 (2001).
  - Spurney, C. F. *et al.* Dystrophin-deficient cardiomyopathy in mouse: expression of Nox4 and Lox are associated with fibrosis and altered functional parameters in the heart. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 371–381 (2008).
  - Srivastava, A., Lusby, E. W. & Berns, K. I. Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* **45**, 555–564 (1983).
  - Stahnke, S. *et al.* Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles. *Virology* **409**, 77–83 (2011).
  - Stedman, H. H. *et al.* The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature* **352**, 536–539 (1991).
  - Steenken, S. & Jovanovic, S.V. How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 617–618 (1997).
  - Steinberg, S. F. Oxidative stress and sarcomeric proteins. *Circ. Res.* **112**, 393–405 (2013).
  - Stieger, K. *et al.* Long-term doxycycline-regulated transgene expression in the retina of nonhuman primates following subretinal injection of recombinant AAV vectors. *Mol. Ther.* **13**, 967–975 (2006).
  - Stieger, K. *et al.* Detection of intact rAAV particles up to 6 years after successful gene transfer in the retina of dogs and primates. *Mol. Ther.* **17**, 516–523 (2009).
  - Stienen, G. J., Kiers, J. L., Bottinelli, R. & Reggiani, C. Myofibrillar ATPase activity in skinned human skeletal muscle fibres: fibre type and temperature dependence. *J. Physiol. (Lond.)* **493** (Pt 2), 299–307 (1996).
  - Straub, V., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S. & Campbell, K. P. Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J. Cell Biol.* **139**, 375–385 (1997).
  - Strimpakos, G. *et al.* Novel adeno-associated viral vector delivering the utrophin gene regulator jazz counteracts dystrophic pathology in mdx mice. *J. Cell. Physiol.* **229**, 1283–1291 (2014).
  - Stroud, H., Feng, S., Morey Kinney, S., Pradhan, S. & Jacobsen, S. E. 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome Biol.* **12**, R54 (2011).
  - Su, L. T. *et al.* Uniform scale-independent gene transfer to striated muscle after transvenular extravasation of vector. *Circulation* **112**, 1780–1788 (2005).

- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N. & Price, B. D. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13182–13187 (2005).
- Sun, Y. *et al.* Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1376–1382 (2009).
- Szalai, G., Krishnamurthy, R. & Hajnóczky, G. Apoptosis driven by IP(3)-linked mitochondrial calcium signals. *EMBO J* **18**, 6349–6361 (1999).

- T -

- Taghli-Lamalle, O. *et al.* Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype. *Aging Cell* **7**, 237–249 (2008).
- Takemura, G. *et al.* Role of apoptosis in the disappearance of infiltrated and proliferated interstitial cells after myocardial infarction. *Circ. Res.* **82**, 1130–1138 (1998).
- Tanabe, Y., Esaki, K. & Nomura, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) mouse. *Acta Neuropathol.* **69**, 91–95 (1986).
- Tanaka, M., Chock, P. B. & Stadtman, E. R. Oxidized messenger RNA induces translation errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 66–71 (2007).
- Tateyama, M. *et al.* Oxidative stress and predominant Abeta42(43) deposition in myopathies with rimmed vacuoles. *Acta Neuropathol.* **105**, 581–585 (2003).
- Taveau, M. *et al.* Calpain 3 is activated through autolysis within the active site and lyses sarcomeric and sarcolemmal components. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9127–9135 (2003).
- Tennyson, C. N., Klamut, H. J. & Worton, R. G. The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat. Genet.* **9**, 184–190 (1995).
- Terragni, J. *et al.* Notch signaling genes: myogenic DNA hypomethylation and 5-hydroxymethylcytosine. *Epigenetics* **9**, 842–850 (2014).
- Territo, P. R., Mootha, V. K., French, S. A. & Balaban, R. S. Ca(2+) activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F(0)/F(1)-ATPase. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* **278**, C423–435 (2000).
- Tessarz, P. & Kouzarides, T. Histone core modifications regulating nucleosome structure and dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 703–708 (2014).
- Thanh, L. T., Nguyen, T. M., Helliwell, T. R. & Morris, G. E. Characterization of revertant muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, using exon-specific monoclonal antibodies against dystrophin. *Am. J. Hum. Genet.* **56**, 725–731 (1995).
- Tidball, J. G. & Villalta, S. A. Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **298**, R1173–1187 (2010).
- Tidball, J. G. & Law, D. J. Dystrophin is required for normal thin filament-membrane associations at myotendinous junctions. *Am. J. Pathol.* **138**, 17–21 (1991).
- Tinsley, J. *et al.* Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat. Med.* **4**, 1441–1444 (1998).
- Topisirovic, I., Svitkin, Y. V., Sonenberg, N. & Shatkin, A. J. Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2**, 277–298 (2011).
- Toromanoff, A. *et al.* Lack of immunotoxicity after regional intravenous (RI) delivery of rAAV to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther.* **18**, 151–160 (2010).
- Toromanoff, A. *et al.* Safety and efficacy of regional intravenous (r.i.) versus intramuscular (i.m.) delivery of rAAV1 and rAAV8 to nonhuman primate skeletal muscle. *Mol. Ther.* **16**, 1291–1299 (2008).
- Tratschin, J. D., West, M. H., Sandbank, T. & Carter, B. J. A human parvovirus, adeno-associated virus, as a eucaryotic vector: transient expression and encapsidation of the procaryotic gene for chloramphenicol acetyltransferase. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2072–2081 (1984).
- Trenz, F. *et al.* Increased microenvironment stiffness in damaged myofibers promotes myogenic progenitor cell proliferation. *Skelet Muscle* **5**, 5 (2015).
- Tsuboi, T. *et al.* Dom34:hbs1 plays a general role in quality-control systems by dissociation of a stalled ribosome at the 3' end of aberrant mRNA. *Mol. Cell* **46**, 518–529 (2012).
- Tureckova, J., Wilson, E. M., Cappalonga, J. L. & Rotwein, P. Insulin-like growth factor-mediated muscle differentiation: collaboration between phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-signaling pathways and myogenin. *J.*

