

CHRISTOPHE PICHAVANT

**THÉRAPIE GÉNIQUE DE LA DYSTROPHIE
MUSCULAIRE DE DUCHENNE**
Utilisation de transgènes de la dystrophine chez le modèle canin

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

© Christophe Pichavant, 2010

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique qui touche environ 1 garçon sur 3500. Cette pathologie liée au chromosome X est caractérisée par l'absence de dystrophine au niveau des muscles. Ce manque de dystrophine fragilise le sarcolemme des fibres musculaires menant à une faiblesse progressive du muscle. Les patients décèdent généralement dans la vingtaine et il n'y a pas à l'heure actuelle de traitement curatif pour cette maladie.

Une approche pour restaurer la dystrophine chez le patient DMD est d'introduire un transgène codant pour cette protéine dans ses muscles. Cela peut être fait par thérapie génique et particulièrement par la thérapie génique *ex vivo* et l'électroporation. Bien que ces deux techniques aient fait leurs preuves dans différents modèles animaux, elles n'ont jamais été utilisées chez le chien dystrophique alors que c'est le modèle le plus proche de la DMD en termes de phénotype. Deux versions de la dystrophine de chien ont été utilisées dans nos expériences : une version pleine longueur et une autre plus petite afin qu'elle puisse être incluse dans un lentivirus. La transplantation de myoblastes génétiquement modifiés par ce lentivirus (thérapie génique *ex vivo*) nous a permis d'obtenir l'expression de micro-dystrophine dans les muscles des souris immunodéficientes greffées. Néanmoins, l'autotransplantation de myoblastes de chien génétiquement modifiés a mené à un rejet spécifique des cellules greffées. L'électroporation, c.-à-d. l'injection de plasmide suivie d'un choc électrique, a également été utilisée pour introduire ce transgène ainsi que celui de la dystrophine pleine longueur dans des muscles de souris et de chien. Ces deux transgènes furent retrouvés avec succès chez la souris et le chien. Cependant, des infiltrations de cellules de l'immunité spécifique furent retrouvées au niveau des fibres exprimant le transgène chez le chien (pour l'utilisation de micro-dystrophine) et chez le chien dystrophique (pour la dystrophine pleine longueur).

Bien que les résultats obtenus avec la thérapie génique *ex vivo* et l'électroporation soient très bons chez la souris, ceux obtenus chez le chien sont plus modérés. Il reste donc encore beaucoup d'améliorations à apporter à ces deux méthodes avant qu'elles puissent être utilisées comme approche thérapeutique dans le cadre de la DMD.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy is a genetic disease affecting 1 out of every 3500 boys. This X-linked pathology is characterised by the absence of dystrophin in myofibers. This lack of dystrophin leads to a progressive muscular degeneration. DMD patients die between 17 and 30 years of age. There are currently no curative treatments for this disease.

An approach to restore dystrophin in DMD patients is to introduce a transgene coding for this protein into their muscles. This can be done by gene therapy, particularly by *ex vivo* gene therapy or by electroporation. Even if these 2 techniques have shown good results in mouse models, they have not been used in the dystrophic dog.

Two different isoforms of the dystrophin were used in our experiments: the full length dog dystrophin and a shorter version, the dog micro-dystrophin, introduced in a lentivirus backbone. Myoblasts were transduced with this lentivirus and transplanted successfully in immunodeficient mouse. However, the autotransplantation of genetically modified dog myoblasts led to a specific rejection of the grafted cells. A non viral gene therapy (electroporation, i.e., injection of a plasmid followed by a sequence of electric pulses) was used to introduce these two different isoforms of dystrophin in mouse and (normal and dystrophic) dog muscles. The two transgenes were electroporated with success in these muscles. However, a specific immune response was found in some myofibers expressing the transgene in the normal dog (using micro-dystrophin) and in the dystrophic dog (using full length dystrophin).

Although the results obtained with the *ex vivo* gene therapy and with the electroporation were relatively effective in the mouse model, those obtained with the dog model were much lower. Thus, lots of improvements remain to be made in order to consider these two techniques as potential approaches to restore dystrophin in a large animal model and eventually in DMD patients.

Avant-propos

Ma passion pour la recherche à commencer dès l'an 2000 avec mes premières années universitaires en France. Après être allé faire un stage en Finlande, je suis arrivé à Québec en 2004. Dès lors, j'ai été baigné dans la dystrophie musculaire de Duchenne. C'est une maladie dure car son évolution est rapide et qu'il n'existe pas encore de traitement. Cependant, il faut garder espoir et la recherche est là pour ça.

Durant ces six dernières années, la passion de mon directeur de recherche, le Dr. Jacques P. Tremblay, m'a souvent insufflé à poursuivre avec véhémence mon travail. Il arrive toujours avec plein d'idées tout en étant très ouvert à d'autres idées, les plus incongrues qui soient. J'ai beaucoup appris à ses côtés que ça soit du point de vue des connaissances ou de la façon de mener un projet de recherche. Être à son contact a donc été très enrichissant.

Bien que le directeur du laboratoire joue un rôle très important dans le laboratoire, l'équipe avec laquelle on travaille en est toute aussi importante. Durant les 6 années passées dans le laboratoire de Jacques P. Tremblay, j'ai eu la chance de côtoyer de nombreux autres étudiants tels que Lionel Stéphan, Simon Quenneville, Jean-Christophe Dominique, Philippe Mills, Yann Lamarre ou Manaf Bouchentouf avec qui j'ai eu de très bons contacts que ce soit du point de vue professionnel ou personnel. Je tiens particulièrement à remercier Lionel, qui en plus d'être un ami d'enfance de plus de 20 ans, m'a coaché à mes débuts et m'a fait mieux connaître le Québec. Je tiens également à remercier Simon qui a été mon mentor lorsque j'ai commencé à travailler en thérapie génique. En plus des étudiants, j'ai beaucoup apprécié Joël Rousseau pour son côté « naturel », et Pierre Chapdelaine qui m'a énormément appris sur la construction des plasmides et à prendre du recul sur mes expériences. J'ai aussi beaucoup apprécié Daniel Skuk pour sa connaissance du tissu musculaire et pour les nombreuses discussions qu'on a eues ensemble.

Je tiens également à remercier mes amis qui sont encore en France que ce soit Matthieu, Catherine, Éric, Kévin ou Alan (pour ne citer qu'eux) pour leurs joies de vivre et leurs encouragements. Merci finalement à ma femme Mina et à ma famille.

*« Attendre d'en savoir assez pour agir en toute lumière,
c'est se condamner à l'inaction. »*

Jean Rostand

Table des matières

Introduction	1
Chapitre 1 : Muscle squelettique	2
1.1 Embryogenèse.....	2
1.2 Structure.....	4
1.3 Types de fibres.....	6
1.3.1 Fibre de type I.....	6
1.3.2 Fibre de type IIb	7
1.3.3 Fibre de type IIa	7
1.4 Régénération musculaire.....	8
1.4.1 Dégénérescence musculaire	8
1.4.2 Régénérescence musculaire.....	9
1.5 Cellules satellites	10
1.5.1 À l'état de quiescence	10
1.5.2 En prolifération.....	12
1.5.3 En différenciation	13
Chapitre 2 : La dystrophie musculaire de Duchenne	14
2.1 Bref historique	14
2.2 Pathologie	15
2.3 Dystrophine.....	16
2.3.1 Origine.....	16
2.3.2 Embryologie.....	17
2.3.3 Fonction.....	17
2.3.4 Protéines associées à la dystrophine.....	19
2.3.5 Mutations	20
2.4 En absence de dystrophine.....	21
2.4.1 Complexe dystrophine – glycoprotéines	21
2.4.2 Régénération musculaire dans le cadre de la DMD.....	21
2.5 Modèles animaux.....	22
2.5.1 Souris	22
2.5.2 Chiens	25
2.5.3 Chats.....	26
2.6 Traitement actuel de la DMD	27
Chapitre 3 : Approche pharmacologique	29
3.1 Approches curatives.....	29
3.1.1 À partir d'un bris d'ADN.....	29
3.1.2 Le « read through » de codon stop	30
3.1.3 Molécules permettant le saut d'exon	31
3.2 Autres approches.....	35
3.2.1 Myostatine.....	35

3.2.2 <i>Utrophine</i>	36
Chapitre 4 : Approche cellulaire	37
4.1 À partir du sang.....	38
4.1.1 <i>Cellules AC133+</i>	38
4.2 À partir des vaisseaux	38
4.2.1 <i>Mésoangioblastes</i>	38
4.2.2 <i>Péricytes</i>	39
4.3 À partir de la moelle	39
4.3.1 <i>Cellules souches hématopoïétiques</i>	39
4.3.2 <i>Cellules souches mésenchymateuses</i>	40
4.4 À partir du muscle.....	41
4.4.1 <i>La transplantation de myoblastes</i>	41
4.4.2 <i>Essais cliniques</i>	42
4.4.3 <i>Mort précoce</i>	43
4.4.4 <i>Faible migration / Capacité de fusion</i>	44
4.4.5 <i>Rejet immunitaire spécifique</i>	45
Chapitre 5 : Approche génique	47
5.1 Les isoformes de la dystrophine	47
5.2 Thérapie génique virale	49
5.2.1 <i>Les vecteurs viraux</i>	49
5.2.2 <i>Résultats obtenus dans le cadre de la DMD</i>	56
5.3 Thérapie génique non virale	61
5.3.1 <i>Vecteur non viral</i>	61
5.3.2 <i>Injection d'ADN nu</i>	62
5.3.3 <i>Méthodes chimiques</i>	63
5.3.4 <i>Méthodes physiques</i>	64
Chapitre 6 : Projet de thèse.....	67
6.1 Problématique	67
6.2 Hypothèses de travail.....	67
6.3 Objectifs.....	68
Résultats	69
Chapitre 7 : Expression de micro-dystrophine de chien dans des muscles de souris et de chien par thérapie génique.....	69
Résumé.....	70
Abstract.....	72
Introduction.....	73
Results.....	75
<i>In vitro expression of the dog micro-dystrophin</i>	75
<i>Electrotransfer of the μDysV5 plasmid into mouse muscles</i>	75
<i>LeMCK.μDysV5-transduced hMPCs grafted in mouse muscles</i>	76
<i>Influence of donor's age in the success of dog MPC transplantation in mice</i>	76

<i>Immortalization and LeMCK.μDysV5 transduction of dystrophic dog MPCs</i>	76
<i>Transplantation of LeMCK.μDysV5-transduced dystrophic dog MPCs in mice</i>	77
<i>Electrotransfer of the pLeMCK.μdysV5 into dog muscles</i>	77
Discussion	79
Material and methods.....	83
<i>Animals</i>	83
<i>Cell culture</i>	83
<i>Lentiviral plasmid construction</i>	84
<i>Virus production</i>	84
<i>Cell transplantation in mice</i>	85
<i>Electrotransfer</i>	85
<i>Western blot and histological analysis</i>	86
Acknowledgments	87
References.....	88
Figure Legends	91
Figures	94

Chapitre 8 : Électroporation de la dystrophine de chien pleine longueur dans des muscles de souris et de chien dystrophique..... 102

Résumé.....	103
Abstract.....	105
Introduction.....	106
Materials and Methods.....	108
<i>Animals</i>	108
<i>Construct of the full length dog dystrophin plasmid</i>	108
<i>Sequence analysis</i>	110
<i>Cell culture</i>	110
<i>Plasmid transfection</i>	110
<i>Electrotransfer</i>	111
<i>Histological analysis</i>	112
Results.....	113
<i>The full length dog dystrophin plasmid</i>	113
<i>In vitro expression of dog dystrophin</i>	113
<i>Electrotransfer in Rag-/- mdx mouse muscles</i>	114
<i>Restoration of α-sarcoglycan in electrotransferred mouse muscles</i>	115
<i>Electrotransfer in dystrophic dog muscles</i>	115
Discussion	116
Acknowledgments	121
References.....	122
Figure Legend	126
Figures	128
Tables.....	133

Conclusion..... 135

Chapitre 9 : Discussion / Conclusion..... 135

9.1 Thérapie génique <i>ex vivo</i> dans le cadre de la DMD	135
9.1.1 Inconvénients	135
9.1.2 Avantages.....	135
9.1.3 Nos résultats	136
9.2 Électroporation dans le cadre de la DMD.....	137
9.2.1 Inconvénients	137
9.2.2 Avantages.....	138
9.2.3 Nos résultats	138
9.3 Optimisation des méthodes utilisées.....	140
9.3.1 Thérapie génique <i>ex vivo</i>	140
9.3.2 Électroporation.....	140
9.4 Conclusion générale.....	141
Bibliographie	143

Liste des abréviations

μDYS : micro-dystrophine

AAV : Virus associées aux adénovirus

AO : Oligonucléotide anti-sens

ATP : Adénosine TriPhosphate

bFGF : basic Fibroblast Growth Factor

BMD : Dystrophie musculaire de Becker

cPPT : central PolyPurine Track

DGC : Complexe dystrophine – glycoprotéines

DMD : Dystrophie musculaire de Duchenne

FLDYS : Dystrophine pleine longueur

GRMD : Golden Retriever Muscular Dystrophy

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIV-1 : Virus de l'immunodéficience humaine de type 1

HSC : Cellule souche hématopoïétique

IGF : Insulin Growth Factor

IL : Interleukine

IN : Intégrase

ITR : Inverted Terminal Repeat

LIF : Leukemia Inhibitory Factor

LTR : Long Terminal Repeat

MCK : Muscle Creatine Kinase

mDYS : mini-dystrophine

MGF : Mechanical Growth Factor

MSC : Cellule souche mésenchymateuse

NES : Signal d'exportation nucléaire

NLS : Nuclear Localization Signal

nNOS : Oxyde nitrique synthétase neuronale

PBS : Primer Binding Site

PRO : Protéase

PTD : Protein Transduction Domain

RRE : Séquence dépendante de Rev

RT : Transcriptase inverse

SIN : Self-INactivating

SP : Side Population

Ta : *Tibialis anterior*

TAR : Région active de transactivation

TAT : Trans-Activator of Transcription

TGF : Tumor Growth factor

TNF : Tumor Necrosis Factor

TR : Terminal Repeat

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VSV-G : Vesicular Stomatitis Virus – G glycoprotein

WPRES : Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element

ZFN : Zinc Finger Nuclease

ZN : Zone nécrosée

Liste des figures

Figure 1 : Embryogenèse du muscle squelettique.

Figure 2 : Structure du muscle squelettique.

Figure 3 : Structure détaillée d'une fibre musculaire.

Figure 4 : Muscle en régénération.

Figure 5 : Différenciation asymétrique d'une cellule satellite.

Figure 6 : Photographies de patients DMD.

Figure 7 : Immunohistochimie contre la dystrophine.

Figure 8 : La dystrophine.

Figure 9 : Dégénérescence musculaire et la DMD.

Figure 10 : Représentation schématique du saut d'exon thérapeutique chez un patient DMD où l'exon 50 est manquant.

Figure 11 : Principaux AOs utilisés dans le cadre de la DMD.

Figure 12 : Origine des principales cellules utilisées en thérapie cellulaire dans le cadre de la DMD.

Figure 13 : Illustration des 3 principaux problèmes rencontrés lors de la greffe de myoblastes.

Figure 14 : Versions tronquées de la dystrophine.

Figure 15 : Génome du HIV-1.

Figure 16 : Cycle du HIV-1.

Figure 17 : Production du lentivirus.

Figure 18 : Thérapie génique *ex vivo*.

Figure 19 : Électroporation dans un muscle.

Introduction

Le muscle est un tissu essentiel de notre organisme. On en compte environ 650 chez l'Homme. Ceux-ci sont impliqués dans de nombreux rôles biologiques tels que la mobilité, la respiration ou la digestion. Les muscles composent environ 40 à 45 % de notre masse corporelle (à titre de comparaison, nos os en composent 12 %) et ils sont eux-mêmes composés de 80 % d'eau. Ils existent trois types de muscles : les muscles lisses, le muscle strié cardiaque et les muscles striés squelettiques. Cette thèse focalise particulièrement sur les muscles squelettiques. Ces muscles assurent entre autres les fonctions de locomotion et de posture d'une personne, celles de la préhension et de la manipulation d'objets mais sont aussi essentiels à la fonction respiratoire, à la mobilité de notre œil et à bien d'autres rôles encore. Le muscle squelettique est donc un tissu très important qui mérite qu'on s'y attarde.

Chapitre 1 : Muscle squelettique

1.1 Embryogenèse

Chez les vertébrés, le muscle squelettique est formé à partir du mésoderme paraxial. Brièvement, lors de l'embryogenèse, ce mésoderme se différencie en somites (voir Figure 1). La partie ventrale des somites, le sclérotome contribuera aux cartilages et aux os tandis que la partie dorsale, le dermomyotome, sera impliquée dans la formation du tissu conjonctif et des muscles squelettiques. Par la suite, les cellules mésenchymateuses du dermomyotome situées du côté ventrolatérale donneront les myotomes alors que les autres évolueront en dermatomes. Ensuite, les cellules du myotome hypaxial migreront et formeront les muscles des membres alors que celles du myotome épaxial établiront la musculature du tronc [1]. De nombreux facteurs interviennent dans ces différenciations.

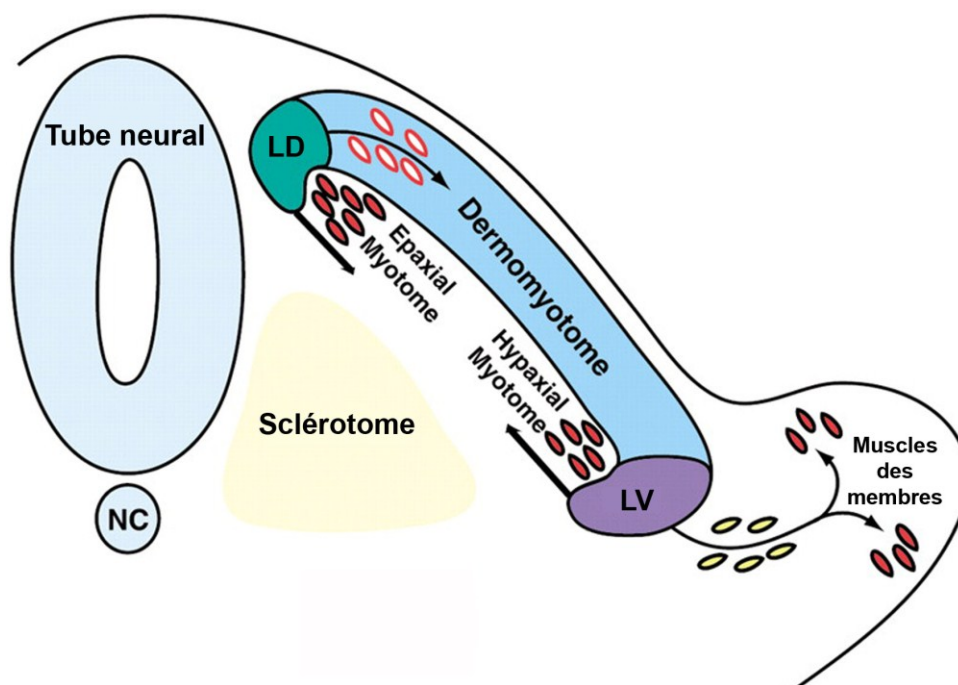


Figure 1 : Embryogenèse du muscle squelettique. Le tissu musculaire est originaire des somites situés de part et d'autre du tube neural et de la notochorde (NC). Les cellules de la lèvre dorsale (LD) donneront les muscles du tronc alors que celles de la lèvre ventrale (LV) donneront ceux des membres. Modifiée de Pownall *et al.* [2].

Des signaux Wnt émis par l'ectoderme axial permettent l'activation de la protéine kinase C qui active elle-même la transcription d'un membre de la famille des facteurs de transcription « Paired Box » Pax3 [3]. Ce dernier est impliqué dans la formation des membres à partir du myotome hypaxial. En effet, on observe une absence des muscles des membres dans des souris Pax3^{-/-} [4]. Un autre membre de la famille des « Paired Box », Pax7, est lui aussi important dans la formation des muscles car on observe une réduction de la masse musculaire des souris Pax7^{-/-}. Ces souris meurent au bout de trois semaines [5]. On considère que Pax3 et Pax7 jouent des rôles précurseurs dans la formation des muscles. Pax3 semble plus impliqué dans l'embryogenèse du muscle alors que Pax7 l'est plus dans la régénération d'un muscle déjà formé. En activant Lbx1 et c-Met, Pax3 permet ainsi la migration des cellules du myotome vers les membres [1]. Lorsque celles-ci arriveront au niveau des membres, elles exprimeront Myf5 et MyoD, eux aussi activés par Pax3.

Ces facteurs de transcription sont importants pour le développement des muscles puisqu'en absence de ceux-ci, aucun muscle ne peut se former chez la souris [6]. Bien qu'aucune anomalie musculaire n'ait été observée dans des souris uniquement déficientes en Myf5, celles-ci meurent peu après leurs naissances due à une absence de formation de leurs côtes [7]. Quant aux souris MyoD^{-/-}, elles ont un développement musculaire normal et sont totalement viables mais présentent un niveau plus élevé de Myf5 [8]. Cela démontre bien que MyoD et Myf5 ont des rôles redondants dans la formation des muscles squelettiques même si la complémentarité n'est pas toujours totale [9]. Comme Myf5 apparaît plus tôt chez la souris que MyoD, il semble donc qu'il est plus impliqué dans la myogenèse que MyoD [10].