*Biol. Chem.* **276**, 39264–39270 (2001).

- Turgeman, T. *et al.* Prevention of muscle fibrosis and improvement in muscle performance in the mdx mouse by halofuginone. *Neuromuscul. Disord.* **18**, 857–868 (2008).
- Turrina, A., Martínez-González, M. A. & Stecco, C. The muscular force transmission system: Role of the intramuscular connective tissue. *Journal of Bodywork and Movement Therapies* **17**, 95–102 (2013).

- U -

- Uaesoontrachoon, K. *et al.* Long-term treatment with naproxen significantly improves skeletal and cardiac disease phenotype in the mdx mouse model of dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3239–3249 (2014).
- Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S. & Tsuchida, K. Mesenchymal progenitors distinct from satellite cells contribute to ectopic fat cell formation in skeletal muscle. *Nat. Cell Biol.* **12**, 143–152 (2010).
- Uezumi, A. *et al.* Fibrosis and adipogenesis originate from a common mesenchymal progenitor in skeletal muscle. *J. Cell. Sci.* **124**, 3654–3664 (2011).

- V -

- Vakoc, C. R., Mandat, S. A., Olenchok, B. A. & Blobel, G. A. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 $\gamma$  are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell* **19**, 381–391 (2005).
- Valdmanis, P. N., Lisowski, L. & Kay, M. A. rAAV-mediated tumorigenesis: still unresolved after an AAV assault. *Mol. Ther.* **20**, 2014–2017 (2012).
- Valentine, B. A., Cooper, B. J., Cummings, J. F. & deLahunta, A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. *Acta Neuropathol.* **71**, 301–310 (1986).
- Valentine, B. A., Cooper, B. J., de Lahunta, A., O'Quinn, R. & Blue, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. *J. Neurol. Sci.* **88**, 69–81 (1988).
- Valentine, B. A. *et al.* Canine X-linked muscular dystrophy as an animal model of Duchenne muscular dystrophy: a review. *Am. J. Med. Genet.* **42**, 352–356 (1992).
- van Attikum, H. & Gasser, S. M. Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol.* **19**, 207–217 (2009).
- Vandebrouck, A. *et al.* Regulation of capacitative calcium entries by  $\alpha$ 1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of  $\alpha$ 1-syntrophin. *FASEB J.* **21**, 608–617 (2007).
- Vandebrouck, C., Martin, D., Colson-Van Schoor, M., Debaix, H. & Gailly, P. Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. *J. Cell Biol.* **158**, 1089–1096 (2002).
- Verhaart, I. E. C. *et al.* Prednisolone treatment does not interfere with 2'-O-methyl phosphorothioate antisense-mediated exon skipping in Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* **23**, 262–273 (2012).
- Verhaert, D., Richards, K., Rafael-Fortney, J. A. & Raman, S. V. Cardiac Involvement in Patients With Muscular Dystrophies Magnetic Resonance Imaging Phenotype and Genotypic Considerations. *Circ Cardiovasc Imaging* **4**, 67–76 (2011).
- Verrier, L., Escaffit, F., Chailleux, C., Trouche, D. & Vandromme, M. A new isoform of the histone demethylase JMJD2A/KDM4A is required for skeletal muscle differentiation. *PLoS Genet.* **7**, e1001390 (2011).
- Vianello, S. *et al.* Arginine butyrate per os protects mdx mice against cardiomyopathy, kyphosis and changes in axonal excitability. *Neurobiol. Dis.* **71**, 325–333 (2014).
- Vidal, B. *et al.* Fibrinogen drives dystrophic muscle fibrosis via a TGF $\beta$ /alternative macrophage activation pathway. *Genes Dev.* **22**, 1747–1752 (2008).
- Villalta, S. A., Nguyen, H. X., Deng, B., Gotoh, T. & Tidball, J. G. Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 482–496 (2009).
- Vincent, N. *et al.* Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat. Genet.* **5**, 130–134 (1993).
- Vincent-Lacaze, N. *et al.* Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal

- muscle. *J. Virol.* **73**, 1949–1955 (1999).