Lorsque Myf5 et MyoD sont activés, ils activent à leur tour d'autres facteurs. Parmi ceux-ci, il y a Mox2 [11] qui est nécessaire au bon développement des muscles des membres mais aussi Mrf4 et myogénine qui sont impliqués dans la différenciation terminale des myotubes [12]. Après la formation du muscle, il reste des cellules en état de latence appelées cellules satellites situées sous la lame basale des muscles, qui permettront la régénérescence du muscle lorsque celui-ci sera endommagé [13]. A la fin du processus

myogénique, le muscle sera composé de fibres musculaires matures tels que décrit dans la prochaine section.

1.2 Structure

Le muscle est recouvert de tissu conjonctif nommé fascia. Le fascia superficiel sépare le muscle de la peau et est composé de tissu conjonctif et de tissu adipeux permettant le passage des nerfs et des vaisseaux sanguins de l'extérieur à l'intérieur du muscle. Le fascia profond est lui plus dense et recouvre entièrement le muscle. Il existe trois autres couches de tissu conjonctif qui assurent aussi un rôle de protection du muscle (voir Figure 2). La première qui est accolée au fascia profond et qui entoure tout le muscle est l'épimysium. S'en suit le péri-mysium qui entoure des faisceaux de 10 à 100 fibres musculaires distinctes qui sont elles-mêmes séparées les unes des autres par l'endomysium. Le prolongement de l'épimysium, du péri-mysium et de l'endomysium peuvent former conjointement via leurs fibres de collagène un tendon permettant de fixer le muscle à l'os.

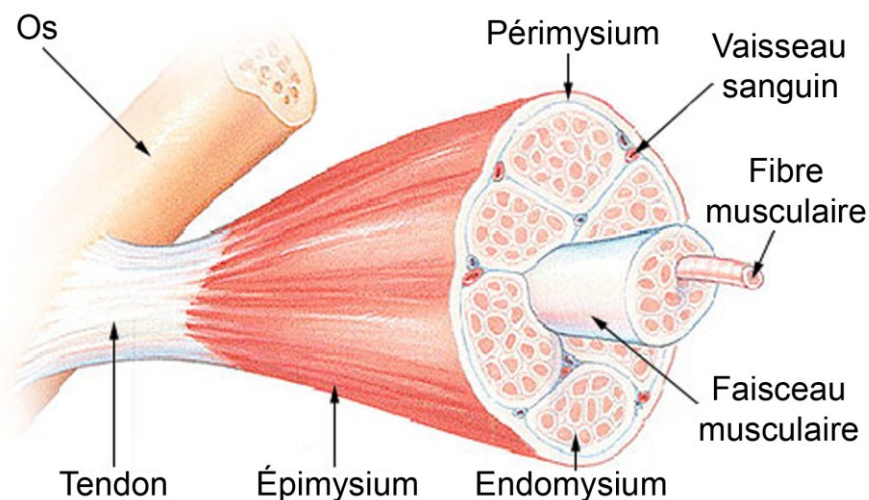


Figure 2 : Structure du muscle squelettique. Un muscle squelettique est composé de différents faisceaux musculaires, eux-mêmes constitués de plusieurs fibres musculaires. Le maintien du muscle est assuré par trois couches de tissu conjonctif : l'épimysium, le péri-mysium et l'endomysium.

La taille des fibres musculaires est variable ; toutefois, elle n'excède jamais la longueur totale du muscle où elles sont situées. Leurs diamètres varient de 10 à 100 μm . Une fibre

musculaire peut être considérée comme une cellule très allongée et cylindrique contenant de nombreux noyaux situés en périphérie résultant de la fusion de nombreuses cellules myogéniques (voir Figure 3). Son cytoplasme est nommé sarcoplasme et sa membrane cellulaire, le sarcolemme. Ce dernier est en contact avec la matrice extracellulaire de l'endomysium via la lame basale. Le sarcoplasme contient entre autres des réserves de glycogène et des mitochondries mais surtout les myofibrilles qui sont les protéines contractiles du muscle représentant environ 80 % du volume des fibres musculaires.

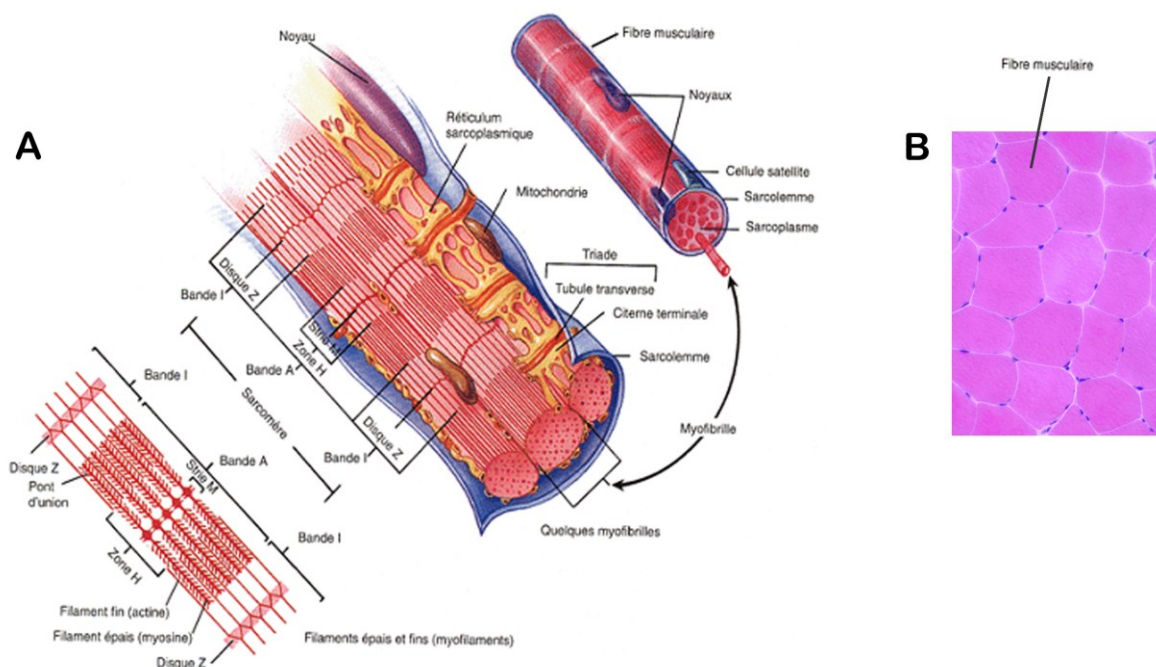


Figure 3 : Structure détaillée d'une fibre musculaire. (A) Une fibre musculaire est composée de plusieurs noyaux, d'un cytoplasme (sarcoplasme) et est délimitée par une membrane plasmique (sarcolemme). Dans son sarcoplasme, on y retrouve de nombreux myofilaments qui sont agencés les uns avec les autres dans des structures prédéfinies nommées sarcomères. (B) Hématoxyline-éosine (HE) d'une coupe transverse d'un muscle sain. On remarque d'ailleurs que les noyaux des fibres musculaires sont accolés au sarcolemme.

Les myofibrilles sont principalement constituées de myofilaments fins et épais. Ces derniers sont composés de molécules de myosine alors que les myofilaments fins sont constitués de l'assemblage de 3 types de protéines : l'actine, la tropomyosine et la troponine. Les molécules d'actine se polymérisent entre elles pour donner deux molécules d'actine filamenteuse enroulées en double hélice qui sont elles-mêmes associées à une

double hélice de deux unités de tropomyosine. La dernière protéine, la troponine, est associée à la fois à l'actine et à la tropomyosine. Lorsqu'on observe des fibres musculaires au microscope (voir figure 3), on y détecte tout au long de celles-ci des enchaînements de bandes claires I et de bandes sombres A. On distingue aussi un disque Z dans les bandes I, et une bande H avec en son milieu une ligne M, dans la bande A. La zone située entre deux disques Z est nommée sarcomère. La bande I est constituée de myofilaments fins de part et d'autre de la strie Z. La bande A est constituée de l'association des deux types de myofilaments et la bande H uniquement de myofilaments épais. La ligne M correspond à la région d'association de filaments épais dans 2 directions diamétralement opposées. Outre les molécules déjà nommées, il faut également mentionner la titine qui va du disque Z à la ligne M. Cette immense protéine de 3000 kDa possède une grande propriété élastique qui lui permet d'assurer la stabilité du sarcomère via ses interactions avec l'actine et la myosine. Une autre molécule essentielle à la stabilité des sarcomères est la desmine qui est une protéine de filament intermédiaire. Dans le sarcoplasme de la fibre musculaire, on note aussi la présence du réticulum sarcoplasmique, réservoir de Ca^{2+} nécessaire à la contraction des myofibrilles. Celle-ci résulte du rapprochement des myofilaments fins vers la ligne M via les têtes de myosines présentes le long des myofilaments épais. Malgré le fait que toutes les fibres musculaires sont composées de myofilaments fins et épais, il en existe différents types selon leur vitesse de contraction et leur endurance.

1.3 Types de fibres

Il existe de nombreuses nomenclatures pour classifier les types de fibres musculaires selon leurs caractéristiques distinctes. Ces dernières ont été passées en revue pour n'en garder que les plus importantes afin de rendre cette partie brève et concise (voir [14] pour revue).

1.3.1 Fibre de type I

C'est une fibre riche en capillaires et en mitochondries. Elle se contracte lentement et est très résistante à la fatigue. Elle est dite également « rouge » car elle contient de grandes quantités de myoglobines qui donnent ainsi cette couleur rouge à la fibre. Comme sa réserve en triglycérides est forte et qu'elle possède de nombreuses mitochondries, cela présage que son métabolisme est de type oxydatif. Dans le corps humain, les fibres de type

I se retrouvent principalement dans la composition des muscles de la posture. À l'un effort physique, ces fibres sont particulièrement sollicitées lors d'activités aérobies comme la course de fond ou le marathon.

1.3.2 Fibre de type IIb

A l'inverse de la fibre de type I, celle de type IIb est pauvre en mitochondries et en capillaires mais possède de fortes réserves d'ATP et de glycogène. Ces caractéristiques indiquent que son métabolisme est de type glycolytique. Cette fibre peut se contracter très rapidement et générer une grande force. Par contre, du fait qu'elle ne possède pas de capacité oxydante, elle se fatigue très rapidement. Elle est dite également « blanche » car elle contient de faibles quantités de myoglobines. Lors d'un effort physique, ces fibres sont sollicitées lors d'activités anaérobies brèves comme pour le « 100 mètres » en athlétisme.

1.3.3 Fibre de type IIa

Ce type de fibre est une sorte d'hybride entre la fibre de type I et celle de type IIb. En effet, elle est presque aussi riche en capillaires et en mitochondries que celle du type I mais possède également de bonnes quantités d'ATP et de glycogène. Sa capacité de contraction est rapide mais pas autant que celle des fibres de type IIb et sa résistance à la fatigue est élevée mais n'égale pas celle des fibres de type I. Ces caractéristiques font d'elle une fibre à métabolisme oxydatif. Elle est de couleur rouge à cause de ses réserves en myoglobines. Les fibres de type IIa sont impliquées dans des efforts nécessitant une certaine résistance comme lors d'un « 400 mètres » ou d'un « 1000 mètres » en athlétisme. Cependant, elles ne sont pas suffisamment puissantes pour un « 100 mètres », ni assez durantes pour un « 10000 mètres ».

La répartition initiale des types de fibres dans un muscle donné dépend de 2 critères. Le premier critère est la fonction du muscle. Par exemple, les muscles de la posture sont essentiellement composés de fibres de type I. Par contre, les muscles impliqués dans la course sont principalement composés de fibres de type II. Le deuxième facteur est

génétique, en effet, la proportion de tel ou tel type de fibre est prédéfinie pour chaque individu. Par la suite, cette composition va être modifiée au fil du temps. L'entraînement peut permettre l'augmenter l'endurance des différents types de fibre mais en aucun cas d'en changer le type. De ce fait, on ne transformera jamais un Percheron en un cheval d'obstacles. L'âge est aussi un facteur influençant la proportion des types de fibres musculaires tout comme il l'est aussi sur la vascularisation du muscle en général ou son métabolisme. Voir [15] pour une description plus précise des effets de l'entraînement et de l'âge sur les fibres musculaires squelettiques.

1.4 Dégénérescence et régénérescence musculaire

Une des particularités du muscle est l'absence de mitose dans les fibres musculaires [16]. Leurs noyaux ne sont donc pas non plus sujets au raccourcissement des télomères lié ordinairement à la sénescence [17]. Malgré cela, le tissu musculaire squelettique possède une grande capacité de régénération face aux dommages qui lui sont portés et cela grâce aux cellules satellites. Nous allons maintenant nous attarder sur les processus de dégénérescence et de régénération musculaire.

1.4.1 Dégénérescence musculaire

Cette phase commence lorsqu'il y a rupture de la fibre musculaire. Suite à ce dégât, il y aura une vasodilatation des artéioles et une augmentation de la perméabilité vasculaire menant à un hématome au niveau du site d'impact. Cette brèche permet aussi l'entrée massive de Ca^{2+} dans la fibre endommagée provoquant ainsi sa nécrose. Cette zone nécrosée sera nommée ZN tout au long de notre exposé. Cette dernière reste cependant localisée car une structure de myofilaments hyper-contractés permet d'isoler la portion de fibre endommagée du reste de la fibre [18]. Cette nécrose s'accompagne aussi par l'activation de cellules mononuclées. Ce sont les neutrophiles qui s'infiltrèrent les premiers au site de blessure [19], ils y arrivent une à six heures après le dégât. Il y a principalement deux rôles qui leur sont attribués. Le premier est leur capacité de phagocytose permettant ainsi de nettoyer les débris nécrotiques [20] et donc d'aider au processus régénératif. Leur second rôle est d'amplifier la réponse inflammatoire via la sécrétion de cytokines pro-

inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF- α [21] contribuant ainsi à une sorte de second dommage. En effet, la perte de perméabilité suite à un dommage musculaire est moins importante dans les muscles de souris dépourvues de neutrophiles que dans des muscles contrôles [22]. Toutefois, la sécrétion des cytokines permet aussi le recrutement des macrophages environ 24 heures plus tard.

1.4.2 Régénérescence musculaire

Le rôle des macrophages est important pour la régénérescence de la fibre musculaire. Il en existe différents types (chez le rat) ayant chacun leur fonction lors d'un bris musculaire [23]. Les macrophages ED1⁺ auraient plus un rôle de phagocytose permettant ainsi la continuité du nettoyage des débris déjà entrepris par les neutrophiles. Les ED2⁺ auraient eux plus un rôle de sécrétion de facteurs anti-inflammatoires : cytokines, chemokines et facteurs de croissance. En plus de cela, la matrice extracellulaire contient aussi de nombreux facteurs de croissance sous formes inactives qui seront libérés et activés lors du bris. Tous ces facteurs ont pour but de faciliter la réparation de la fibre musculaire en activant les cellules satellites mais aussi de remodeler le sarcoplasme et promouvoir l'angiogenèse [24].

Voyons maintenant les différentes phases de régénération et de remodelage du muscle en fonction du temps [25, 26]. Au jour 3, tous les débris nécrotiques du sarcoplasme ont disparu, les fibroblastes sécrètent beaucoup de collagène au niveau de la ZN et les cellules satellites commencent à s'activer et à proliférer via les divers facteurs de croissance libérés. Au jour 5, les neutrophiles ont complètement disparus, les cellules satellites fusionnent avec les fibres endommagées et le tissu conjonctif devient plus épais au niveau de la ZN. Au jour 7, le tissu conjonctif s'amincit et le remodelage de la lame basale commence de part et d'autre de la ZN. Au jour 14, la fibre endommagée a fini de se refermer mais le tissu conjonctif est encore bien présent. Au jour 21, les fibres musculaires sont alignées comme elles l'étaient auparavant et le tissu conjonctif n'est plus que très fin. Un marqueur histologique d'une fibre en régénération est la présence de noyau(x) au centre de celle-ci, on dit alors que la fibre est centronucléée (voir Figure 4). Pendant le processus de régénération, il ne faut pas oublier qu'il y a aussi reconstruction du système vasculaire par

angiogénèse. On considère que 21 jours après une blessure importante, le muscle a fini de se régénérer.

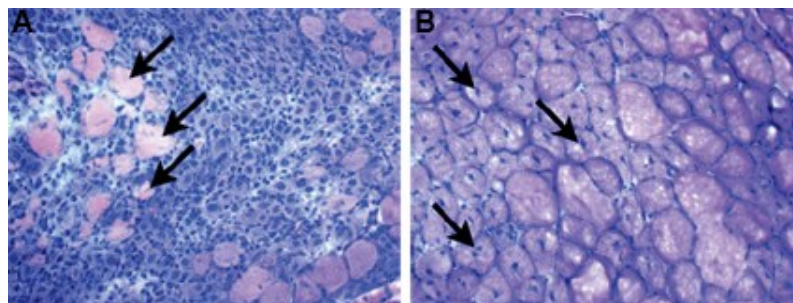


Figure 4 : Muscle en régénération. **A** et **B** sont des HE de muscles biopsiés respectivement 4 et 10 jours après un dommage. (A) La nécrose modifie rapidement la structure du muscle (comparer cette figure avec la figure 3B). (B) L'activation des cellules satellites et leurs fusions avec les fibres endommagées va permettre la régénération de ces fibres. Les flèches noires montrent des fibres musculaires centronucléées, signe qu'elles sont en régénération. Modifiée de Chargé *et al.* [27].

1.5 Cellules satellites

Les cellules satellites ont été mises en évidence en 1961 [13] et sont essentielles à la régénération du muscle tout comme à sa croissance post-natale. Elles sont localisées entre la lame basale et le sarcolemme des fibres musculaires, et sont en état de quiescence. Une illustration montrant la différenciation d'une cellule satellite est présentée dans la figure 5.

1.5.1 À l'état de quiescence

Un des marqueurs caractéristiques des cellules satellites est Pax7 qui fait partie de la famille de transcription « Paired Box ». Nous avons déjà vu que celui-ci était important pour le développement du muscle au stade embryonnaire mais il semble qu'il le soit aussi pour la formation des cellules satellites. En effet, une étude a montré que les souris Pax7^{-/-} ne possédaient aucune cellule satellite [28]. Cependant, quatre ans plus tard (en 2004), une autre étude plus minutieuse mit en évidence quelques cellules satellites dans ces mêmes souris et démontra que Pax7 était en fait impliqué dans la survie des cellules satellites [29]. Une étude plus récente utilisant des souris Pax7 sous un promoteur inducible au tamoxifène a apporté de nouveaux éléments pour la fonction de ce gène [30]. Lorsque l'expression de Pax7 est réprimée à la naissance des souris, on observe le même phénotype

que celui des souris Pax7^{-/-} précédemment utilisées, soit une absence de croissance musculaire et l'impossibilité du muscle à se régénérer suite à un bris. Cependant, lorsque l'expression n'est arrêtée que 3 semaines après la naissance des souris, leurs muscles montrent une croissance et une régénération musculaire identique à des souris contrôles. Cela semble indiquer qu'après cette période, le rôle de Pax7 est moins important pour les cellules satellites. Une étude a aussi mis en évidence le rôle de Pax7 dans les myoblastes, ce terme est utilisé lorsqu'une cellule satellite sort de sa quiescence et commence à proliférer. En effet, en absence de Pax7, les capacités myogéniques et prolifératives des myoblastes sont diminuées fortement. Pax7 reste tout de même un marqueur de choix caractéristique des cellules satellites car il est présent dans toutes ces cellules, ce qui n'est pas le cas de Pax3 [31]. En effet, selon l'origine du muscle, celui-ci est présent ou absent [1, 32]. Il semble donc que son rôle dans les cellules satellites est mineur mais essentiel pour l'embryogenèse du muscle comme vu précédemment. Hormis la famille des Pax, les cellules satellites sont aussi caractérisées par d'autres marqueurs chez la souris tels que M-cadhérine [33], c-met [34] et CD34 [35] (voir [36] pour une liste plus complète). Pour ce qui est de l'humain, il y a moins d'information disponible mais il semble que CD56 est un bon marqueur des cellules satellites [37]. Myf5 est également un marqueur d'intérêt pour ces cellules. En effet, environ 90 % des cellules satellites exprimant Pax7 expriment aussi Myf5 [38]. Les 10 % de cellules qui n'expriment pas Myf5 contribueraient comme réservoir de cellules satellites et celles qui sont Myf5⁺ contribueraient à la réparation du muscle. Autrement dit, les cellules Pax7⁺ Myf5⁺ sont mises à contribution lors de dégâts importants au muscle qu'ils soient d'origine accidentelle ou pathologique alors que les cellules Pax7⁺ Myf5⁻ servent à maintenir le pool de cellules satellites. Il a été également démontré qu'une cellule Pax7⁺ Myf5⁻ pouvait se différencier de façon asymétrique donnant ainsi une cellule Pax7⁺ Myf5⁻ et une autre Pax7⁺ Myf5⁺. Cette notion de division asymétrique a été reprise plusieurs fois et est maintenant acceptée [36, 39, 40].

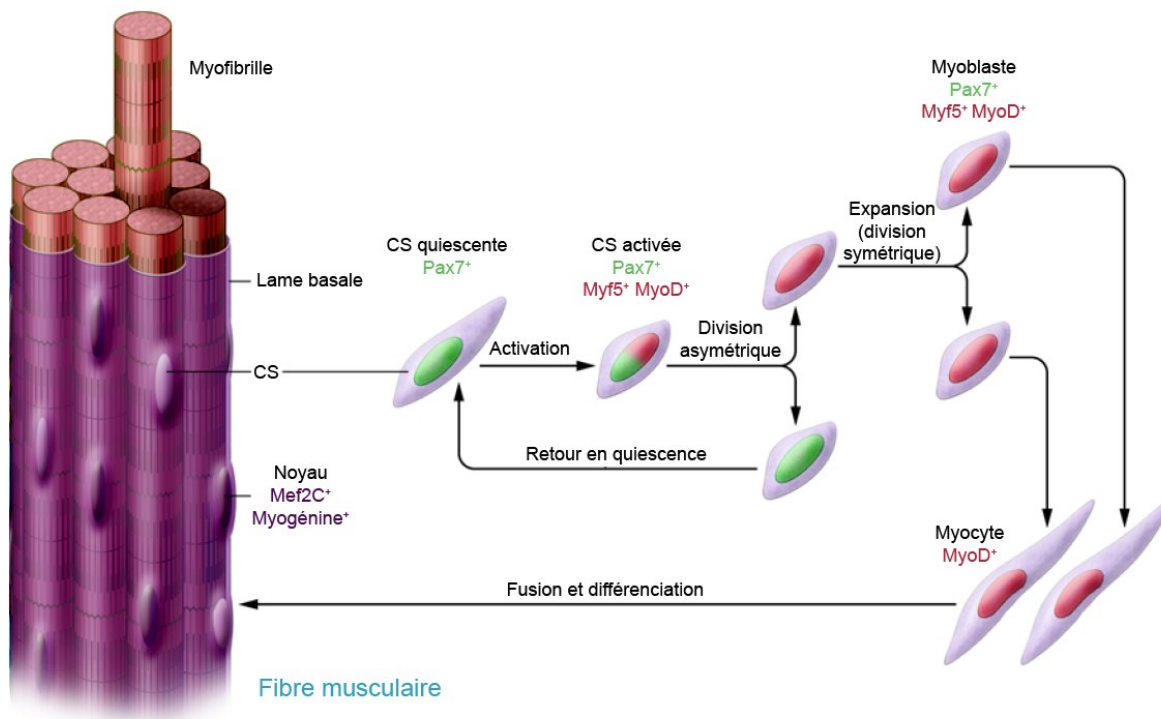


Figure 5 : Différenciation asymétrique d'une cellule satellite. Suite à l'activation d'une cellule satellite, elle se divise de façon asymétrique ; donnant d'une part une cellule Pax7⁺ MyoD⁺ Myf5⁺ qui contribuera à la réparation du muscle et d'autre part une autre cellule exprimant seulement Pax7 qui retournera en quiescence afin de maintenir le pool des cellules satellites. Modifiée de Tedesco *et al.* [36].

1.5.2 En prolifération

Lorsque les cellules satellites sont stimulées suite à un bris musculaire, elles s'activent et commencent à proliférer, et ce, de façon importante. En effet, il a été démontré que la quantité de cellules satellites activées pouvait être multipliée par 7 dans des conditions de bris musculaire [41]. De nombreux facteurs provenant de diverses origines peuvent influencer le comportement des cellules satellites (voir [42] pour une liste exhaustive). Un élément important dans l'activation de ces cellules est l'invasion de cellules mononuclées dans le muscle suite au processus inflammatoire. Rendues au site inflammatoire, ces cellules vont sécréter de nombreux facteurs tels que le TGF- β , l'IL6 ou le LIF qui ont un rôle activateur sur les cellules satellites [43]. Lorsque ces dernières sont activées, elles sécrètent des facteurs autocrines [44], comme le HGF, favorisant ainsi leurs propres proliférations. Ces cellules vont toujours exprimer Pax7 mais aussi MyoD et Myf5 de

manière plus ou moins forte [34] semblant indiquer plusieurs lignées myogéniques [45, 46]. Si l'expression de Myf5 est plus forte que celle de MyoD dans des myoblastes, cela favoriserait leur prolifération et retarderait leur différenciation ; alors que l'inverse favoriserait une différenciation rapide des myoblastes [39].

1.5.3 En différenciation

Lorsque le myoblaste arrive au niveau de la fibre musculaire endommagée, il se différencie en myocyte. On observe alors à ce moment un pic d'expression de MyoD suivi d'une augmentation de myogénine puis une diminution progressive de MyoD et de Myf5 [47]. Le myocyte va alors se fusionner avec la fibre endommagée et continuera d'exprimer la myogénine ainsi que Mef2C [48].

Nous avons vu que l'étude des cellules satellites est un domaine de recherche très actif. Ces travaux ont démontré qu'il y a différents types de cellules satellites suivant leur expression ou non de Myf5 : cellules satellites souches (Myf5⁻) ou cellules satellites myogéniques (Myf5⁺). Au stade de myoblastes, il existe aussi une distinction entre ceux qui expriment fortement soit MyoD soit Myf5. La caractérisation des marqueurs moléculaires des cellules satellites et de leurs descendants ne cesse d'évoluer et probablement que dans les années à venir d'avantage de marqueurs de ces cellules seront connus.

Chapitre 2 : La dystrophie musculaire de Duchenne

Une maladie neuromusculaire est caractérisée par une atteinte de l'unité motrice. Cette dernière se compose d'un motoneurone et des fibres musculaires qu'il innerve, le nombre de fibres varie de moins d'une dizaine à plusieurs milliers selon les muscles. L'atteinte de l'unité motrice entraîne des désordres physiologiques plus ou moins graves selon la pathologie à laquelle elle est associée. Une de ces pathologies est la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).

2.1 Bref historique

Plusieurs descriptions succinctes de pathologies ressemblant à la DMD furent probablement faites dès 1830 mais pas suffisamment détaillées sur le plan pathologique pour conclure qu'elles relataient la DMD telle qu'on la connaît aujourd'hui. Il va falloir attendre 1851, en Angleterre, pour avoir une description précise par Meyron de 10 enfants affectées par cette maladie [49]. En 1858, un français du nom de Duchenne voit son premier cas clinique de la DMD et y fait une brève description 3 ans plus tard [50]. En 1865, il est le premier à obtenir une biopsie musculaire faite sur un patient vivant grâce à son « emporte pièce histologique ». En 1868, il présente ses observations détaillées de 13 cas de patients DMD [51]. Malgré le fait qu'il ne soit pas le premier à avoir décrit la DMD, il y présente une version bien plus complète et précise que celle de Meyron. Ces observations histologiques étaient plus exactes grâce à sa méthode d'obtention des biopsies, il caractérisait plus la maladie comme pseudo-hypertrophique et non comme hypertrophique, et évoquait aussi la désorganisation du tissu musculaire mise en évidence par la présence de tissu fibreux, de tissu adipeux et de fibres de différentes tailles. D'autres observations viendront de Gowers, un autre anglais, une dizaine d'années plus tard. Il décrit particulièrement la manière et les différentes positions que prend un enfant dystrophique qui veut se mettre debout à partir d'une position allongée [52]. La première description d'un patient dystrophique dans la littérature américaine se fait plus tard qu'en Europe, en 1870 au Boston Children's Hospital [53].

Malgré le fait que Meyron fut la première personne à mentionner des cas d'enfants dystrophiques, l'histoire a retenu le nom de Duchenne pour identifier cette maladie mais l'attribution de ce nom et pas celui de Meyron fait encore jaser du côté anglo-saxon...

2.2 Pathologie

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique qui touche l'ensemble des muscles de l'organisme avec une prévalence d'environ 1 sur 3500 [54]. Elle est due à une anomalie génétique dans le gène codant pour la dystrophine [55]. Ce dernier étant localisé sur le chromosome X, ce sont principalement les garçons qui sont atteints par cette maladie. Cependant, il existe de rares cas de patientes atteintes par cette myopathie. Ces cas sont essentiellement dus à une inactivation du chromosome X [56, 57] ou au syndrome de Turner de type « normal » ou mosaïque [58, 59]. Les femmes porteuses d'un chromosome X muté pour le gène codant pour la dystrophine sont principalement asymptomatiques mais certaines d'entre elles peuvent développer des symptômes cardiaques [60, 61] et dans une moindre mesure des faiblesses musculaires [62]. Mais ceci n'est en rien comparable aux symptômes qu'ont les garçons porteurs de la DMD. Il est à noter que dans environ un tiers des cas de DMD, la mutation trouvée chez l'enfant dystrophique n'est pas présente chez sa mère ; on parle alors de mutation *de novo* [63]. Ces cas *de novo* sont expliqués par le mosaïsme des cellules germinales de la grand-mère de l'enfant, voire des arrière parents [64, 65]. Ces caractéristiques font de cette myopathie une maladie génétique récessive rare et liée au chromosome X.

La maladie se manifeste rarement avant l'âge de 3 ans. Un des premiers signes cliniques de cette maladie est la forte augmentation du taux de créatine-phosphokinase sérique chez un enfant dystrophique comparé à un sujet normal [66]; cela étant due à la libération de cette enzyme par les fibres endommagées. Les premiers muscles touchés sont ceux des membres inférieurs. De ce fait, le garçon tombe plus souvent que ses camarades de classe et ont des difficultés à se relever. La montée des escaliers devient de plus en plus difficile tout comme la marche. La DMD peut aussi se manifester par la présence de pseudo-hypertrophie des mollets, correspondant en fait au remplacement d'une partie du tissu musculaire par du tissu adipeux. Par la suite, on note des faiblesses musculaires au niveau du tronc. Les

muscles respiratoires et cardiaques sont affectés tout comme les muscles abdominaux et ceux du dos. Cela entraîne principalement l'utilisation de fauteuil roulant électrique pour se déplacer, des chirurgies au niveau du dos pour rétablir la posture et une assistance respiratoire de nuit puis 24h/24h. Les muscles lisses sont aussi atteints amenant des problèmes digestifs et urinaires. Ces enfants peuvent aussi éprouver des difficultés d'apprentissage possiblement dû au fait qu'on retrouve aussi la dystrophine dans le cerveau. L'espérance de vie des patients est aujourd'hui d'environ 25 ans, les causes de décès étant principalement reliées aux faiblesses respiratoires et cardiaques. Différentes photos de patients DMD sont présentées dans la figure 6.



Figure 6 : Photographies de patients DMD. On y voit certains symptômes caractéristiques de la DMD tels que l'atrophie musculaire, la scoliose ou la pseudo-hypertrophie des mollets. On voit également un patient DMD en fauteuil électrique ainsi que sous assistance respiratoire. Tirée de Duchenne [50] et de Tyler [67].

2.3 Dystrophine

2.3.1 Origine

Le gène responsable de la DMD est localisé sur le chromosome X [68, 69]. La taille de ce gène est de 2.4 millions de paire de bases (bp), soit 90 fois plus grand que la taille moyenne d'un gène normal. Il est composé de 79 exons codant pour un ARN messager (ARNm) de

14 kb [70, 71], la partie codante couvrant donc seulement 0.6 % du gène. La traduction de cet ARNm donne une grosse protéine de 3685 acides aminés (aa) d'une masse moléculaire de 427 kDa [72] nommée dystrophine qui est localisée sous le sarcolemme des fibres musculaires [73] (voir Figure7).

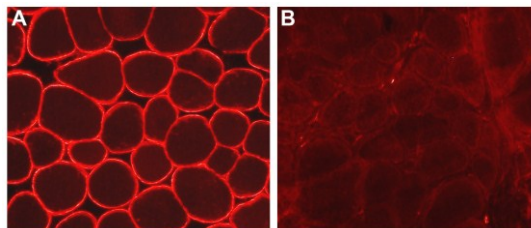


Figure 7 : Immunohistochimie contre la dystrophine. (A) Présence de dystrophine en position subsarcolemmique dans un muscle normal. (B) Absence de dystrophine dans un muscle de patient DMD. Tirée de Skuk [74].

2.3.2 Embryologie

Dans un embryon humain, l'expression de dystrophine commence à apparaître à partir de la huitième semaine dans le sarcoplasme et dans le sarcolemme. Cependant au fil des semaines de gestation, le marquage s'estompera dans le sarcoplasme et deviendra de plus en plus intense et régulier au sarcolemme. Ce n'est cependant qu'à l'âge adulte que son expression sera la plus forte [75, 76]. Chez la souris, on détecte la dystrophine à partir du dixième jour de gestation avec la même cinétique de développement que chez l'humain [77].

2.3.3 Fonction

Comme mentionné ci-haut, la dystrophine est une grosse protéine de 3685 aa qui peut être divisée en 4 domaines [72] (voir Figure 8A) :

- la région N-terminale qui compose les 240 premiers aa ;
- la région centrale, qui est la plus grande des 4 domaines de la dystrophine, est composée de 24 séquences répétitives semblables au domaine de la spectrine (241-3080) ;
- le troisième domaine est lui riche en cystéine et fait 280 aa ;
- et la région C-terminale longue de 325 aa.

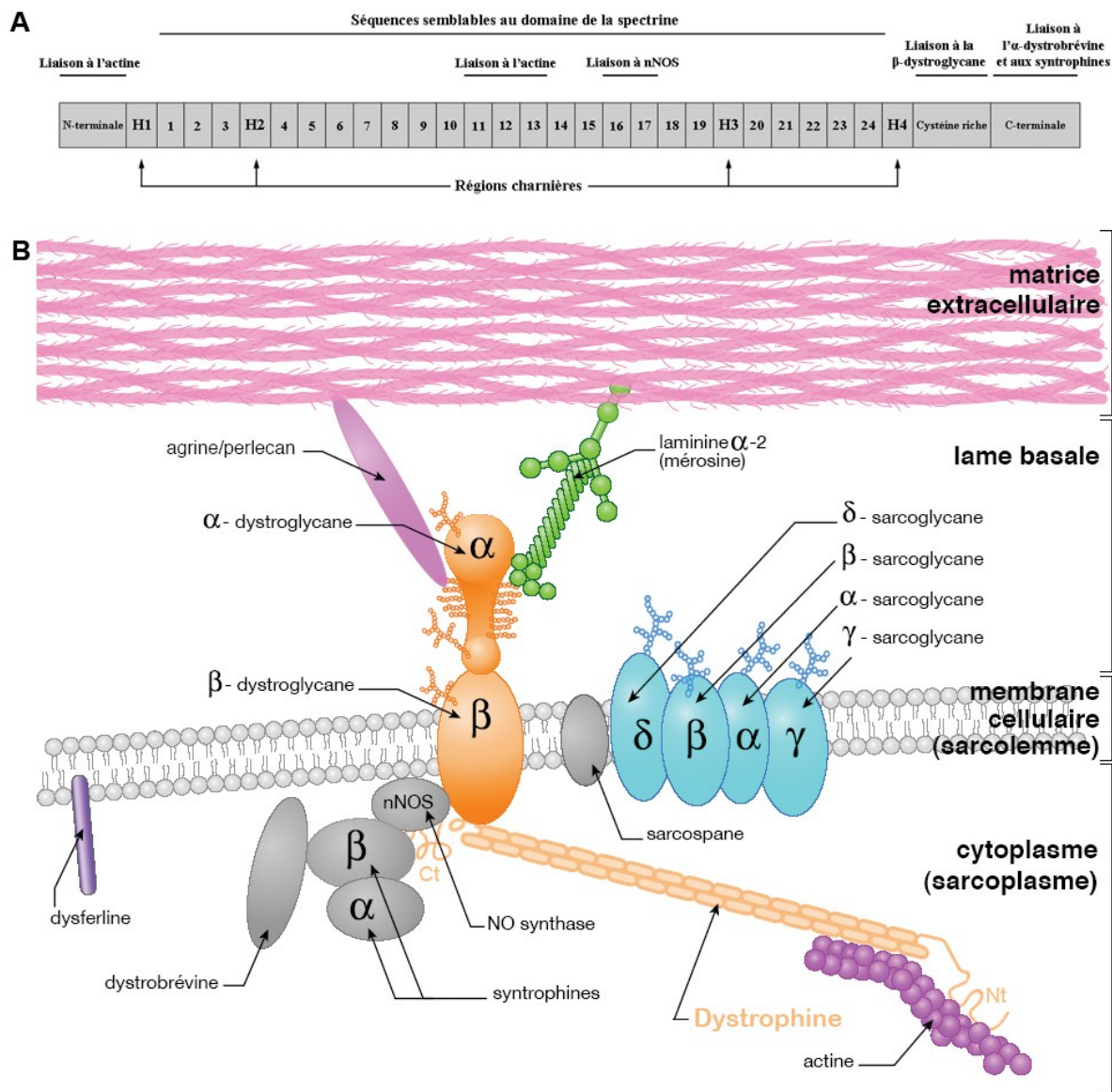


Figure 8 : La dystrophine. (A) Schéma représentant les 4 domaines de la dystrophine que sont la partie N-terminale, la région centrale, le domaine riche en cystéine et la partie C-terminale ; les domaines de liaison de la dystrophine y sont également indiqués. (B) Illustration du complexe dystrophine – glycoprotéines où la dystrophine est en couleur « pêche ». Cette illustration est fournie par l'Association Française contre les Myopathies.

Ces domaines possèdent des zones d'interaction avec de nombreuses protéines [78-80] (voir Figure 8B). L'association de la dystrophine avec ces protéines est nommée le complexe dystrophine – glycoprotéines (DGC).

2.3.4 Protéines associées à la dystrophine

La dystrophine s'associe avec les myofilaments fins d'actine polymérisée en N-terminale, [81] mais aussi via son domaine central [82]. Ce dernier peut également lier l'oxyde nitrique synthétase neuronale (nNOS) [83], cette enzyme est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques du muscle comme sa régénération ou sa contraction [84]. Le domaine central comporte aussi 4 régions charnières nommée H (Hinge) qui apportent de la flexibilité à la dystrophine [85].

Le domaine riche en cystéine de la dystrophine lui permet d'interagir avec la β -dystroglycane via la cystéine 3340 [86]. Étant présente dans le sarcolemme, la β -dystroglycane permet la liaison de la dystrophine à la membrane plasmique de la fibre musculaire. La β -dystroglycane est elle-même liée à 4 différentes sarcoglycanes (α , β , δ et γ) [87, 88] situées elles aussi au sarcolemme. Le complexe des sarcoglycanes permet le recrutement de la sarcopane [89] et de l' α -dystrobrevine [90]. La β -dystroglycane interagit également avec l' α -dystroglycane, présente elle au niveau de la lame basale [91] formant ainsi le complexe des dystroglycanes. L' α -dystroglycane est elle liée à différentes protéines de la matrice extracellulaire telles que l'agrine [91], la perlecane [92] et la mérosine (α 2-laminine) [93].

Du côté C-terminale, la dystrophine s'associe aux α -, β - et γ -syntrophines [94-96]. L' α -syntrophine permettant par la suite le recrutement de la nNOS au DGC [96]. La dystrophine se lie aussi à l' α -dystrobrevine [97]. Cette dernière peut, comme la dystrophine, recruter des syntrophines [98] et donc la nNOS de façon indirecte, mais également d'autres protéines comme la syncoiline [99] et la synémine (aussi appelée desmusline) [100]. Ces deux dernières protéines possèdent des sites de liaison aux filaments intermédiaires de desmine [100, 101], une des protéines composant le sarcomère. La synémine interagit aussi avec d'autres protéines du cytosquelette telles que la taline, la vinculine et la métavinculine [102, 103]. L' α -dystrobrevine permet donc, via les protéines qu'elle recrute, de stabiliser la fibre musculaire.

Le DGC est donc lié à de nombreuses protéines du sarcomère comme l'actine ou la desmine mais aussi à la matrice extracellulaire via la laminine ou l'agrine. Par ces interactions, la dystrophine permet le bon fonctionnement des fibres musculaires en stabilisant leurs sarcolemmes lors des contractions musculaires. D'autres rôles lui sont accordés comme celui d'être impliqué dans différentes voies de signalisation [80] mais son rôle principal reste celui du maintien de l'intégrité du sarcolemme.

2.3.5 Mutations

Dans la DMD, l'absence de dystrophine est due à une mutation dans le gène codant pour cette protéine. Il existe en fait plus de 4700 mutations différentes regroupées en 3 principales catégories : délétion d'un ou plusieurs exons, duplication d'un ou plusieurs d'exons et les mutations ponctuelles. Selon les cohortes de patients étudiées, les pourcentages de ces catégories varient [104-108]. On estime que les mutations sont réparties entre 60 et 80 % pour les délétions, entre 7 et 11 % pour les duplications et qu'il y a entre 10 et 30 % de mutations ponctuelles dont la moitié de ces dernières serait non-sens.

Il existe aussi des mutations dans le gène de la dystrophine qui enlèvent un ou des exons mais qui ne décalent pas le cadre de lecture [109]. On appelle la pathologie associée à cette dystrophine tronquée, la dystrophie musculaire de Becker (BMD) [110]. Dans cette dystrophie, la sévérité de la pathologie est très variable et est reliée aux exons manquants [111-113]. Par exemple, une délétion dans le domaine centrale de la dystrophine sera souvent bien moins sévère qu'une délétion dans la partie N-terminale. L'espérance de vie d'un patient BMD est également très variable : certains décèdent vers 20-25 ans (espérance de vie d'un patient DMD) alors que d'autres vivent au delà de 50 ans.

Bien que le gène de la dystrophine soit muté chez les patients DMD, on peut quand même observer la présence de quelque fibres dystrophine positive dans le muscle [114]. Ces fibres sont appelées révertantes et elles sont dues à des mutations spontanées localisées dans le gène de la dystrophine. Ces mutations somatiques permettent soit l'épissage d'un ou plusieurs exons (contenant la mutation originale du patient) tout en ne décalant pas le cadre de lecture, soit l'épissage d'un ou plusieurs exons additionnels permettant de rétablir le

cadre de lecture de l'ARNm chez des patients ayant une délétion qui changeait le cadre de lecture [115]. La dystrophine ainsi obtenue est similaire à celle qui se retrouve chez les patients BMD.