- Vliegen, H. W., van der Laarse, A., Cornelisse, C. J. & Eulderink, F. Myocardial changes in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. A study on tissue composition, polyploidization and multinucleation. *Eur. Heart J.* **12**, 488–494 (1991).
  - Voit, T. *et al.* 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 (2014).
  - Vulin, A. *et al.* Muscle function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. *Mol. Ther.* **20**, 2120–2133 (2012).

- W -

- Wang, B. *et al.* Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther.* **15**, 1489–1499 (2008).
- Wang, B., Li, J. & Xiao, X. 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 (2000).
- Wang, B., Li, J., Fu, F. H. & Xiao, X. Systemic human minidystrophin gene transfer improves functions and life span of dystrophin and dystrophin/utrophin-deficient mice. *J. Orthop. Res.* **27**, 421–426 (2009).
- Wang, M. *et al.* MUSEAP, a novel reporter gene for the study of long-term gene expression in immunocompetent mice. *Gene* **279**, 99–108 (2001).
- Wang, W. *et al.* Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* **134**, 279–290 (2008).
- Wang, Z. *et al.* Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol. Ther.* **15**, 1160–1166 (2007).
- Wang, Z. *et al.* Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat. Biotechnol.* **23**, 321–328 (2005).
- Watchko, J. *et al.* Adeno-associated virus vector-mediated minidystrophin gene therapy improves dystrophic muscle contractile function in mdx mice. *Hum. Gene Ther.* **13**, 1451–1460 (2002).
- Weber, M. *et al.* Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 457–466 (2007).
- Webster, C. & Blau, H. M. 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 (1990).
- Webster, C., Silberstein, L., Hays, A. P. & Blau, H. M. Fast muscle fibers are preferentially affected in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* **52**, 503–513 (1988).
- Wehling-Henricks, M. *et al.* Major basic protein-1 promotes fibrosis of dystrophic muscle and attenuates the cellular immune response in muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2280–2292 (2008).
- Wein, N. *et al.* Translation from a DMD exon 5 IRES results in a functional dystrophin isoform that attenuates dystrophinopathy in humans and mice. *Nat. Med.* **20**, 992–1000 (2014).
- Welch, E. M. *et al.* PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature* **447**, 87–91 (2007).
- Westenbroek, R. E. *et al.* Localization of sodium channel subtypes in mouse ventricular myocytes using quantitative immunocytochemistry. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **64**, 69–78 (2013).
- Whitehead, N. P., Pham, C., Gervasio, O. L. & Allen, D. G. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J. Physiol. (Lond.)* **586**, 2003–2014 (2008).
- Whitehead, N. P., Yeung, E. W., Froehner, S. C. & Allen, D. G. Skeletal muscle NADPH oxidase is increased and triggers stretch-induced damage in the mdx mouse. *PLoS ONE* **5**, e15354 (2010).
- Willems, I. E., Havenith, M. G., De Mey, J. G. & Daemen, M. J. The alpha-smooth muscle actin-positive cells in healing human myocardial scars. *Am. J. Pathol.* **145**, 868–875 (1994).
- Williams, I. A. & Allen, D. G. The role of reactive oxygen species in the hearts of dystrophin-deficient mdx mice. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **293**, H1969–1977 (2007).
- Willmann, R. *et al.* Enhancing translation: guidelines for standard pre-clinical experiments in mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* **22**, 43–49 (2012).
- Wilson, A. J., Schoenauer, R., Ehler, E., Agarkova, I. & Bennett, P. M. Cardiomyocyte growth and sarcomerogenesis at the intercalated disc. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 165–181 (2014).
- Wu, Z. *et al.* Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Mol. Ther.* **16**, 280–289 (2008).