2.4 En absence de dystrophine

2.4.1 Complexe dystrophine – glycoprotéines

La présence ou non de dystrophine n'influence pas la transcription des gènes du DGC [93]. Cependant, au niveau du sarcolemme, l'expression des protéines de ce complexe est très faible en absence de dystrophine, de l'ordre de 10 à 20 % comparée à la normale [116, 117] alors qu'ailleurs dans l'organisme, leur expression est normale [93]. Malgré cette faible expression, lorsqu'on regarde en immunohistochimie une coupe transverse d'un muscle de patient DMD, on n'observe aucun marquage pour les dystroglycanes, sarcoglycanes ou syntrophines [118, 119]. Cela peut s'expliquer par une certaine instabilité de ces protéines en absence de dystrophine, à leurs mauvaises localisations ou à leurs dégradations [93, 120]. L'absence de la dystrophine dans les fibres musculaires mène donc, également, à l'absence du complexe DGC.

2.4.2 Régénération musculaire dans le cadre de la DMD

La régénération d'un muscle se fait par les cellules satellites qui sont situées sous la lame basale du muscle. Dans le cas d'un patient dystrophique, le manque de dystrophine et du DGC fragilise le sarcolemme des fibres musculaires [79, 121], les rendant ainsi moins résistantes aux stress. Le muscle dystrophique est donc brisé plus régulièrement, entraînant ainsi une réponse inflammatoire soutenue due aux cycles constants de dégénérescence. Les cellules satellites sont donc mises à contribution plus souvent [122], provoquant ainsi leurs sénescences prématurées [123]. Les muscles ne sont donc plus capables de se régénérer complètement et deviendront au fil du temps de plus en plus faibles. Ils seront aussi progressivement infiltrés par du tissu fibreux et du tissu adipeux [124, 125]. Une cinétique illustrant la progression de la maladie au niveau des muscles est illustrée dans la figure 9.

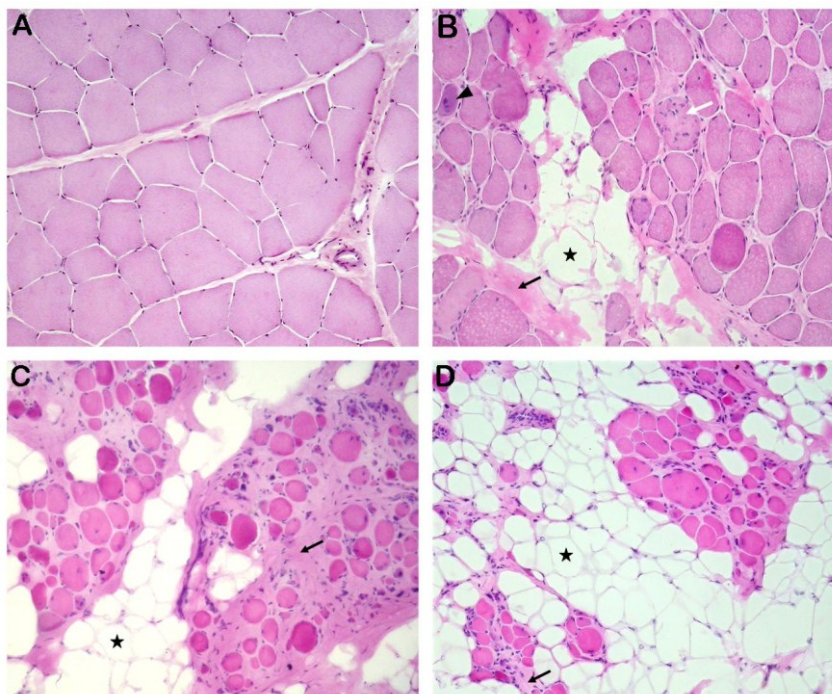


Figure 9 : Dégénérescence musculaire et la DMD. (A) HE d'un muscle sain. **B**, **C** et **D** sont des HE de muscles de patient DMD caractéristiques de la progression de la maladie. (B) Présence d'adipose (astérisque), de fibrose (flèche noire) et de nécrose (flèche blanche) au niveau du muscle. On note aussi la présence de fibres en régénération (tête de flèche). (C) La fibrose et l'adipose s'intensifient. On observe également une réduction du diamètre des fibres. (D) Le tissu adipeux est devenu très important et le nombre de fibres musculaires a fortement diminué. Modifiée de Skuk [74].

2.5 Modèles animaux

La recherche sur les animaux a été de grande utilité pour mieux comprendre la DMD, que ce soit dans les rôles et fonctions de la dystrophine, dans l'identification des protéines du DGC, dans les mécanismes de régénération musculaire ou dans l'étude histopathologique de la maladie. Les différents modèles des mammifères utilisés dans la DMD vont être abordés dans les prochaines sections.

2.5.1 Souris

De nombreuses souches de souris furent utilisées dans le cadre de la DMD. Il y a les souris dont le gène de la dystrophine est fonctionnel mais qui sont déficientes pour une protéine du complexe DGC, comme les souris déficientes en α -sarcoglycane ou en α -dystrobrevine (voir [126, 127] pour une liste plus exhaustive). Ces souris ont aidé à déterminer le rôle des

différentes protéines du DGC. Cependant, les souris les plus utilisées dans le cadre de la DMD sont celles dont la dystrophine est manquante, ces souris sont nommées *mdx*. Ce sont ces dernières souris que nous allons passer en revue (seules les principales souches sont abordées).

2.5.1.1 Souris *mdx*

La souris *mdx* est caractérisée par une mutation ponctuelle d'une seule bp localisée dans l'exon 23 du gène de la dystrophine qui introduit un codon stop prématurée menant à l'absence de dystrophine [128]. Ces souris *mdx* ont été découvertes en 1984 et sont le modèle animal le plus utilisé dans la DMD [129]. L'espérance de vie de ces souris est légèrement inférieure à celle des souris sauvages [130]. Des cycles de dégénération / régénération sont observés dès le jeune âge de la souris amenant la présence de nombreuses fibres centronucléées [131]. Au niveau des muscles striés de la souris *mdx*, il y a peu d'infiltration de tissu fibreux ou adipeux [131], le diaphragme étant le seul muscle à présenter une fibrose telle que celle qui est décrite dans les patients DMD [132]. Ces souris sont aussi plus sujettes à la fatigue dans le cadre d'exercice quotidien [133]. Leur force totale est comparable à celle des autres souris voire plus élevée mais leur force spécifique, c'est-à-dire la force totale normalisée à la taille du muscle, est toujours inférieure [134, 135]. De plus, leurs muscles sont plus facilement endommagés lorsqu'ils sont étirés alors qu'ils sont en pleine contraction [133, 134, 136]. Les fonctions cardiaques des souris *mdx* commencent à diminuer vers l'âge de 9 mois et une augmentation de fibrose interstitielle du cœur de ces souris, comparée à un cœur de souris normale, est aussi observée un peu plus tard [137]. Son phénotype reste cependant très modéré si on le compare à celui des patients DMD.

2.5.1.2 Souris *mdx*^{2Cv}

Une série de souris dystrophiques a été créée via l'utilisation d'un agent mutagène, le N-éthyle-N-Nitrosourea (ENU) en 1989 [138]. Quatre lignées de souris furent retenues et nommées *mdx*^{2Cv} à ^{5Cv}. Aucune de ces souris n'exprime de la dystrophine au niveau de leurs fibres musculaires et leurs phénotypes ressemblent globalement à celui de la souris *mdx*

[138]. On remarque cependant que les souris *mdx*^{4Cv} et ^{5Cv} ont moins de fibres révertantes que les autres types de souris *mdx* [139].

2.5.1.3 Souris *mdx* double mutantes

Afin de rendre le phénotype des souris *mdx* plus sévère, des lignées de souris doubles mutantes ont été créées.

Souris mdx / utrophine^{-/-}

L'utrophine est une grosse protéine homologue à 80 % à la dystrophine qui est localisée à la jonction neuromusculaire à l'âge adulte [140]. Cette utrophine est surexprimée au niveau des fibres musculaires chez les patients DMD et chez les souris *mdx* [141, 142]. Comme elle possède des homologies de séquence avec la dystrophine, il a été proposé que cette surexpression permette de réduire la progression de la maladie. En effet, lorsque qu'on mute le gène de l'utrophine chez la souris *mdx*, on obtient des souris d'une espérance de vie de seulement un à quatre mois présentant des faiblesses musculaires importantes, de nombreuses fibres centronucléées et de fortes zones de fibroses. Globalement, la souris *mdx / utrophine*^{-/-} a les mêmes caractéristiques phénotypiques qu'une souris *mdx* mais elle les a plus tôt et en beaucoup plus sévères [143, 144]. Sa courte espérance de vie limite cependant son utilisation.

Souris mdx / MyoD^{-/-}

MyoD est un facteur jouant un rôle important lors de la différenciation musculaire. De ce fait, des souris *mdx / MyoD*^{-/-} ont été créées. Ces souris montrent des capacités régénératives plus faibles que les souris *mdx*, développent des scoliozes telles que celles vues chez le patient DMD [145] et aussi des cardiomyopathies sévères vers l'âge de 10 mois [146]. Cette souris fut donc proposée comme modèle pour étudier la cardiomyopathie chez les patients DMD mais son usage reste limité puisque son espérance de vie est en moyenne d'un an [145].

Souris mdx / $\alpha 7$ -intégrine^{-/-}

Cette souris a ni de gène fonctionnel pour la dystrophine ni pour l' $\alpha 7$ -intégrine, cette dernière étant nécessaire à la liaison DGC – matrice extracellulaire [147]. Aucune différence phénotypique n'est observée entre ces souris et des souris sauvages avant l'âge de 2 semaines. Par contre, à partir de ce moment là, le phénotype va s'aggraver énormément et les souris vont mourir de déficience cardiaque ou respiratoire deux semaines plus tard [148]. La progression spontanée de la maladie rend cette souris difficile d'utilisation.

Souris mdx / DBA/2

Cette nouvelle souche de souris, développée cette année (en 2010), montre un phénotype comparable à celui observé chez les souris *mdx / utrophine^{-/-}* [149]. Cependant, cette souche est encore trop récente pour savoir si elle permettra de faire progresser la recherche sur la DMD dans le futur.

Souris Rag^{-/-} mdx

Le phénotype des souris Rag^{-/-} *mdx* est identique à celui des souris *mdx*. Cependant, elles n'ont pas de lymphocyte, faisant de ces souris, un modèle de choix lorsque l'on veut faire des xénotransplantations ou effectuer des expériences qui pourraient conduire à un rejet immunitaire si elles étaient faites dans une souris non immunodéficiente.

Bien qu'un nombre important de souris dystrophiques soit disponible, la souris *mdx* reste le modèle murin le plus utilisé dans la dystrophie musculaire de Duchenne malgré que son phénotype soit atténué comparé à celui des patients DMD.

2.5.2 Chiens

Il existe différentes sortes de chiens dystrophiques pour étudier la DMD [150-152] mais celui qui est le plus intéressant est le Golden Retriever (GRMD). Ces chiens GRMD possèdent une mutation dans le site d'épissage de l'intron 6 (2 bases avant le début de

l'exon 7) provoquant l'épissage de l'exon 7 [153]. Comme cet exon fait 119 bp et n'est donc pas un multiple de 3, il y a décalage du cadre de lecture faisant apparaître un codon stop prématuré, menant ainsi à l'absence de dystrophine. Malgré le fait que tous les chiens aient la même mutation, leurs phénotypes sont variables d'un chien à un autre, allant du chien très atteint qui a des grosses difficultés à se déplacer dès 6 mois et qui mourra 6 mois plus tard et celui qui se meurt sans problème à 4 ans et qui a très peu de symptômes pathologiques [154-157]. Cependant, de manière générale, leur phénotype est bien plus sévère que la souris *mdx*. On y note de fortes infiltrations de fibres, de nombreuses fibres en régénération, une atteinte cardiaque sévère, des infiltrations adipeuses selon les muscles, une atrophie musculaire et des troubles de la marche [154, 155]. Certains d'entre eux meurent d'ailleurs quelques semaines après leurs naissances. Cette différence de phénotype peut s'expliquer par la présence d'une dystrophine de 390 kDa environ dans certains muscles de chiens GRMD [158]. En effet, l'expression de dystrophine, où les exons 3 à 9 ou 5 à 12 étaient manquants, fut observée dans des chiens dystrophiques [158]. Ce phénomène avait par ailleurs déjà été observé chez les patients DMD qui possédaient des délétions des exons 3 à 7 [159].

Le chien dystrophique reste un très bon modèle pour étudier la DMD que ce soit au niveau de la pathologie ou de son système immunitaire qui est plus proche de l'humain que celui de la souris. Cependant la disponibilité de ses chiens reste rare et les colonies sont assez difficiles à maintenir.

2.5.3 Chats

Des chats ne possédant pas de dystrophine ont été aussi décrits dans la littérature. Cependant, ils possèdent moins les signes phénotypiques caractéristiques de la DMD que les autres modèles animaux [160]. De plus, leurs muscles sont hypertrophiques, causant d'ailleurs à long terme des problèmes respiratoires et cardiaques pouvant même provoquer leurs décès [161]. Cela fait que ce modèle animal est très peu utilisé.

Il existe donc divers modèles animaux pour étudier la DMD. Il y a cependant 2 modèles qui en ressortent. La souris *mdx*, qui malgré sa faible ressemblance phénotypique avec les patients dystrophiques, reste un modèle facile à utiliser et peu onéreux. Le deuxième modèle est le chien GRMD car son phénotype se rapproche beaucoup de celui des patients DMD mais il reste cher et peu disponible.

2.6 Traitement actuel de la DMD

Le patient DMD souffre de nombreuses conséquences de sa maladie. La surveillance et la prise en charge médicales contribuent à réduire les complications et à améliorer le confort de vie. Pour cela, la prise en charge des patients à différents stades doit être considérée :

- suivi de l'atteinte musculaire ;
- suivi de l'atteinte cardiaque ;
- suivi orthopédique ;
- suivi des troubles urinaires ;
- suivi nutritionnel ;
- suivi de la douleur.

Cependant, il n'existe actuellement aucun traitement curatif de cette maladie. Néanmoins, certains symptômes peuvent être retardés par la médecine d'aujourd'hui. Le suivi continu d'un physiothérapeute permet de contrôler l'évolution de la maladie. Lors de difficultés respiratoires, une ventilation non invasive est d'abord mise en place mais celle-ci devient invasive en cas de troubles respiratoires importants. Le développement d'une scoliose peut être stabilisé via une arthrodèse vertébrale. L'ajout à l'alimentation des patients de vitamine D et de calcium permet de lutter contre l'ostéoporose. Lorsque des signes d'insuffisance cardiaque se manifestent, des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine peuvent être prescrits afin d'améliorer la fonction cardiaque [162]. Un traitement aux corticoïdes, des anti-inflammatoires, est aussi utilisé chez les patients dystrophiques. De nombreuses études ont été faites sur l'usage du déflazacort et de la prednisone (voir [163-165] pour une liste détaillée des études réalisées). Brièvement, ces médicaments permettent de retarder la perte de la marche jusqu'à 2 ans et la perte des fonctions respiratoires d'au moins 6 mois. Cependant, il n'y a pas d'étude à long terme (plus que 2 ans) qui soit

randomisée. Mais si on tient compte des études non-randomisées, leurs effets peuvent être bénéfiques jusqu'à 5 ans. La prescription de prednisone aux patients DMD est maintenant largement autorisée mais de nombreuses familles en arrêtent la prise en cours de traitement car ce médicament a de nombreux effets secondaires comme la prise de poids, la fragilisation osseuse, l'hypertension artérielle ou les troubles du comportement pour n'en citer que les plus sérieux.

Les médicaments utilisés actuellement dans le cadre de la DMD n'ont pas d'effet thérapeutique sur la maladie. Néanmoins, de nombreux traitements sont en cours d'études cliniques ou précliniques et peuvent être regroupés en trois types d'approches. L'approche pharmacologique comprend toutes utilisations de médicaments, anticorps, oligonucléotides ou autres substances biochimiques. L'approche cellulaire est basée sur l'emploi de cellules alors que l'approche génique regroupe, quant à elle, l'utilisation des vecteurs viraux et des vecteurs non-viraux. Ces trois approches feront chacune l'objet d'un chapitre.

Chapitre 3 : Approche pharmacologique

L'approche pharmacologique, dans le développement d'un traitement pour la DMD, est une avenue attirante dans le sens où elle paraît simple et peu invasive. Cette approche inclut les molécules permettant de rétablir la dystrophine mais aussi celles aidant à pallier le phénotype de la DMD. De nombreuses molécules ont été testées avec plus ou moins de succès, toutefois seules les substances qui semblent être les plus prometteuses vont être abordées.

3.1 Approches curatives

3.1.1 À partir d'un bris d'ADN

Les méganucléases et les « Zinc Finger Nucleases » (ZFN), toutes deux des endonucléases, sont des protéines qui peuvent reconnaître et cliver des sites spécifiques dans l'ADN, créant ainsi des cassures double-brins [166]. Lors de la réparation de cet ADN endommagé par les processus endogènes à la cellule, des erreurs peuvent être faites au site de coupure. Ces dernières résultent en des micro-insertions ou en des micro-délétions au niveau de ce site [167]. Ce mécanisme peut donc permettre de modifier une séquence d'ADN bien précise dans le génome d'une cellule.

Cette approche pourrait être éventuellement utilisée pour les patients DMD ayant des délétions d'exons dans le gène de la dystrophine. Elle pourrait également être utilisée pour corriger une mutation non-sens ponctuelle dans le gène de la dystrophine mais cela nécessiterait d'avoir des endonucléases spécifiques pour chaque mutation. En conséquence, cette approche thérapeutique pourrait être utilisée plus fréquemment pour les nombreux patients qui ont une délétion d'un ou plusieurs exons résultant en un changement du cadre de lecture de l'ARNm. En ciblant des séquences à la fin de l'exon qui précède la délétion ou au début de l'exon qui suit la délétion avec une méganucléase ou des ZFN, des micro-insertions ou des micro-délétions au niveau du site de coupure pourraient rétablir le cadre de lecture de l'ARNm. Cette approche fut testée dans le contexte de la DMD. Pour cela, un site bien précis fut introduit dans une micro-dystrophine. Suite à l'utilisation d'une

méganucléase reconnaissant le site introduit dans la micro-dystrophine, l'expression du transgène fut alors observée dans des muscles de souris immunodéficientes [168].

Hormis cette expérience, peu d'information est disponible sur l'utilisation d'endonucléases dans le cadre de la DMD, de même que sur leur spécificité de coupure ou sur leur toxicité potentielle.

3.1.2 Le « read through » de codon stop

Environ 10 % des patients DMD possèdent une mutation non sens. Certaines molécules permettent d'incorporer un aa aux endroits où il y a un codon non-sens dans l'ARNm. Ces molécules ont donc suscité l'intérêt de plusieurs chercheurs.

3.1.2.1 Gentamicine

La gentamicine est un antibiotique de la famille des aminoglycosides. Cet antibiotique interagit avec la machinerie traductionnelle des ARNm lorsque celle-ci rencontre un codon stop [169-171]. Cette interaction permet d'introduire un aa au niveau du codon stop permettant ainsi à la machinerie traductionnelle de continuer la traduction de l'ARNm [172, 173]. Ce phénomène est appelé le « read through » des codons stops. Cela se passe spécifiquement dans les codons stops résultant de mutations non-sens car les séquences nucléotidiques encadrant ces codons stops différent de ceux naturellement présents dans tous nos ARNm [174]. La gentamicine fut donc testée comme approche thérapeutique dans le cadre de la DMD. Chez la souris *mdx*, elle a induit jusqu'à 20 % de fibres dystrophine positive [175]. Suite à cela, deux études cliniques furent menés sur des patients DMD et BMD mais leurs résultats furent mitigés [176, 177] et il en fut de même pour d'autres études postérieures menées chez la souris *mdx* [178, 179]. Étant données la variabilité de son efficacité (due aux différents isomères de gentamicine utilisés) et de sa toxicité, la gentamicine est peu à peu délaissée dans la catégorie des molécules permettant le « read through » des codons stops. Cependant, une nouvelle molécule, le PTC124, serait plus prometteuse.

3.1.2.2 PTC124

Le PTC124 est une molécule récente permettant aussi le « read through » des codons stops et qui fonctionnerait de la même manière que la gentamicine [180]. Des tests de toxicité montrent que cette molécule serait bien tolérée chez l'Homme mais ces tests ont été seulement effectués sur 17 jours [181]. Pour ce qui est de son efficacité, elle est comparable à la gentamicine, soit 20 à 25 % d'augmentation de fibres dystrophine positive chez les *mdx* traitées [182]. Des essais cliniques de phase II furent commencés sur des patients DMD et BMD avec le PTC124, mais en date du 3 mars 2010, les 3 essais en cours furent interrompus et seul l'un d'entre eux pourrait hypothétiquement reprendre [183]. Cela ne semble donc pas être de bons augures pour l'utilisation de cette molécule dans la maladie de Duchenne.

3.1.3 Molécules permettant le saut d'exon

Alors que l'expression de dystrophine est nulle chez les patients DMD, on observe l'expression de dystrophine tronquée chez les patients BMD alors qu'ils ont, tout comme les patients DMD, un gène muté de la dystrophine. Cette dystrophine est en fait tronquée d'un ou plusieurs exons sans perte du cadre de lecture [109]. Cette observation a mené certains chercheurs à se demander s'ils pouvaient reproduire ce phénomène chez les patients DMD. De là est née l'idée de molécules permettant le saut d'exons afin de rétablir l'expression de dystrophine, sous une forme tronquée mais fonctionnelle. Ces molécules sont des petits ARNs artificiels anti-sens qu'on appelle oligonucléotides anti-sens (AO) et qui ont la capacité de bloquer les sites introniques ou exoniques « enhancers » favorisant ainsi l'épissage d'exon (voir exemple en Figure 10). La preuve de principe fut rapportée en 1996 sur des cellules lymphoblastoïdes de patient DMD [184]. Deux types d'AOs sont principalement utilisés : les 2'-O-méthyl-phosphorothioates et les morpholinos (voir Figure 11).

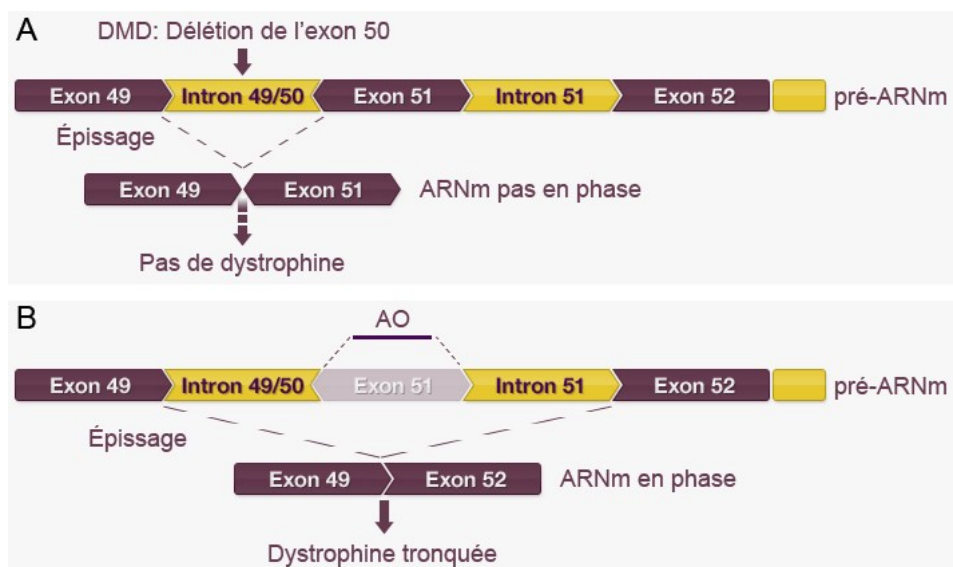


Figure 10 : Représentation schématique du saut d'exon thérapeutique chez un patient DMD où l'exon 50 est manquant. (A) Épissage du pré-ARNm de la dystrophine en condition normale. Le cadre de lecture de l'ARNm résultant de cet épissage n'étant pas en phase, il se crée un codon stop prématuré menant à l'absence de dystrophine chez cet individu. (B) Exemple de l'utilisation d'un AO pour provoquer un saut d'exon. L'AO utilisé ici cible et masque la séquence d'épissage de l'exon 51 de la dystrophine. Lors de l'épissage, l'exon 51 sera ainsi sauté menant à un ARNm où les exons 50 (mutation DMD) et 51 (AO) seront manquants. Cependant, comme l'absence de ces 2 exons ne modifie pas le cadre de lecture, il y aura restauration de l'expression de dystrophine (tronquée des exons 50 et 51). Modifiée de Van Deutekom *et al.* [185].

3.1.3.1 2'-O-méthyl-phosphorothioates

Les 2'-O-méthyl-phosphorothioates font environ de 15 à 30 mers et sont obtenus en modifiant la synthèse classique des oligonucléotides [186]. En effet, lorsque ces derniers sont obtenus, une première modification va remplacer l'atome d'oxygène chargée négativement présent dans le lien phosphodiester par un atome de soufre. La deuxième modification est une méthylation du ribose (de chaque base) en position 2. Ces modifications font que les oligonucléotides obtenus sont résistants aux nucléases et capables d'interférer dans la machinerie transcriptionnelle au niveau de l'épissage [187-189].

De nombreux 2'-O-méthyl-phosphorothioates ont été construits pour cibler des mutations présentes dans des cellules myogéniques provenant de biopsies musculaires de patient DMD [190] et ce pour différents types de mutations [191]. Suite à l'efficacité de ces AOs à

restaurer l'expression de dystrophine *in vitro*, des 2'-O-méthyl-phosphorothioates furent construits pour cibler l'exon 23 de la souris *mdx*. Injectés directement par voie intramusculaire dans la souris *mdx*, ils permettent la restauration de dystrophine dans le muscle traité jusqu'au moins trois mois après le traitement sans avoir d'incidence du point de vue immunologique [192]. Ces AOs furent aussi injectés par voie intraveineuse dans des souris *mdx*. Ces dernières ont montré une restauration de l'expression de dystrophine dans de nombreux muscles 2 semaines après l'injection mais il semble que le cœur ne soit pas accessible par cette approche [193]. Le fait de répéter les injections permet d'augmenter l'efficacité de l'AO sans en augmenter sa toxicité (à deux semaines) [193].

Après ces bons résultats, un essai clinique a été mené avec le PRO051 sur quatre patients dystrophiques. Le muscle injecté avec cet AO a montré environ 20 % de restauration de dystrophine 1 mois après le traitement sans qu'aucun effet secondaire notable ne soit observé [185]. Subséquemment à ces résultats encourageants, un essai clinique de phase I/II est actuellement en cours avec ce même AO. D'après une récente étude, il semblerait cependant qu'une injection sous cutanée aurait une meilleure pharmacocinétique et pharmacodynamique qu'une injection intramusculaire ou intraveineuse [194]. Malgré qu'il n'existe pas d'étude de toxicité faite à long terme chez les animaux avec ces 2'-O-méthyl-phosphorothioates, cette approche reste prometteuse [195].

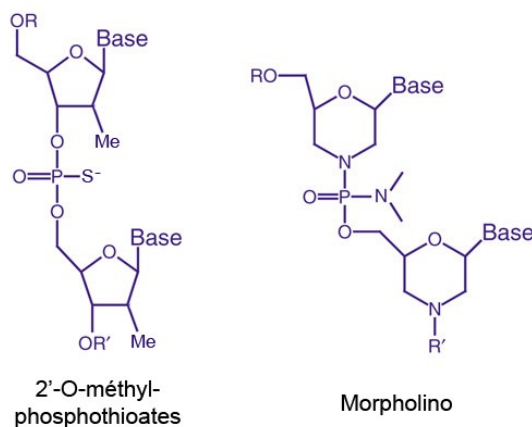


Figure 11 : Principaux AOs utilisés dans le cadre de la DMD. À gauche est représenté un schéma du 2'-O-méthyl-phosphorothioate et à droite, celui du morpholino. R et R' représentent la continuation de la chaîne oligomérique de l'AO en 5' et en 3' respectivement. Modifiée de Corey *et al.* [196].

3.1.3.2 Morpholinos

Tout comme les 2'-O-méthyl-phosphorothioates, les morpholinos dérivent eux aussi des oligonucléotides classiques. Leur ribose est changé en un cycle morpholine [197] et l'oxygène présent dans la liaison phosphodiester (celui qui n'est pas chargé négativement) est remplacé par un atome d'azote [198, 199]. Ces caractéristiques font de ces AOs des molécules biologiquement stables [200] et ayant des effets anti-sens [201].

Des morpholinos pouvant cibler l'exon 23 de la dystrophine de souris ont été construits et testés chez la souris *mdx* avec succès. En effet, on observe une restauration partielle de la dystrophine dans les muscles traités lorsqu'ils sont délivrés de façon intramusculaire [202] et dans de nombreux muscles lorsque délivrés de façon intraveineuse [203, 204]. Une augmentation de la force a d'ailleurs été observée dans le *Tibialis anterior* (TA) des souris traitées suite à une injection intraveineuse [203]. Un récent article a par ailleurs montré une restauration de dystrophine de l'ordre 30 à 50 % dans le cœur de souris *mdx* ; cependant, la dose d'AO utilisée était 50 fois supérieure à celle utilisée dans le muscle [205].

Un morpholino permettant le rétablissement de la dystrophine de chien fut aussi expérimenté en intraveineux dans des chiens GRMD. Cinq mois plus tard, les trois chiens traités montraient une restauration partielle de dystrophine et une stabilisation de la pathologie sans signe évident de toxicité [206]. Au vue de ces résultats, un essai clinique fut réalisé sur 7 patients dystrophiques dans le but d'épisser l'exon 51 afin de rétablir le cadre de lecture de leur dystrophine. Le morpholino fut injecté de façon intramusculaire et des biopsies furent effectuées 3 à 4 semaines après le traitement. Le muscle injecté avec la forte dose d'AO montrait une augmentation de l'expression de dystrophine au niveau de la trajectoire d'injection d'environ 60 % et plus loin dans le muscle d'environ 20 % ; aucun signe de toxicité ne fut décelé [207]. Après ces résultats encourageants, un autre essai clinique de phase I/II a été ouvert.

Ces deux AOs, aux efficacités similaires [208], s'avèrent prometteurs dans la DMD. Cependant, ils semblent avoir peu d'effet au niveau du cœur et il n'existe pas d'étude sur la

toxicité de ces deux composés à long terme. De plus, même si le pourcentage de patient DMD pouvant être traité avec cette approche est potentiellement grand (80 %) [108], il n'en reste pas moins que la dystrophine restaurée sera tronquée. Suivant les exons absents, cela pourra avoir plus ou moins de forte conséquence, un peu comme ce qui s'observe chez les patients BMD, où suivant la mutation, le phénotype est plus ou moins sévère. En plus de cela, il faut développer plusieurs AOs ciblant de nombreux sites d'épissage car les mutations sont très diverses chez les patients DMD.

3.2 Autres approches

3.2.1 Myostatine

Une autre piste thérapeutique est d'agir sur la myostatine, un membre de la famille des TGF- β qui régule le muscle. En effet, lorsque ce gène est muté chez des souris (souris myostatine^{-/-}), on observe une forte hypertrophie au niveau de leurs fibres musculaires [209]. Le cas d'un enfant n'ayant pas de myostatine a également été rapporté en Allemagne ; cet enfant montrait des capacités physiques très impressionnantes pour son jeune âge (4-5 ans) [210]. Des souris *mdx* / myostatine^{-/-} ont aussi été générées et elles ont une bien meilleure histologie qu'une simple souris *mdx* tout en ayant les caractéristiques musculaires d'une souris myostatine^{-/-} [211]. Afin de savoir si cette approche était réalisable chez l'Homme, des anticorps contre cette myostatine ont été injectés en intrapéritonéale dans des souris *mdx*. Les souris traitées ont montré une hypertrophie ainsi qu'une augmentation de leur force et une amélioration de la physiopathologie au niveau des muscles [212]. Il existe d'autres méthodes pour bloquer la voie de signalisation de la myostatine. Au niveau des antagonistes de la myostatine, on peut citer la follistatine [213] et le propeptide de la myostatine [214]. Un autre moyen est de muter directement son récepteur appelé le récepteur activine de type II [215]. Tous ces moyens mènent à des phénotypes similaires à celui observé chez la souris myostatine^{-/-}. Après ces résultats encourageants, un essai clinique utilisant un anticorps dirigé contre la myostatine (MYO-029) a été réalisé, mais mis à part le fait que cet anticorps fut très bien toléré, aucune augmentation significative de force ne fut observée [216]. D'autres approches avec la

myostatine sont également utilisées comme nous le verrons plus tard dans les deux prochains chapitres.

3.2.2 Utrophine

Nous avons déjà vu que l'utrophine est surexprimée chez les souris *mdx* et chez les patients DMD. Lorsque son expression est augmentée de 10 fois chez la souris (transgénique), on observe alors que son phénotype est comparable à celui d'une souris sauvage [217]. De ce fait, augmenter l'expression d'utrophine dans des muscles dystrophiques fut une avenue intéressante dans le cadre de la DMD. L'injection d'héréguline dans des souris *mdx* a montré une surexpression d'utrophine d'environ 2 à 3 fois menant à une amélioration de la maladie [218]. L'injection de L-arginine ou d'oxyde nitrique a aussi permis d'augmenter l'expression d'utrophine chez la souris *mdx* [219]. Récemment, l'injection d'une protéine TAT-Utrophine en intrapéritonéale dans des souris *mdx* a permis d'augmenter leurs forces [220]. La compagnie Summit inc. développée par Dr. Davies annonce aussi avoir mis au point des molécules intéressantes, dont SMT C1100, au niveau de l'expression de l'utrophine mais rien n'a été encore publié. L'approche d'augmenter l'expression d'utrophine reste encore à être plus amplement explorée car les molécules actuelles ne permettent pas d'obtenir une surexpression suffisamment forte (par 10 au moins) pour restaurer complètement les effets de la DMD [221, 222]. Cette approche est également utilisée en thérapie génique comme nous le verrons dans le cinquième chapitre.

Ces deux approches peuvent permettre aux patients DMD de gagner en force et en résistance sans toutefois qu'il y ait restauration de la dystrophine.

Chapitre 4 : Approche cellulaire

La thérapie cellulaire dans le cadre de la DMD est basée sur la capacité des myoblastes transplantés dans un muscle à fusionner avec les fibres de celui-ci et ainsi d'introduire le gène normal de la dystrophine [223]. Comme vu dans le deuxième chapitre, les myoblastes sont des cellules satellites en prolifération responsables de la réparation du muscle face à un bris. Outre ces cellules, il existe de nombreux autres types cellulaires qui peuvent être utilisés comme approche cellulaire dans la DMD mais seules les plus prometteuses seront abordées dans la présente thèse. Cette partie sera divisée en 4 parties suivant l'origine de ces cellules : le sang, les vaisseaux sanguins, la moelle et le muscle (voir Figure 12). Il est à noter que toutes les cellules impliquées dans cette approche sont issues du mésoderme.

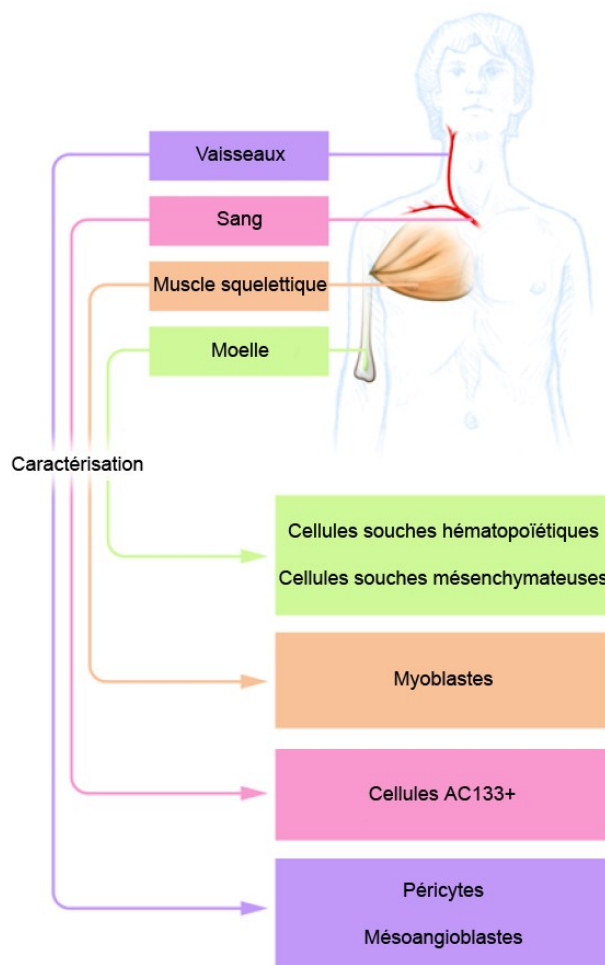


Figure 12 : Origine des principales cellules utilisées en thérapie cellulaire dans le cadre de la DMD. Modifiée de Tedesco *et al.* [36].

4.1 À partir du sang

4.1.1 Cellules AC133+

Lorsqu'on isole les cellules AC133+ (cellules exprimant CD133) du sang et qu'on les met en coculture avec des myoblastes, ces cellules sont alors capables de former des myotubes *in vitro* et d'exprimer à leurs surfaces des marqueurs de cellules myogéniques [224]. Des injections intramusculaires et intra-artérielles faites chez des souris *mdx* ont démontré que ces cellules étaient capables de se fusionner avec les fibres musculaires de l'hôte [224]. Par la suite, des cellules AC133+ furent également isolées à partir de biopsie musculaire et montrèrent les mêmes capacités que celles issues du sang [225]. Un essai clinique de phase I a même été réalisé sur des patients DMD. Bien qu'aucune toxicité due à ces cellules ne fût détectée, aucune amélioration phénotypique ne fut retrouvée chez ces patients [226]. Même si ces cellules ont montré des caractéristiques myogéniques intéressantes, l'efficacité de ces cellules reste à être démontrée dans d'autres essais cliniques.

4.2 À partir des vaisseaux

4.2.1 Mésoangioblastes

Les mésoangioblastes sont des cellules issues de l'aorte dorsale d'un embryon de souris âgé de 9.5 jours [227]. Ces cellules peuvent être des précurseurs de cellules adipeuses et osseuses mais possèdent aussi des capacités myogéniques [228]. Lorsqu'elles sont injectées dans la circulation sanguine, elles s'accumulent au niveau des capillaires et peuvent migrer à travers ceux-ci mais seulement en présence de facteurs chémoattractants [229]. Il est donc nécessaire d'avoir une inflammation du muscle si on veut que ces cellules migrent vers celui-ci. Dans ces conditions, des injections de mésoangioblastes ont montré de bons résultats chez la souris déficiente en α -sarcoglycane et chez le chien dystrophique [229, 230]. Après ces résultats encourageants, un essai clinique serait d'ailleurs envisagé [36]. Cependant, il faut vérifier les effets secondaires des accumulations que pourraient faire ces cellules dans différents organes vitaux.

4.2.2 Péricytes

Alors que le mésoangioblaste est issu de vaisseau sanguin embryonnaire, le péricyte est lui issu de vaisseau sanguin adulte et possède des caractéristiques similaires aux mésoangioblastes dont le potentiel myogénique [231]. L'auteur principal de cet article, Dr. Cossu, mentionne d'ailleurs que les péricytes seraient comme l'équivalent adulte des mésoangioblastes [232]. Des cellules issues de petits vaisseaux provenant d'une biopsie musculaire furent isolées, proliférées et injectées de manière intra-artérielle ou intramusculaire dans des souris *mdx*. Les souris traitées en intra-artérielle présentaient une forte restauration de dystrophine comparée à celles injectées en intramusculaire [231]. Cela semble donc prometteur même si les péricytes, tout comme les mésoangioblastes, ne peuvent traverser la paroi des vaisseaux sanguins que suite à un bris [233]. De plus, peu d'information existe sur l'utilisation de ces péricytes dans le cadre thérapeutique de la DMD [234]. Certains auteurs pensent même que ces derniers proviendraient des cellules souches mésenchymateuses (MSC) [233, 235].

Les mésoangioblastes et les péricytes sont des types de cellules, aux caractéristiques similaires, issues de la paroi de vaisseau embryonnaire ou adulte [36]. Dans l'optique d'une thérapie dans la DMD, leurs injections en intraveineuses ou en intra-artérielles donnent de bons résultats mais nécessite un bris afin de faire migrer ces cellules des capillaires vers les muscles. De plus, peu d'information est disponible sur l'accumulation de ces cellules dans différents tissus et la toxicité qui s'y rapporte.

4.3 À partir de la moelle

4.3.1 Cellules souches hématopoïétiques

Dès 1998, une équipe a démontré que les cellules souches hématopoïétiques (HSC) issues de la moelle avaient des caractéristiques myogéniques [236]. Depuis, de nombreuses équipes ont étudié plusieurs sous-populations de ces cellules afin d'en trouver les plus performantes. Ainsi, la fraction des HSC excluant le colorant Hoechst 33342, nommées

cellules SP (Side Population) furent obtenues et montrèrent de bonnes capacités myogéniques [237, 238]. Il est à noter que les cellules SP peuvent être aussi obtenues à partir d'une biopsie musculaire [238]. D'autres fractions myogéniques furent étudiées en fonction de l'expression de Sca-1, c-kit ou CD45 [239-241]. Malgré les nombreuses populations décrites, les résultats *in vivo* obtenus par ces cellules furent, de façon globale, peu concluants chez la souris [236, 239-242]. De même, une analyse rétrospective d'un patient DMD qui avait reçu une transplantation de moelle osseuse de son père a montré la présence de noyaux du donneur dans des fibres musculaires ainsi que certaines fibres dystrophine positive, mais en très faible quantité [243].

4.3.2 Cellules souches mésenchymateuses

Les MSC sont définies suivant leur capacité à adhérer dans des flasques de culture, par leurs marqueurs de surface et par leurs capacités de différenciation [244]. Dans la moelle, outre les HSC, il y a aussi les MSC qui sont responsables de la régénération des tissus mésenchymateux tels que les os. Ces cellules furent aussi investiguées pour leurs propriétés myogéniques [245]. En effet, lorsqu'elles sont transplantées dans des muscles de souris *mdx*, on observe la présence de quelques fibres dystrophine positive [246] de même que lorsqu'elles sont injectées en intraveineux [247]. Récemment, des MSC ont également montré une restauration de dystrophine dans les muscles de souris transplantés mais aucune amélioration de la force ne fut observée [248]. Les MSC peuvent également être isolées à partir du gras ou du muscle mais il ne semble pas que cela en influence leurs effets thérapeutiques [249].