- X -

- Xiao, P.-J., Li, C., Neumann, A. & Samulski, R. J. Quantitative 3D tracing of gene-delivery viral vectors in human cells and animal tissues. *Mol. Ther.* **20**, 317–328 (2012).
- Xiao, P.-J. & Samulski, R. J. Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network. *J. Virol.* **86**, 10462–10473 (2012).
- Xu, R., Chandrasekharan, K., Yoon, J. H., Camboni, M. & Martin, P. T. Overexpression of the cytotoxic T cell (CT) carbohydrate inhibits muscular dystrophy in the dyW mouse model of congenital muscular dystrophy 1A. *Am. J. Pathol.* **171**, 181–199 (2007).

- Y -

- Yablonka-Reuveni, Z. *et al.* The transition from proliferation to differentiation is delayed in satellite cells from mice lacking MyoD. *Dev. Biol.* **210**, 440–455 (1999).
- Yablonka-Reuveni, Z., Seger, R. & Rivera, A. J. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 23–42 (1999).
- Yablonka-Reuveni, Z. & Anderson, J. E. Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. *Dev. Dyn.* **235**, 203–212 (2006).
- Yang, Q. *et al.* AAV-based shRNA silencing of NF- $\kappa$ B ameliorates muscle pathologies in mdx mice. *Gene Ther.* **19**, 1196–1204 (2012).
- Yepiskoposyan, H., Aeschmann, F., Nilsson, D., Okoniewski, M. & Mühlemann, O. Autoregulation of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in human cells. *RNA* **17**, 2108–2118 (2011).
- Ylä-Herttuala, S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol. Ther.* **20**, 1831–1832 (2012).
- Yue, Y. & Dongsheng, D. Development of multiple cloning site cis-vectors for recombinant adeno-associated virus production. *BioTechniques* **33**, 672, 674, 676–678 (2002).

- Z -

- Zanotti, S. *et al.* Opposing roles of miR-21 and miR-29 in the progression of fibrosis in Duchenne muscular dystrophy. *Biochim. Biophys. Acta* **1852**, 1451–1464 (2015).
- Zemljic-Harpf, A. E. *et al.* Vinculin directly binds zonula occludens-1 and is essential for stabilizing connexin-43-containing gap junctions in cardiac myocytes. *J. Cell. Sci.* **127**, 1104–1116 (2014).
- Zentilin, L., Marcello, A. & Giacca, M. Involvement of cellular double-stranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome. *J. Virol.* **75**, 12279–12287 (2001).
- Zhang, C., Cheng, Y.-J., Chen, J., Wickline, S. & Wang, L. V. Label-free photoacoustic microscopy of myocardial sheet architecture. *J Biomed Opt* **17**, 060506 (2012).
- Zhang, J. *et al.* Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. *Am. J. Pathol.* **154**, 1423–1429 (1999).
- Zhang, Y. *et al.* Dual AAV therapy ameliorates exercise-induced muscle injury and functional ischemia in murine models of Duchenne muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3720–3729 (2013).
- Zhao, F., Li, P., Chen, S. R., Louis, C. F. & Fruen, B. R. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J. Biol. Chem.* **276**, 13810–13816 (2001).
- Zhao, J. *et al.* Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol. Cell* **40**, 939–953 (2010).
- Zhao, W., Wu, J., Zhong, L. & Srivastava, A. Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer: role of a cellular serine/threonine protein phosphatase in augmenting transduction efficiency. *Gene Ther.* **14**, 545–550 (2007).
- Zhou, L. *et al.* Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF- $\beta$ 1, 2, 3 and T $\beta$ RI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. *Neuromuscul. Disord.* **16**, 32–38 (2006).