Les cellules issues de la moelle montrent bien des capacités myogéniques *in vitro* et *in vivo* mais pas suffisamment pour restaurer le phénotype de la souris *mdx*. Il reste donc encore beaucoup de chemin à faire pour les HSC et les MSC avant qu'elles ne soient considérées comme une approche cellulaire potentielle dans le cadre de la DMD.

4.4 À partir du muscle

Lors d'un bris musculaire, les fibres endommagées sont réparées par des cellules qui sont déjà présentes dans le muscle et qui représentent la principale source de cellules myogéniques. Ces dernières sont nommées cellules satellites lorsqu'elles sont quiescentes et myoblastes quand elles prolifèrent. De nombreux chercheurs ont donc pensé que ces cellules seraient le candidat idéal pour rétablir la dystrophine dans les muscles des patients DMD.

4.4.1 La transplantation de myoblastes

Le fait de transplanter des myoblastes dans un muscle mène à la fusion des myoblastes avec les fibres musculaires [250]. Il se produit ainsi une complémentation génique : les cellules du donneur vont apporter ses gènes dans la fibre hôte formant de ce fait une fibre hybride [251]. Il est donc possible d'obtenir l'expression de dystrophine, apportées par des myoblastes normaux, dans un muscle dystrophique [223]. Cela a été fait avec succès chez la souris dystrophique [223] de même que chez le primate non humain [252]. Ces transplantations de myoblastes permettent la restauration de la dystrophine dans les fibres musculaires ainsi que celle du DGC [253]. Une amélioration de la force et de la résistance des fibres musculaires dans les muscles transplantés avec des myoblastes est également observée [254, 255]. En plus de restaurer la dystrophine, certaines cellules transplantées se mettent en position de cellules satellites pouvant ainsi participer à une prochaine régénération musculaire [256, 257]. Cependant, lorsque les myoblastes sont injectés en intrapéritonéale ou en intraveineux, aucune fibre hybride n'est observée [258]. L'injection de ces cellules fut aussi faite en intra-artérielle mais les fibres hybrides observées furent seulement localisées quand un bris fut administré, et uniquement au niveau de celui-ci [259]. Pour ce qui est du muscle cardiaque, les myoblastes transplantés dans celui-ci permettent de réparer une région endommagée ainsi que la fonction cardiaque mais sont incapables de se contracter comme les cardiomyocytes [260]. Bien que les mécanismes impliqués ne soient pas encore tous élucidés, des essais cliniques encourageants [261-263] ont été faits sur des patients venant d'avoir un infarctus du myocarde et un autre essai clinique est actuellement en cours [264].

Des équipes ont aussi essayé d'obtenir des cellules myogéniques à partir de fibroblastes. En 1998, une équipe a démontré la faisabilité d'obtenir des cellules myogéniques en infectant des fibroblastes avec un vecteur codant pour MyoD [265]. Les cellules obtenues furent capables de fusionner *in vitro* et *in vivo* mais pas autant que les myoblastes. Depuis ce temps, d'autres équipes ont réalisé d'autres expériences avec des vecteurs codant toujours pour MyoD mais le manque de données comparatives avec les myoblastes ne permet pas de conclure sur ces études [266, 267]. Cette approche reste intéressante dans le fait de pouvoir convertir les fibroblastes, issus de la peau par exemple, d'un patient DMD en myoblastes. Cependant, beaucoup de travail reste encore à être fait avant d'en arriver là.

4.4.2 Essais cliniques

Après les résultats obtenus suite à la transplantation de myoblastes chez la souris *mdx*, des essais cliniques ont rapidement été entrepris chez des patients DMD (voir [74] pour une liste de ces essais cliniques). De nombreux immunosuppresseurs ont été utilisés lors de ces essais cliniques. Les transplantations de myoblastes effectuées sur des patients traités sous cyclosporine A ou cyclophosphamide n'ont pas montré de résultat positif. Cela a été expliqué par la suite par le fait que la cyclosporine A inhibe la fusion des myoblastes [268] et que la cyclophosphamide tue les cellules en prolifération, ce qui est le cas après la transplantation de myoblastes dans un muscle. Les essais cliniques faits dans des conditions d'immunocompatibilité se sont relevés positifs tout comme ceux effectués sous bonne immunosuppression par le FK506 [269-271]. Lors de ces essais cliniques, certaines limitations liées à la transplantation de myoblastes ont cependant été mises en évidence telles que :

- la mort précoce des myoblastes transplantés ;
- leur faible migration / capacité de fusion ;
- leur rejet immunitaire spécifique (selon les cas).

Ces problèmes sont illustrés dans la figure 13.

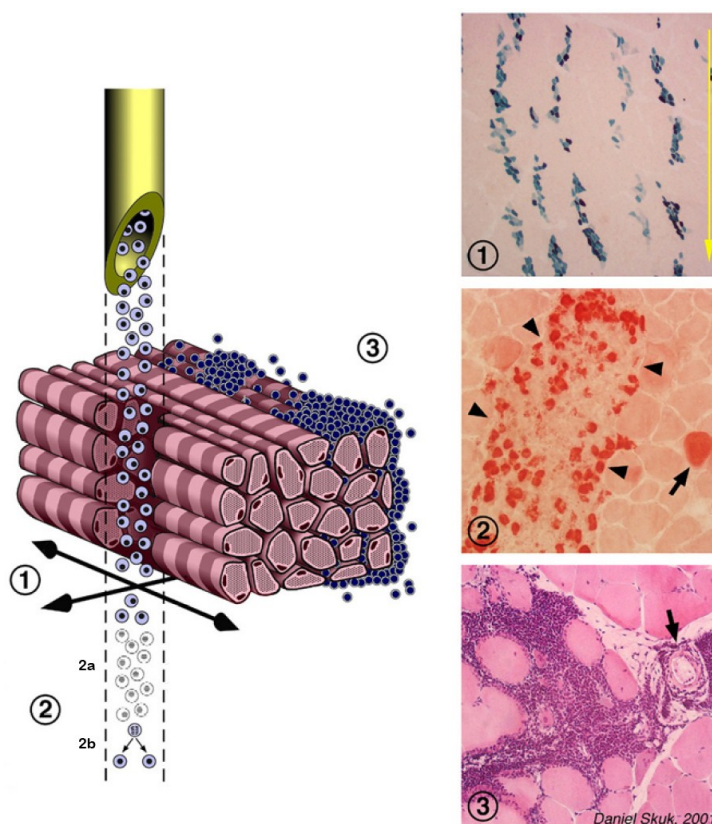


Figure 13 : Illustration des 3 principaux problèmes rencontrés lors de la greffe de myoblastes. En 1 est représentée la difficulté qu'ont les myoblastes à migrer du site d'injection pour aller fusionner avec les fibres musculaires. En 2 est représentée la mort des myoblastes transplantés ; même si celle-ci est précoce (2a), elle est un peu compensée par la prolifération des myoblastes survivants (2b). (3) Si les myoblastes du donneur sont immuno-incompatibles avec le receveur, on observera alors un rejet rapide et massif des cellules transplantées. Modifiée de Skuk *et al.* [272].

4.4.3 Mort précoce des myoblastes

Il a été établi qu'entre 70 et 80 % des myoblastes greffés meurent dans les 3 à 4 premiers jours suivant la transplantation [273, 274]. La cause exacte de cette mortalité n'est pas encore totalement élucidée mais il est sûr que la nécrose et l'apoptose y jouent un rôle important [274]. Les facteurs en cause sont nombreux. L'un d'eux est l'inflammation générée par les trajectoires des aiguilles servant à délivrer les cellules. Parmi les cellules impliquées dans la réaction inflammatoire, les neutrophiles semblent être liés au mécanisme de mort cellulaire [273]. Les macrophages pourraient aussi jouer un rôle dans cette mortalité. Comme les cellules NK (Natural Killer) arrivent plus tard, vers le sixième jour, ils ne sont pas impliqués dans cette mort précoce [275]. Le stress physique, due entre

autre à la pression exercée sur les cellules lors de leur injection, ne semble pas non plus être mis en cause (Skuk D., donnée non publiée). Un autre facteur responsable de la mortalité observée lors de la greffe de myoblastes est l'anoïkis, c'est-à-dire la mise en apoptose de la cellule suite à sa perte d'adhésion avec la matrice extracellulaire [276]. En effet, si des myoblastes sont cultivés en présence de fibronectine, la survie de ces myoblastes est augmentée *in vitro* et *in vivo*. L'hypoxie est également un facteur impliqué dans cette mortalité précoce [277]. Cela a été mis en évidence par la surexpression de VEGF dans des myoblastes.

De nombreux facteurs contribuent donc à la mort précoce des myoblastes greffés. Peut-être en existe-il d'autre(s) mais la somme de ces facteurs fait qu'environ 70 à 80 % des cellules meurent 3 à 4 jours après leur transplantation.

4.4.4 Faible migration / Capacité de fusion

Lors d'une transplantation de myoblastes, plusieurs trajectoires d'injection peuvent être effectuées. Lorsqu'elles sont séparées de 2 mm chez le singe, les fibres hybrides résultant de chaque trajectoire restent éloignées les unes des autres alors qu'elles sont accolées lorsqu'on injecte les myoblastes au millimètre [272]. Cette différence est due aux dégâts provoqués par les trajectoires des aiguilles. En effet, un myoblaste ne peut fusionner qu'avec une fibre musculaire que si celle-ci est endommagée. En créant plus de dommage, on augmente le nombre de fibres pouvant être réparées et donc le nombre de fibres hybrides résultant de la greffe de myoblastes. De plus, lorsqu'un muscle est endommagé, il sécrète différents facteurs chémoattractants permettant d'attirer les myoblastes vers le site endommagé. Cependant, afin qu'ils puissent accéder aux fibres endommagées, les myoblastes ont besoin de dégrader la matrice extracellulaire présente entre chaque fibre.

La dispersion des myoblastes suite à leur transplantation est donc un facteur important pour obtenir un bon succès de greffe. Un moyen pour augmenter cette dispersion est l'utilisation de toxines avant la transplantation de myoblastes [278]. En effet, le fait d'avoir un grand nombre de fibres endommagées augmente le nombre de fibres hybrides pouvant être obtenu. En plus d'altérer l'intégrité des fibres musculaires, la matrice extracellulaire est

également détériorée par la toxine ; favorisant ainsi le passage des myoblastes vers les fibres endommagées. Un autre moyen d'augmenter le succès des greffes est d'irradier un muscle avant de greffer les myoblastes. En effet, l'irradiation d'un muscle permet d'inhiber la prolifération de ses cellules satellites favorisant ainsi les cellules greffées car ces dernières ne sont plus en compétition avec les cellules satellites endogènes [279]. Ces conditions n'étant pas réalisables en essai clinique, il a été nécessaire d'augmenter la dispersion des cellules greffées par d'autres manières. Plusieurs approches ont alors été proposées sans toutefois modifier le nombre de cellules injectées. Le bFGF [280], l'IGF-1 [281], la vitamine D3 [282] et le MGF [283] ont ainsi permis d'augmenter le succès de greffe des myoblastes transplantés de même que l'induction de métalloprotéases [284] ou l'inhibition de la myostatine par la follistatine [285].

Différents facteurs peuvent donc être modulés afin d'obtenir un succès de greffe plus important : soit en faisant plus de trajectoires d'injection et donc en injectant plus de cellules, ou soit en modulant l'activité de dispersion ou de dégradation des myoblastes transplantés.

4.4.5 Rejet immunitaire spécifique

Lorsque les myoblastes d'un donneur ne sont pas immunocompatibles avec le receveur, il y a rejet des myoblastes transplantés [286]. Cependant, l'utilisation d'immunosuppresseurs tels que le FK506 permet l'allotransplantation de myoblastes chez la souris [287] ou chez le singe [288]. Néanmoins, l'utilisation prolongée d'immunosuppresseurs amène à d'importants effets secondaires tels qu'une neurotoxicité, une néphrotoxicité et un risque augmenté de cancer et d'infection. Des protocoles d'induction de tolérance immunologique ont été établis avec succès chez la souris [289, 290] mais il est plus difficile de les mettre au point chez le singe ou le chien. Une autre approche consiste à modifier les myoblastes du receveur avec un vecteur viral codant pour la dystrophine et de les transplanter par la suite chez le receveur : cette méthode est appelée thérapie génique *ex vivo* et a fait ses preuves dès 1998 [291, 292]. Cette approche va être traitée dans le prochain chapitre.

De nombreuses cellules provenant de différentes origines ont été testées dans le cadre d'une thérapie cellulaire pour la DMD. Les myoblastes restent cependant les cellules avec lesquelles ont été obtenus les meilleurs résultats lors d'essais cliniques chez le patient DMD. Bien que la transplantation de myoblastes fasse face à certaines limitations comme celles mentionnées ci-dessus, de nouveaux protocoles sont régulièrement testés afin de la rendre plus performante.

Chapitre 5 : Approche génique

Depuis le premier essai en thérapie génique en 1990 [293], il y a eu un grand intérêt pour cette approche thérapeutique. Cependant, en 1999, la mort d'un patient traité avec un adénovirus provoqua un sérieux revers car ce décès fut attribué à la réponse immunitaire engendrée par l'adénovirus [294]. En 2002, un autre problème arriva lors d'un essai clinique utilisant un rétrovirus pour traiter des enfants immunodéficients ; en effet, un des enfants traités décéda [295]. Depuis ce temps, la communauté scientifique est plus prudente dans l'utilisation de vecteurs viraux chez l'Homme pour des questions de biosécurité.

La thérapie génique dans le cadre de la DMD consiste à introduire une copie fonctionnelle du gène de la dystrophine dans les fibres musculaires malades afin d'en restaurer leur fonction perdue. Pour cela, nous avons plusieurs outils à notre disposition. Il existe premièrement différentes versions de la dystrophine qui peuvent être utilisées. Ces versions ont été dérivées des dystrophines tronquées retrouvées chez les patients BMD et sont nommées mini-dystrophine ou micro-dystrophine. Outre la dystrophine, des équipes ont également travaillé avec une protéine homologue à la dystrophine, l'utrophine, afin de rétablir le DGC.

La thérapie génique est divisée en deux catégories distinctes : celle utilisant les vecteurs viraux, dite virale et celle n'en utilisant pas, dite non virale.

5.1 Les formes tronquées de la dystrophine

En thérapie génique, les transgènes utilisés correspondent à l'ADN complémentaire (ADNc) d'un gène. Cet ADNc est en fait la partie codante d'un gène qui est synthétisée par transcription inverse de l'ARNm mature du gène en question. La partie codante d'un gène correspond donc aux exons du gène sans ses introns. La taille de l'ADNc de la dystrophine est d'environ 11 kb, cette dystrophine est nommée dystrophine pleine longueur (FLDYS). Il est aussi possible d'avoir un ADNc partiellement tronqué qui produit une dystrophine qui conserve une certaine fonction même s'il lui manque certaines de ses séquences. En effet, un patient BMD dont les exons 17 à 48 de la dystrophine étant manquants développa un

phénotype dystrophique relativement moins sévère [112]. La partie manquante se situait au niveau des séquences répétitives semblables au domaine de la spectrine résultant à une dystrophine tronquée ne possédant que 8 de ces séquences au lieu des 24 habituelles. La construction de ce transgène [296] et de nombreux autres réalisés à partir de ce modèle (où d'autres domaines furent aussi enlevés) suivirent [297] (voir Figure 14). Ces constructions sont nommées mini-dystrophine (mDYS), ou micro-dystrophine (μ DYS) lorsque la partie C-terminale de la dystrophine ait aussi enlevée.

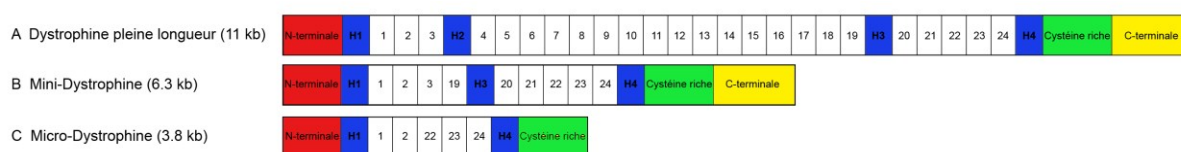


Figure 14 : Versions tronquées de la dystrophine. (A) Schéma de la dystrophine dite pleine longueur. (B) Schéma d'une mini-dystrophine. Elle est caractérisée par l'absence d'une partie du domaine central de la dystrophine (délétion H2-19 dans cette version). (C) Schéma d'une micro-dystrophine. Elle est aussi caractérisée par la délétion d'une partie du domaine central de la dystrophine. On note cependant que cette dernière est souvent bien plus importante dans une micro-dystrophine que dans une mini-dystrophine, l'exemple ci-dessus montre une délétion 3-21. La région C-terminale de la dystrophine est également manquante dans une micro-dystrophine.

De nombreuses souris transgéniques n'exprimant qu'une de ces formes tronquées de la dystrophine furent générées et analysées [296, 298, 299]. Il ressort de ces études que peu importe que ça soit les μ Dys ou les mDYS qui soient exprimées, il y a expression du DGC. Néanmoins, l'expression sarcolemmique des syntrophines et du nNOS est plus forte lorsque la partie C-terminale est présente [300]. Cela étant dû au fait que l' α -dystrobrevine recrutée par les sarcoglycanes peut aussi lier ces deux protéines. Outre le fait de restaurer le DGC, l'histologie générale des muscles est également améliorée dans ces souris transgéniques : moins d'infiltration leucocytaire et diminution du nombre de fibres centronucléées. La force de ces souris est aussi augmentée, mais bien que plus fortes que les souris *mdx*, elles restent toujours moins fortes que les souris sauvages. Les améliorations observées varient toutefois selon le nombre d'exons du domaine central de la dystrophine présent dans ces souris transgéniques. La présence des régions charnières, en particulier H3, semble d'ailleurs importante pour une meilleure amélioration phénotypique de la souris [301].

Les formes tronquées de la dystrophine sont intéressantes mais il faut garder en tête que la meilleure restauration possible du phénotype dystrophique reste l'utilisation de la FLDYS.

5.2 Thérapie génique virale

Les premiers vecteurs viraux ont été développés dans les années 80. Au fur et à mesure des années, les chercheurs ont optimisé ces vecteurs pour qu'ils contiennent de moins en moins de gènes viraux tout en gardant leur efficacité de transduction. Avant d'aborder la partie des résultats obtenus avec les différents vecteurs viraux dans le cadre de la DMD, une brève description de ces vecteurs va être faite dans la prochaine section.

5.2.1 Les vecteurs viraux

Les vecteurs viraux que nous allons passer en revue sont les lentivirus, les adénovirus et les virus associées aux adénovirus (AAV). Nous nous arrêterons particulièrement sur les lentivirus puisqu'ils sont utilisés dans cette présente thèse.

5.2.1.1 Lentivirus

Les lentivirus font partie de la famille des rétrovirus. Une caractéristique de ces lentivirus est leur faculté à pouvoir infecter des cellules sans qu'elles soient en division [302]. Le principal lentivirus utilisé est celui dérivé du virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (HIV-1) et c'est ce virus qui sera pris en exemple pour illustrer les lentivirus. Les lentivirus sont des virus enveloppés à simple brin d'ARN de polarité positive d'un diamètre variant de 80 à 100 nm. La capsid virale contient deux copies du génome viral ainsi que l'intégrase, la protéase et la transcriptase inverse nécessaires à l'infection. Dans son génome, on retrouve 3 gènes structuraux que ce sont Gag, Pol et Env ; qui sont par ailleurs communs à tous les rétrovirus. En plus de ces gènes structuraux, il y a 2 gènes régulateurs : Tat et Rev, et 4 gènes accessoires : Vif, Vpr, Vpu et Nef (voir Figure 15). Outre ces gènes, des séquences bien particulières sont aussi présentes dans le génome lentivirale telles que les LTRs, PBS, ψ , RRE et cPPT. Ces gènes et séquences vont être brièvement décrits dans la prochaine section.

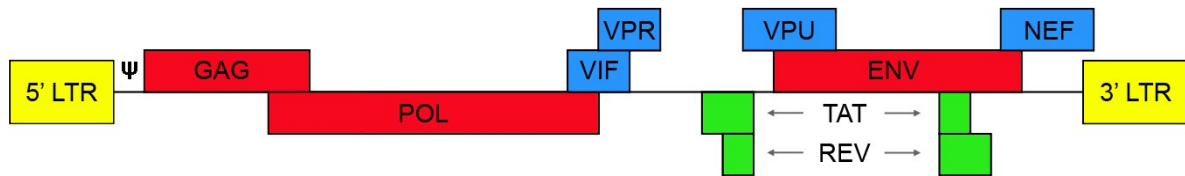


Figure 15 : Génome du HIV-1. Les séquences LTRs sont colorées en jaune, les 3 gènes structuraux en rouge, les 2 gènes régulateurs en vert et les 4 gènes accessoires en bleu. La séquence d'encapsidation ψ y est également représentée.

Les gènes et séquences du HIV-1

Gènes structuraux

Le produit Gag est clivé en différentes sous-unités protéiques :

- MA (matrice) est essentiel pour l'assemblage de la particule virale ;
- CA (capside) joue aussi un rôle dans l'assemblage de la particule virale mais également dans sa maturation ;
- NC (nucléocapside) assure le bon maintien de l'ARN viral au sein de la particule virale ;
- et plusieurs polypeptides de petites tailles comme p1, p2 ou p6 dont les rôles ne sont pas encore entièrement déterminés.

Le gène Pol code pour 3 enzymes impliqués dans la réplication virale : une protéase (PRO), une transcriptase inverse (RT) et une intégrase (IN).

Le gène Env permet l'expression des glycoprotéines gp120 et gp41 à la surface du virus formant ainsi son enveloppe. La glycoprotéine gp120 permet la liaison du virion à la cellule alors que gp41 est impliquée dans sa fusion avec la membrane cellulaire [303].

Gènes régulateurs

L'exportation de l'ARN viral du noyau au cytoplasme nécessite deux interactions et cela est permis par la protéine Rev. D'un côté, elle contient un signal d'exportation nucléaire (NES) permettant ainsi d'interagir avec la séquence dépendant de Rev (RRE) localisée dans le génome viral, et d'un autre côté elle interagit avec les nucléoporines du noyau. Ainsi liée à un ARN, Rev permet l'exportation de cet ARN du noyau au cytoplasme [304].

L'autre gène régulateur Tat code pour une protéine ayant comme caractéristique d'être un activateur fort de la transcription. En se liant à la région active de transactivation (TAR) présente en 5' des nouveaux brins d'ARN, elle permet d'accroître le nombre d'ARN viraux produits [305].

Gènes accessoires

Vif, Vpr, Vpu et Nef sont des gènes impliqués dans la virulence du HIV-1 et sont nommés « accessoires » car non essentiels à la réplication virale en culture cellulaire.

Séquences importantes

Outre la RRE décrite ci-dessus, d'autres séquences sont toutes aussi importantes pour le HIV-1 [306]. Les LTRs (Long Terminal Repeat) sont des séquences que l'on retrouve à chaque extrémité suite à la transcription du génome viral. Ces séquences sont une suite de séquences U3 – R – U5. Ces séquences agissent comme promoteur en 5' entre U3 et R, et comme signal de polyadénylation en 3' entre R et U5. Malgré le fait que le promoteur LTR soit faible, il est renforcé par la présence de la protéine TAT. Le LTR en 5' est suivi du PBS (Primer Binding Site) requis pour l'initiation de la transcription inverse et de la séquence ψ requise pour l'encapsidation de l'ARN viral. Une autre séquence importante est le cPPT (central PolyPurine Track). Son rôle n'est pas encore entièrement déterminé mais il semble qu'elle permettrait à l'ADN viral de se conformer d'une certaine manière à pouvoir accéder au noyau sans attendre que la cellule soit en mitose [307]. Il semblerait que le cPPT aurait aussi un rôle dans la réverse transcription [308].

Cycle du lentivirus

Afin de rester concis, le cycle viral du lentivirus sera décrit sans tenir compte de sa virulence (voir Figure 16). Comme déjà mentionné, la capsid virale du lentivirus contient deux copies du génome viral ainsi que l'intégrase, la protéase et la transcriptase inverse. Le virion se fixe sur les récepteurs CD4 de la cellule cible via sa glycoprotéine de surface gp120 et entre dans la cellule via la fusion des membranes initiée par gp41. La présence de corécepteurs tels que CCR5 ou CXCR4 est également importante pour une bonne infection du VIH. Une fois dans la cellule, le génome viral est alors transcrit en ADN viral via la RT.

La PRO permet de cliver les nouvelles polyprotéines synthétisées afin de les rendre matures. L'ADN rentre dans le noyau et s'intègre à l'ADN hôte via son IN. L'intégration d'un lentivirus se fait au hasard mais les zones d'intégration correspondent à des zones où la chromatine est lâche et donc plus facile d'accès [309] et où la transcription est très active [310]. Après l'intégration du génome viral, la transcription de ses gènes peut alors débuter via le LTR présent en 5'. Une première phase va permettre l'expression des protéines de régulation TAT et REV. Lorsqu'il y aura suffisamment de REV, celui-ci va permettre l'exportation des longs transcrits qui vont donner les protéines de structure. L'ARN viral va alors être exporté vers le cytoplasme où s'assemblent déjà les protéines de l'enveloppe et de la capsid. L'ARN viral y sera subséquemment encapsidé via la séquence ψ et les particules virales vont pouvoir alors bourgeonner.

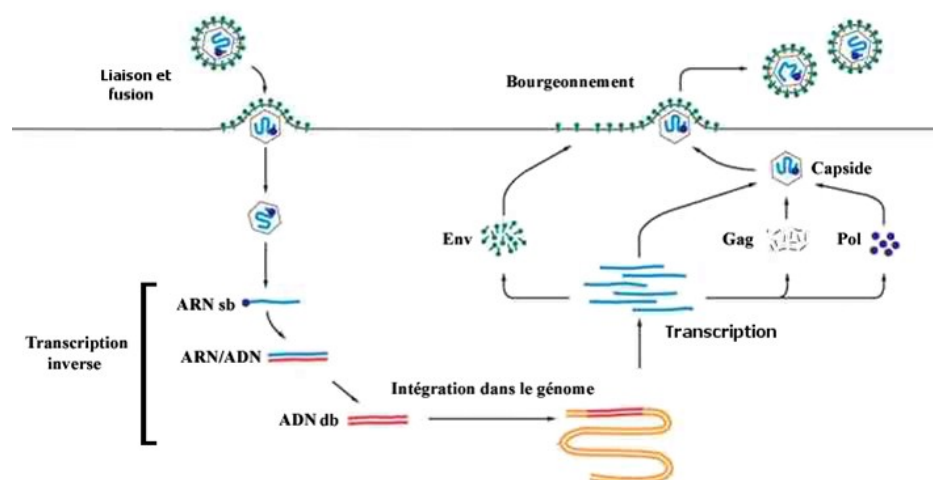


Figure 16 : Cycle du HIV-1. Suite à la liaison et la fusion de la particule virale avec la cellule hôte, le génome viral va être libéré dans le cytoplasme où il sera transcrit en ADN double brin. Suite à son exportation dans le noyau, il s'intégrera dans le génome hôte. Il y aura alors expression des gènes viraux et production de nouvelles particules virales qui sortiront de la cellule par bourgeonnement. Schéma fourni par Simon Quenneville.

Le lentivirus comme vecteur viral

La première génération de lentivirus est basée sur la transfection transitoire de 3 plasmides. Le premier plasmide code pour tous les gènes viraux du HIV-1 excepté Env et Vpu, le deuxième code pour l'enveloppe et le troisième pour le gène d'intérêt. Ce dernier est placé

entre les deux LTRs avec son propre promoteur. La taille maximale d'encapsidation du lentivirus est d'environ 8 kb. Le premier vecteur lentiviral fut développé en 1996 [302] et bien qu'il démontra son efficacité à infecter des cellules, ses particules virales contenaient toujours les protéines Vif, Vpr et Nef impliquées dans la virulence du HIV-1. Une seconde génération de lentivirus fut alors initiée afin d'enlever la présence de ces gènes [311]. Afin de réduire encore plus le nombre de gènes viraux présent dans le lentivirus produit, une troisième génération fut également développée [312]. Cette dernière génération est basée sur la transfection transitoire de 4 plasmides (voir Figure 17). Le premier code pour l'enveloppe, le deuxième pour Gag/Pol, le troisième pour Rev et le dernier contient le gène d'intérêt. Dans le but d'éviter que les LTRs soient actifs d'une manière ou d'une autre, sa séquence peut être mutée. Cette modification est nommée SIN (Self-INactivating) [313]. Afin d'augmenter l'expression du transgène, une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element) peut être placée en 3' du transgène [314].

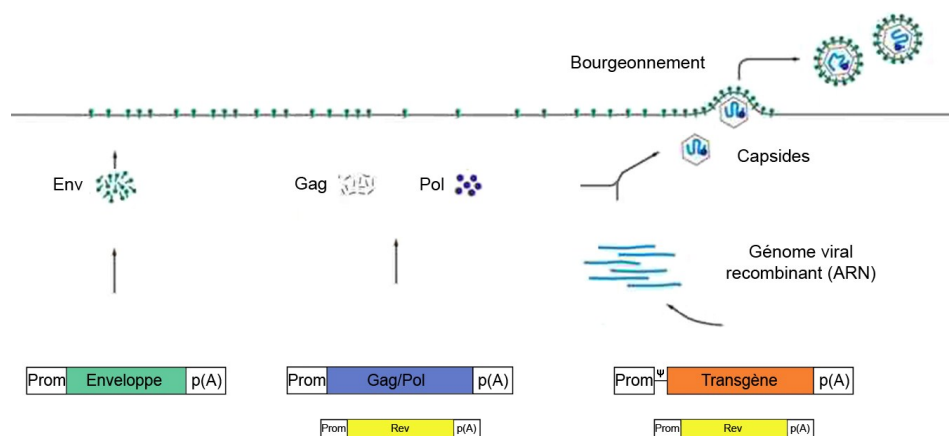


Figure 17 : Production du lentivirus. Schéma décrivant la technique de transfection des 4 plasmides. Le plasmide VSV-G va permettre l'expression de la protéine d'enveloppe. Gag/Pol va coder pour les protéines de la capsid virale (via GAG) et pour la RT, PRO et IN (via POL). Le transgène va être transcrit en ARN, exporté au cytoplasme via REV et y être encapsidé. Les particules virales vont alors bourgeonner et seront récupérées dans le surnageant de culture. Schéma fourni par Simon Quenneville.

Comme mentionné ci-haut, les vecteurs lentiviraux sont produits par méthode de transfection. Différents plasmides (3 ou 4) sont à introduire selon qu'on désire un lentivirus de seconde ou de troisième génération. Il est important de noter que le gène d'enveloppe le

plus utilisé est le VSV-G (Vesicular Stomatitis Virus – G glycoprotein) car son récepteur est très ubiquitaire [315]. Ces trois ou quatre plasmides sont alors transfectés dans des HEK 293T (cellules rénales embryonnaires humaines immortalisées) car facilement transfectables (voir Figure 17). Les protéines de la capsidie et de l'enveloppe sont obtenues par Gag et Env. Rev va exporter rapidement l'ARN viral vers le cytoplasme via la séquence RRE où il va pouvoir y être encapsidé via sa séquence ψ . Il est à noter que RT, PRO et IN sont aussi présentes dans la capsidie virale. Les particules virales vont alors bourgeonner de la cellule et il ne restera plus qu'à récupérer le surnageant. Les titres obtenus sont d'environ de 10^6 à 10^7 particules virales par mL et peuvent être plus élevés suite à l'ultrafiltration ou l'ultracentrifugation. Les lentivirus peuvent également être produits par des lignées stables qui ont intégrées dans leurs chromosomes les gènes du lentivirus.

Le lentivirus ainsi obtenu contient les séquences nécessaires à l'intégration de son transgène dans le génome hôte tout en étant non répliatif. En date de décembre 2009, 27 essais cliniques utilisant des lentivirus furent répertoriés [316].

5.2.1.2 Adénovirus

Brève description

Les adénovirus sont connus depuis plus de 50 ans et sont responsables chez l'Homme de problèmes au niveau de l'appareil respiratoire et ce, principalement chez l'enfant (environ 10 % des cas de gastroentérite) [317]. Ces virus sont non enveloppés à double brins d'ADN d'environ 38 kb et font 90 à 100 nm de diamètre. Leur génome contient des gènes exprimés en deux vagues : les gènes précoces et les gènes tardifs. Tout comme pour les lentivirus, il existe des séquences génomiques qui sont nécessaires à la répliation de l'adénovirus telles que les séquences ITRs (Inverted Terminal Repeats) qui bordent son génome et ψ , sa séquence d'encapsulation. Il existe par ailleurs plus de 50 sérotypes différents [318].

L'adénovirus comme vecteur viral

La conception des vecteurs adénoviraux repose sur le même principe que tous vecteurs viraux, enlever les gènes viraux pour éviter toute répliation et obtenir le moins de toxicité possible. Une première génération d'adénovirus a été construite en enlevant les gènes

précoces E1A et E1B puis une seconde génération en enlevant plus de gènes viraux. Cependant, des problèmes d'immunogénicité ont été parfois rencontrés avec ces deux types de vecteurs car il existe de nombreux anticorps préexistants chez l'Homme [319]. De ce fait, une troisième génération de vecteur nommée « gutless » a été développée où il ne reste plus que les ITRs et ψ résultant à une taille de transgène disponible de près de 37 kb [320, 321]. Cependant, il existe toujours le même problème d'anticorps préexistants avec cette troisième génération d'adénovirus. Leur production reste néanmoins plus compliquée car elle nécessite une complémentation des gènes manquants avec un virus de première génération et après production, une élimination de ce dernier virus est requise. Le résultat obtenu est cependant intéressant car très peu de protéines virales sont exprimées [322]. Il est à noter que comme ce virus ne possède pas d'intégrase, il est considéré comme un vecteur viral non-intégratif. Sa présence diminue donc au fur et à mesure des divisions cellulaires. En date de décembre 2009, 379 essais cliniques utilisant des adénovirus furent répertoriés [316].

5.2.1.3 AAV

Brève description

Ce virus est considéré comme non pathogène et a été la première fois décrit comme contaminant de culture d'adénovirus [323]. Ces virus sont non enveloppés, font environ 20 nm de diamètre et contiennent un simple brin d'ADN d'environ 4.7 kb. On ne retrouve que deux gènes dans son génome : Rep et Cap. Les protéines découlant de Rep sont impliquées dans la réplication et l'intégration du virus alors que Cap code pour les protéines de la capsid. Il est à noter que l'intégration se passe dans des sites spécifiques pour le virus sauvage mais pas pour le virus qui est utilisé comme vecteur viral. Aux extrémités du génome viral de l'AAV, on retrouve des séquences TRs (Terminal Repeat) nécessaires pour sa réplication et son encapsidation. Cependant, il est incapable de se répliquer sans la présence de certaines protéines virales fournies par un adénovirus ou un virus de l'herpès [324]. On dénombre actuellement 12 sérotypes différents d'AAV [325].

L'AAV comme vecteur viral

Pour pouvoir utiliser l'AAV comme vecteur viral, les gènes Rep et Cap ont été enlevés afin de ne conserver que les TRs. Cela permet de pouvoir y mettre jusqu'à 4.6 kb d'ADN exogène. Rep n'étant plus présent, le vecteur AAV n'a donc plus la propriété intégrative dans le génome hôte. Même si en absence de Rep, le vecteur s'intègre toujours dans l'ADN génomique de manière non spécifique et très sporadique, on considère plus les AAVs utilisés en thérapie comme persistants [326, 327]. Cette persistance viendrait de la résistance des TRs à la dégradation [326].

Les vecteurs AAVs peuvent être produits par deux méthodes différentes [328]. La première consiste à cotransfecter des cellules HEK 293 avec trois différents plasmides : un codant pour le transgène à introduire borné par les TRs, un autre contenant Rep et Cap, et un dernier codant pour les gènes nécessaires à la réplication des AAVs. La deuxième méthode consiste aussi à transfecter les plasmides contenant TR – transgène – TR et celui contenant Rep et Cap mais les gènes nécessaires à la réplication des AAVs ne sont pas apportés par un plasmide. Ces gènes sont soit apportés par un vecteur adénoviral ou herpétique [329] ou soit par des cellules productrices [330] qui sont alors directement transfectées avec les deux autres plasmides. Lors d'utilisation de virus pour compléter la production d'AAV, les particules adénovirales ou herpétiques doivent cependant être éliminées. Les titres obtenus peuvent atteindre jusqu'à 10^{14} particules virales par mL après purification et ultracentrifugation [331]. En date de décembre 2009, 71 essais cliniques utilisant des AAVs furent répertoriés [316].

5.2.2 Résultats obtenus dans le cadre de la DMD

5.2.2.1 Lentivirus

Dès 1997, un lentivirus codant pour la GFP fut injecté en intramusculaire chez le rat [332]. La moitié du muscle injecté exprimait le transgène jusqu'au moins 8 semaines après l'injection du lentivirus. Une expérience à plus long terme montra l'expression de β -galactosidase jusqu'à 14 mois après son injection en intramusculaire chez des rats [333]. La première utilisation du vecteur lentiviral dans le cadre de la DMD eut lieu en 2003. Comme la taille d'encapsulation du lentivirus ne permet pas d'y introduire la FLDYS, c'est la

mDYS de souris qui y fut incorporée [334]. Ce lentivirus fut alors injecté en intramusculaire dans des souris *mdx* nouveau-nées ou adultes. Les meilleurs résultats furent obtenus chez les souris les plus jeunes où 65 % du muscle injecté exprimait la mDYS 4 mois après l'injection. Dans ces muscles, une amélioration de 20 % de la force spécifique et une résistance accrue aux dommages furent observées. L'injection d'un tel lentivirus en intramusculaire permit aussi d'infecter les cellules satellites [335]. Le lentivirus a montré de bons résultats de transduction chez des petits rongeurs mais ces résultats restent à confirmer chez de grands animaux tels que le chien ou le primate non-humain. Malgré ces bons résultats, il faut tout de même faire attention au fait que les lentivirus s'intègrent dans le génome hôte de manière non spécifique ; même si aucune trace de tumeur ne fut mentionnée dans les travaux cités ci-dessus.

Le lentivirus peut aussi être utilisé pour infecter des cellules qu'on transplante ou qu'on injecte par la suite dans un animal par voie locale ou systémique. Cette méthode est appelée la thérapie génique *ex vivo* (voir Figure 18). Des lentivirus codant pour la μ Dys ou la mDys ont été utilisés de cette manière dans le cadre de la DMD. En 2004, des cellules SP de souris furent infectées avec un lentivirus codant pour la μ Dys humaine puis injectées en intraveineux dans des souris *mdx* mais moins de 1 % des fibres musculaires du TA ou du quadriceps exprimèrent la μ Dys [336]. Ce pourcentage fut augmenté à 5 % environ lorsque ces cellules furent injectées de manière intra-artérielle [337]. Des mésoangioblastes de chiens dystrophiques ont aussi été infectés avec un lentivirus codant pour la μ Dys humaine puis injectés en intra-artériel dans ces mêmes chiens. Les chiens traités montrèrent une bonne expression de μ Dys humaine mais deux des trois chiens traités sont morts de pneumonie [230]. La cause de ces décès ne fut pas expliquée par les auteurs de l'article mais on peut cependant penser que l'accumulation des cellules injectées au niveau du poumon peut y être pour quelque chose. Notre équipe a aussi démontré que la thérapie génique *ex vivo* était aussi faisable avec des myoblastes. En effet, des myoblastes humains infectés avec un lentivirus codant pour la μ Dys humaine puis transplantés dans le TA de souris immunodéficientes (SCID) a permis l'expression du transgène dans 45 % des fibres musculaires du muscle transplanté. L'autotransplantation de myoblastes de primates non-humains infectés avec ce même virus a aussi permis l'expression de μ Dys dans les muscles

transplantés [338]. Tout comme avec l'injection de lentivirus directement dans l'organisme, il faut faire attention au risque de tumorigénicité des cellules infectées avec un lentivirus.

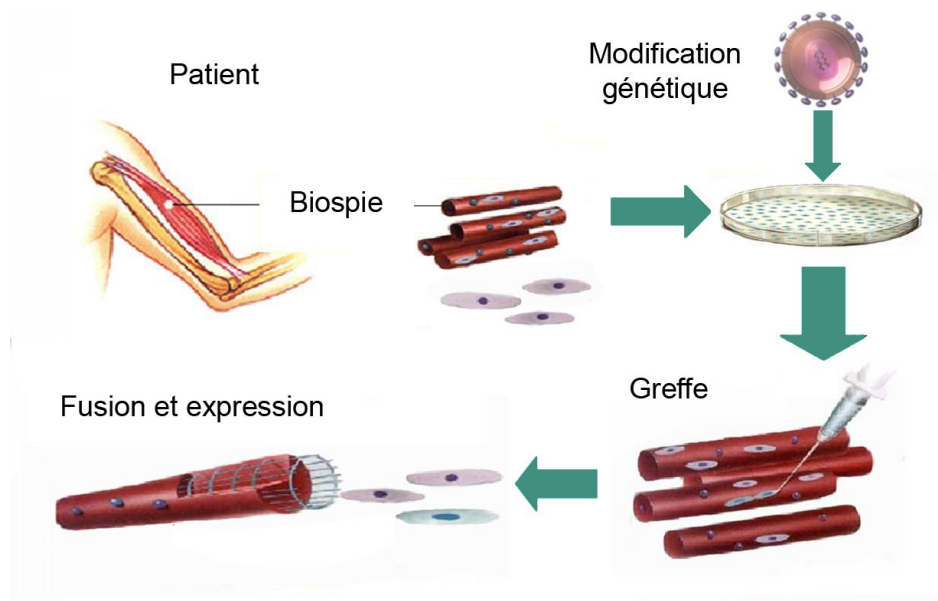


Figure 18 : Thérapie génique *ex vivo*. Suite à une biopsie musculaire chez un patient donné, les myoblastes extraits sont mis en culture puis génétiquement modifiés avec un virus. Ces cellules sont ensuite proliférées puis transplantées dans les muscles de ce même patient.

En plus de la possibilité de délivrer une version tronquée de la dystrophine par un vecteur lentiviral de manière *ex vivo*, on peut aussi utiliser l'approche du saut d'exon avec ce vecteur. Cela a été fait en modifiant le gène U7 qui code à la base pour un petit ARN impliqué dans la maturation des pré-ARN d'histones [339]. Une partie de sa séquence peut être modifiée pour qu'il donne un ARN anti-sens et ainsi provoquer le saut d'exon désiré. Ces modifications ont été faites dans le gène U7 pour permettre le saut de l'exon 51 dans le gène de la dystrophine humaine. Des myoblastes d'un patient DMD ayant la délétion des exons 49 et 50 ont été infectés avec ce virus puis transplantés dans des muscles de souris SCID. La présence de la dystrophine (manquant les exons 49 à 51) a été détectée jusqu'à 10 semaines dans les muscles traités [338]. Cela a aussi été réalisé avec succès en utilisant des cellules AC133+ [340].