- Zhou, V. W., Goren, A. & Bernstein, B. E. Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 7–18 (2011).
- Zincarelli, C., Soltys, S., Rengo, G. & Rabinowitz, J. E. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol. Ther.* **16**, 1073–1080 (2008).
- Zorov, D. B., Filburn, C. R., Klotz, L. O., Zweier, J. L. & Sollott, S. J. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes. *J. Exp. Med.* **192**, 1001–1014 (2000).
- Zubrzycka-Gaarn, E. E. *et al.* The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature* **333**, 466–469 (1988).

# Thèse de Doctorat

Jean-Baptiste DUPONT

## Pharmacologie moléculaire des vecteurs adéno-associés recombinants dans le muscle squelettique déficient en dystrophine

### Molecular pharmacology of recombinant adeno-associated vectors in Dystrophin-deficient skeletal muscles

#### Résumé

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie neuromusculaire héréditaire causée par des mutations dans le gène codant pour la Dystrophine. L'absence de cette protéine dans les cellules musculaires entraîne un ensemble de perturbations mécaniques et métaboliques menant à leur dégénérescence progressive. En l'absence de traitement curatif, la thérapie génique s'est imposée récemment comme une stratégie prometteuse, notamment grâce à l'utilisation de vecteurs recombinants dérivés du virus Adéno-Associé (AAV). Toutefois, les bénéfices à long terme d'une telle stratégie demeurent inconnus, et certaines études menées chez des modèles animaux de la DMD suggèrent que l'expression du transgène n'est que transitoire. En parallèle, le devenir moléculaire de ces vecteurs une fois administrés in vivo dans les muscles déficients en Dystrophine reste un domaine encore relativement inexploré. Il pourrait toutefois être profondément modifié compte-tenu du remodelage cellulaire et tissulaire s'opérant dans les muscles dystrophiques. La première étape de ce travail a consisté à quantifier la baisse d'efficacité des vecteurs AAVr dans le muscle murin déficient en Dystrophine. Dans un second temps, nous avons identifié les facteurs susceptibles d'agir négativement sur la stabilité des génomes et des ARNm transgéniques. Enfin, nous avons exploré une stratégie alternative combinant la thérapie génique à un traitement pharmacologique pertinent pour tenter de contourner ces facteurs de restriction. À terme, une telle approche pourrait permettre d'optimiser les protocoles de thérapie génique utilisant des vecteurs AAVr, qui seront prochainement appliqués chez les patients DMD.

**Mots clés :** dystrophie musculaire de Duchenne, thérapie génique, vecteurs AAVr, pharmacologie moléculaire, stress oxydatif, ARN, épigénétique, souris mdx

#### Abstract

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a neuromuscular disease caused by mutations in the gene encoding the Dystrophin protein. In the absence of Dystrophin, muscle cells endure a variety of mechanical and metabolic perturbations, progressively leading to their degeneration. With no curative treatment to date, gene therapy emerged recently as a promising strategy, notably thanks to the use of recombinant vectors derived from the Adeno-Associated Virus (rAAV). Nonetheless, the long term benefits of this strategy are controversial, and recent studies conducted in DMD animal models suggest that transgene expression is only transient. In parallel, rAAV vector molecular fate following administration in Dystrophin-deficient muscles remains almost entirely unexplored. However, it could be deeply modified given the cell and tissue remodeling observed in dystrophic muscles. The work presented in this PhD manuscript aims to decipher the consequences of the absence of Dystrophin on rAAV vector efficiency and long term persistence. In the first place, this work consisted in the quantification of rAAV vector efficiency in murine Dystrophin-deficient muscles. Then, we identified restriction factors with potential negative impacts on the stability of rAAV vector genomes and transgene mRNA. Finally, we explored an alternative strategy combining gene therapy with a relevant pharmacological treatment with the aim to counteract these restriction factors. In the end, this kind of approach may help optimize future rAAV-mediated gene therapy protocols to be subsequently applied in DMD patients.

**Key Words:** Duchenne Muscular Dystrophy, gene therapy, rAAV vectors, molecular pharmacology, oxidative stress, RNA, epigenetic, mdx mice