L'utilisation d'un lentivirus comme approche thérapeutique dans la DMD est donc prometteuse mais il faut néanmoins faire attention au risque de tumorigénicité de ce vecteur viral.

5.2.2.2 Adénovirus

Les adénovirus de première génération ont permis de délivrer la mDYS dans des muscles de souris *mdx* [341] et d'ainsi améliorer leur force [342], et cela sur plusieurs mois [343] malgré le fait que l'adénovirus ne soit pas intégratif. Cette durée d'expression est due au fait que les fibres musculaires sont composées de cellules post-mitotiques. Dans ces premiers essais, on remarque cependant que l'injection d'adénovirus montre toujours de biens meilleurs résultats dans des souris nouveau-nées que dans des souris adultes [344]. Cela s'explique par le fait que le système immunitaire de la souris nouveau-née n'est pas encore entièrement mature. L'adénovirus a aussi été testé chez le chien GRMD où l'expression de la mDYS a pu être observée mais également une réponse immunitaire contre l'adénovirus [345]. Outre cette expérience chez le chien, d'autres expériences ont également montré l'induction d'une réponse immunitaire suite à une injection d'adénovirus. De ce fait, des constructions adénovirales ne contenant plus de gènes viraux ont été développées. En enlevant ces gènes, la capacité d'encapsidation a par ailleurs augmenté pouvant ainsi permettre d'y inclure la FLDYS. Des injections d'adénovirus codant pour la FLDYS de souris ont alors été faites dans la souris *mdx* nouveau-nées. Elles permirent d'obtenir l'expression de cette dystrophine dans 50 % des fibres et ce jusqu'à 1 an après l'injection du virus [346]. Même si cette expression est stable durant un an, on ne sait pas ce qu'il adviendra à plus long terme lorsqu'administré à un patient dystrophique. De plus, l'utilisation du vecteur adénoviral est compliquée vu que la moitié de la population humaine possède déjà des anticorps contre la capsid de l'adénovirus [319].

Une autre approche intéressante avec ce vecteur viral est l'introduction du gène de l'utrophine. En effet, cette protéine similaire à la dystrophine peut être encapsidée dans un adénovirus. Des adénovirus codant pour l'utrophine ont donc été injectés dans des TA de souris *mdx*. Deux mois après l'injection, jusqu'à 35 % d'expression d'utrophine fut retrouvée dans les muscles traités. Des améliorations du phénotype de la souris

dystrophique furent aussi observées telles que la restauration de certaines protéines du DGC, une résistance accrue à l'Evans Blue où une diminution du nombre de fibres centronucléées [347]. Cependant, une étude récente montre que l'utrophine est incapable de recruter nNOS au sarcolemme amenant donc à une ischémie précoce du muscle même en présence d'utrophine [348].

Bien qu'il ne soit pas intégratif, l'adénovirus est un outil viral intéressant car il permet de pouvoir encapsider la FLDYS. Cependant sa capacité immunogénique nuit à son utilisation en clinique.

5.2.2.3 AAV

Comme mentionné précédemment, il existe différents sérotypes de vecteurs AAV. Les sérotypes les plus utilisés dans le muscle sont le 1, 2, 6, 8 et 9. L'AAV s'est montré efficace que ce soit par voie locale ou systémique [349]. La taille d'encapsidation de l'AAV étant limitée, seules les formes tronquées de la dystrophine ont pu être utilisées avec ce vecteur viral. Des AAVs de sérotypes 1 [300] et 2 [350] codant pour la μ Dys ont été injectés dans des muscles de souris *mdx* avec succès. En effet, jusqu'à 80 % du muscle injecté pouvait exprimer la version tronquée de la dystrophine tout en restaurant le DGC et le phénotype de la souris. Des expériences ont aussi été réalisées chez le chien avec des AAVs de sérotypes 6 et 8 mais bien que l'expression de la μ Dys fût observée, une réponse immunitaire contre la capsid virale fut également détectée [351, 352]. Cette réponse immunitaire contre la capsid de l'AAV fut également observée pour d'autres transgènes chez le chien [353]. Un AAV8 codant pour μ Dys a aussi été introduit chez le primate non-humain. À 5 mois, l'expression de μ Dys atteint environ 80 % dans le muscle traité mais descend environ à 40 % lorsque l'animal possède des anticorps préexistants contre l'AAV [354]. Il reste cependant à éclaircir ces résultats quelque peu divergents à propos de la réponse immunitaire engendrée contre la capsid virale.

L'approche du saut d'exon fut aussi abordée avec l'AAV. Un AAV1 codant pour le gène U7 modifié pour permettre l'épissage de l'exon 23 de la dystrophine de souris a été injecté à des souris *mdx*. L'expression de la dystrophine tronquée de l'exon 23 fut observée jusqu'à

3 mois après l'injection [355]. Une plus récente expérience montra même que cette expression peut être stable durant presque 1 an et demi chez la souris [356]. Ces résultats semblent encourageants mais cette approche reste cependant à être démontrée chez de plus grands animaux.

Les AAV ont aussi été utilisés pour interférer avec la voie de la myostatine. Un AAV codant pour le propeptide de la myostatine, un inhibiteur de la myostatine, a été injecté dans des souris *mdx*. L'injection de ce vecteur viral permet ainsi d'améliorer le phénotype des souris traitées en induisant une hypertrophie musculaire [357]. Ce même vecteur fut par la suite testé chez le chien. Malheureusement, peu de paramètres furent étudiés dans cette étude et elle permit juste de conclure à l'hypertrophie de certains muscles et cela, 3 mois après l'injection du virus [358]. Cependant, à l'inverse des études chez le chien avec la μ Dys, aucun signe de réponse immunitaire contre la capsid virale ne fut observé.

Ces résultats restent tout de même intéressants pour le développement de thérapie à la base de vecteurs AAVs. Cependant, le comportement à long terme de l'AAV reste à être analysé que ce soit du point de vue de l'expression du transgène pour lequel il code ou de la réponse immunitaire engendrée par sa capsid.

5.3 Thérapie génique non virale

La thérapie génique non virale permet d'introduire un transgène dans un tissu sans l'utilisation de virus. Cette technique a comme principal avantage d'éviter la réponse immunitaire qui peut être engendrée par la capsid virale ou toutes autres protéines virales. La taille du transgène à introduire n'est pas non plus limitée par la capacité d'encapsidation des vecteurs viraux. Les vecteurs non viraux sont en fait des plasmides d'ADN. Avant de nous attarder sur les méthodes utilisées pour introduire les vecteurs non viraux dans le muscle, nous allons commencer par décrire ces vecteurs non viraux.

5.3.1 Vecteur non viral

Comme mentionné, les vecteurs non viraux sont des plasmides d'ADN. Ces derniers étant produits dans des bactéries, il faut y inclure une origine de répllication bactérienne. Celle

qui est la plus utilisée est ColE1 d'*Escherichia coli* car elle permet d'obtenir un grand nombre de copie de plasmide dans les bactéries. Pour permettre leur sélection, un gène de résistance à un antibiotique tel que l'ampicilline ou la kanamycine est inclus dans la construction plasmidique. Le gène d'intérêt que l'on veut faire exprimer est lui sous la forme d'un ADNc. Afin de permettre l'expression de ce gène, il est placé sous le contrôle d'un promoteur.

5.3.2 Injection d'ADN nu

La manière la plus simple de délivrer un plasmide dans un muscle est de l'injecter à l'aide d'une aiguille. Cela fut fait dès 1990 avec un plasmide codant pour la β -galactosidase [359] et l'année d'après pour des plasmides codant pour la mDYS et la FLDYS [360]. Cependant, le nombre de fibres exprimant ces transgènes fut très faible. Néanmoins, l'expression de ces transgènes peut durer jusqu'au moins 6 mois dans le temps [361]. Cela étant dû au fait que le renouvellement des fibres musculaires est faible puisqu'elles sont composées des cellules post-mitotiques. Un essai de phase I fut par la suite effectué en 2004 sur des patients BMD et DMD [362]. Ces patients furent injectés en intramusculaire avec un plasmide codant pour la FLDYS. Les 2 patients DMD traités ne montrèrent aucune fibre dystrophine positive. Sur les 7 patients BMD traités, hormis chez un patient où on dénombra 20 fibres dystrophine positive pour 310 fibres comptées, juste 2 ou 3 fibres dystrophine positive furent détectés chez les autres patients.

Bien que l'utilisation de plasmides nus semble intéressante dans le fait que cette méthode est rapide, que les vecteurs sont faciles à produire et plus sécuritaire que l'injection de virus, son efficacité reste faible. Afin d'améliorer l'efficacité de transfection des plasmides, des méthodes chimiques ou physiques peuvent être utilisées. Ces différentes méthodes vont être passées en revue dans les prochaines sections.

5.3.3 Méthodes chimiques

5.3.3.1 Lipoplexes

L'ADN peut être recouvert par des lipides pour former des micelles ou des liposomes afin de faciliter l'entrée du plasmide dans un tissu donné. Le complexe ainsi formé est nommé lipoplexe. Les lipides qui donnent les meilleurs résultats sont chargés positivement. Ils se complexent donc bien avec l'ADN qui est chargé négativement formant ainsi un ensemble compacte afin qu'il soit moins exposé aux nucléases. Il possède également des groupements chargés positifs qui permettront une meilleure pénétration dans la cellule. Un exemple de ces composés est le polyéthylène glycol. Ces composés se sont montrés efficace *in vitro* mais le furent beaucoup moins *in vivo*. De plus, une certaine toxicité fut observée dans les cellules traitées avec ces lipoplexes [363].

5.3.3.2 Polyplexes

Outre la possibilité de faire des complexes lipides/ADN, on peut aussi l'associer avec des polymères. Le plus connu d'entre eux est le polyéthylène imine. Le polyplexe fonctionne de la même manière que le lipoplexe dans le sens où il se fixe sur la membrane plasmique via ses charges positives. Cependant, il est libéré dans le cytoplasme sous forme d'endosome alors que le lipoplexe l'est sous forme de liposome. Son efficacité est similaire à celle des lipoplexes, c'est-à-dire que ça fonctionne bien *in vitro* mais beaucoup moins *in vivo* [364].

5.3.3.3 Poloxamères

Les poloxamères sont des polymères non ioniques composés d'une chaîne centrale hydrophobe de polyoxypropylène et de 2 chaînes hydrophiles de polyoxyéthylène. Ces composées sont connus sous le nom de « Pluronic ». Leur mode d'action n'est pas encore entièrement connu pour l'instant mais il semblerait qu'ils agissent au niveau des lipides en formant des pores dans les membranes biologiques [365]. Ces composées semblent moins toxiques que les autres composés chimiques permettant d'enrober l'ADN. L'efficacité des poloxamères semble être meilleure que celle des autres polymères dans le muscle mais il

est difficile dévaluer l'efficacité de cette méthode puisqu'aucune donnée quantitative de l'expression n'a été présentée [366].

Bien que les méthodes chimiques aient montré de bons résultats *in vitro*, les lipoplexes et les polyplexes se sont avérés toxiques (formation d'agrégats) et peu efficaces *in vivo*. Concernant les poloxamères, il reste à démontrer leur efficacité dans le contexte de la DMD.

5.3.4 Méthodes physiques

5.3.4.1 Pression hydrodynamique

De bons niveaux d'expression de transgènes peuvent être obtenus après une injection rapide d'un grand volume d'ADN nu [367]. Cette injection intraveineuse en présence d'un tourniquet permet de disperser l'ADN nu dans le milieu extracellulaire et de la faire pénétrer dans les fibres musculaires des muscles du membre inférieur [368]. En effet, due à la pression systémique occasionnée, il se crée comme des pores dans l'endothélium des vaisseaux sanguins permettant ainsi au plasmide de pénétrer dans les muscles environnants [369]. Cependant, lorsqu'on analyse un muscle ainsi traité, la majorité du plasmide injecté reste tout de même au niveau de l'endothélium des vaisseaux sans avoir pu le traverser [370]. La quantité de plasmides pénétrant des fibres musculaires peut être majorée en prolongeant la durée d'exposition du plasmide. Cette méthode s'est montrée sécuritaire dans de nombreux animaux tels que les rongeurs ou les primates non-humains [368]. Cette technique fut utilisée dans des souris *mdx* avec un plasmide codant pour la mDYS et entre 15 et 20 % des fibres exprimèrent cette dystrophine pendant plus d'un an après l'expérience [371]. Une amélioration du phénotype de la souris dystrophique fut aussi observée. Cependant, il reste à confirmer ces résultats chez de plus grands animaux.

5.3.4.2 Sonoporation

Via des ultra-sons, il est aussi possible d'améliorer la transfection des plasmides dans un tissu. Cette technique s'est montrée efficace à délivrer des transgènes dans les muscles

squelettiques [372] ainsi que dans le muscle cardiaque [373]. Bien que cette technique ait montré que les muscles traités n'étaient quasiment pas endommagés [374], son efficacité reste à être améliorée pour pouvoir être considérée comme approche potentielle dans le cadre de la DMD.

5.3.4.3 Électroporation

Une troisième méthode physique pour accroître l'efficacité de transfection des plasmides dans un muscle est l'électroporation (voir Figure 19). Cette méthode permet via un courant électrique de faire pénétrer un plasmide préalablement injecté dans le muscle [375, 376]. Le choc électrique perméabilise la membrane cellulaire créant des pores temporaires favorisant l'entrée de plasmides dans la cellule. En même temps, ces pores vont aussi favoriser la libération du Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire qui peut par la suite activer certaines protéases [377]. Il est donc important de doser le voltage afin d'avoir un maximum d'efficacité tout en ayant le moins de dommage possible. Tout comme avec la pression hydrodynamique, l'électroporation permet d'obtenir l'expression d'un transgène pendant plus d'un an dans un muscle squelettique [378]. Le muscle cardiaque peut aussi être traité avec cette technique d'après un article récent [379]. Une étude montra également que les cellules satellites pouvaient être transfectées avec cette technique [380]. Cependant, cette étude reste isolée et n'a jamais été confirmée par la suite. Afin de comprendre ce mécanisme, il faut analyser l'équation de Schwann qui décrit le potentiel transmembranaire qui est induit par un courant électrique [381]. Celle-ci énonce que l'intensité nécessaire pour obtenir une déperméabilisation membranaire est inversement proportionnelle au rayon. Or le rayon d'une cellule satellite est bien plus petit que celui des fibres musculaires d'où une incapacité à transfecter ces cellules lorsqu'on veut électroporer en même temps des fibres musculaires.

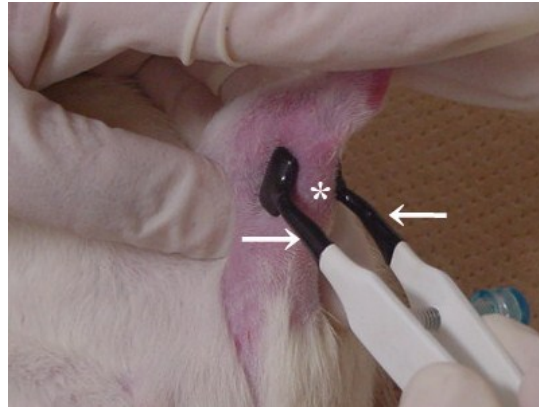


Figure 19 : Électroporation dans un muscle. Photo d'une souris où un de ses muscles a été injecté avec une solution plasmidique (au niveau de l'astérisque). Les électrodes sont par la suite placées autour du site d'injection (flèches) et un courant électrique y sera délivré. Tirée de Kawai *et al.* [382].

Depuis le premier essai clinique réalisé en 1991 [383], l'électroporation de plasmides s'est montrée efficace et sécuritaire à introduire des transgènes dans divers tissus comme la peau ou les mélanomes [384-386]. Différents essais cliniques sont d'ailleurs actuellement en cours dans plusieurs maladies [385]. La méthode d'électroporation fut également testée pour introduire la FLDYS dans des muscles de souris *mdx*. Les muscles électroporés avec la FLDYS exprimèrent le transgène jusqu'à un mois tout en ayant moins de fibres centronucléées [387, 388]. La prochaine étape sera de confirmer ces résultats chez de plus grands animaux tels que le chien ou le primate non-humain.

Comparées aux méthodes chimiques, les méthodes physiques montrent de meilleurs résultats dans le muscle que ce soit du point de vue de l'efficacité ou de la sécurité. Néanmoins aucune méthode physique n'a encore été explorée chez de grands animaux dans le cadre de la DMD.

Chapitre 6 : Projet de thèse

6.1 Problématique

La DMD est une maladie génétique caractérisée par l'absence de dystrophine dans l'ensemble des muscles. Ce manque de dystrophine fragilise le sarcolemme et mène à une dégénérescence progressive des muscles squelettiques et cardiaque chez un patient DMD. Leur décès survient généralement dans la vingtaine et il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement curatif pour cette maladie.

La transplantation de myoblastes s'est montrée efficace lors de précédents essais cliniques chez le patient DMD pour restaurer la dystrophine dans les muscles greffés. Cependant, la réponse immunitaire spécifique due à l'incompatibilité donneur vs receveur réduit l'efficacité du traitement et impose une immunosuppression continue aux patients transplantés.

6.2 Hypothèses de travail

De nombreuses cellules ont été testées pour leurs potentiels à restaurer la dystrophine dans un muscle dystrophique. Cependant, les meilleurs résultats en termes d'efficacité et de sécurité ont été obtenus avec la transplantation de myoblastes directement dans le muscle ; les myoblastes dérivant des cellules réparatrices « naturelles » du muscle : les cellules satellites. Il semble donc que les myoblastes se révèlent être le meilleur choix de cellules dans une potentielle thérapie cellulaire dans la DMD.

Afin de rétablir la dystrophine chez les patients DMD, la thérapie génique *ex vivo* est une avenue intéressante dans le sens où elle allie la thérapie génique à la thérapie cellulaire. Cette technique consiste à prendre des myoblastes de patients DMD, de les modifier génétiquement pour qu'ils expriment la dystrophine et de les transplanter par la suite dans leurs muscles ; le tout sans immunosuppresseur. Cette approche a d'ailleurs déjà fait ses preuves chez la souris *mdx*. Cependant le meilleur modèle animal pour étudier les effets d'une potentielle thérapie pour la DMD est le chien dystrophique puisque son phénotype

est comparable à celui d'un patient DMD. Tester la thérapie génique *ex vivo* chez le chien dystrophique semble donc être la prochaine étape pour évaluer le potentiel de cette approche thérapeutique dans le cadre de la DMD. Pour cela, un lentivirus codant pour l'ADNc de la micro-dystrophine de chien sera utilisé comme vecteur viral pour ses capacités intégratives.

Bien que le lentivirus soit efficace à introduire des transgènes de petites tailles, il est incapable d'encapsider de grands transgènes comme celui de la dystrophine pleine longueur (environ 11 kb). Une alternative à cette utilisation de virus est l'électroporation de plasmide. En effet, cette méthode non virale permet d'introduire des plasmides dans des muscles via un courant électrique. La dystrophine a d'ailleurs déjà été introduite de cette manière dans des muscles de petits animaux tels que la souris dystrophique ou le rat mais jamais dans de grands animaux tels que le chien dystrophique. L'électroporation serait donc une option intéressante pour introduire la dystrophine dans les muscles de chiens dystrophiques.

6.3 Objectifs

Même si la thérapie génique *ex vivo* et l'électroporation ont déjà été utilisées pour introduire la dystrophine dans des muscles de souris, ces méthodes n'ont jamais été appliquées chez le chien (sauf avec des mésoangioblastes) dans le contexte de la DMD. Nous nous sommes donc concentrés sur ce modèle animal. Nos objectifs sont de :

- Mettre au point la culture de myoblastes de chien ;
- Construire un vecteur lentiviral codant pour la micro-dystrophine de chien ;
- Introduire la micro-dystrophine de chien dans des muscles de chien par thérapie génique *ex vivo* et par électroporation ;
- Construire un vecteur plasmidique codant pour la dystrophine de chien pleine longueur ;
- Introduire la dystrophine de chien pleine longueur dans des muscles de chien dystrophique par électroporation ;
- Comparer l'efficacité des deux techniques et des deux versions de la dystrophine utilisées.

Résultats

Chapitre 7 : Expression de micro-dystrophine de chien dans des muscles de souris et de chien par thérapie génique

Christophe Pichavant, Pierre Chapdelaine, Daniel G. Cerri, Jean-Christophe Dominique, Simon P. Quenneville, Daniel Skuk, Joe N. Kornegay, João C. S. Bizario, Xiao Xiao et Jacques P. Tremblay

Contribution de chaque auteur :

J'ai effectué presque toutes les manipulations retrouvées dans l'article excepté ce qui suit. Pierre Chapdelaine m'a fourni les plasmides lentiviraux et m'a aussi conseillé tout au long de ce travail. Daniel G. Cerri s'est occupé de la prolifération des cellules immortalisées. Simon P. Quenneville fut ma personne ressource en thérapie génique jusqu'à son départ en 2006 et Daniel Skuk fut la personne ressource en ce qui a trait à l'histologie des muscles. João C. S. Bizario a fourni le chien dystrophique et Xiao Xiao a fourni le plasmide contenant la micro-dystrophine de chien. J'ai rédigé l'article sous la supervision de Jacques P. Tremblay. Les autres auteurs ont contribué de façon mineure.

Résultats publiés dans le journal Molecular Therapy, 2010

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est caractérisée par l'absence de dystrophine. Des études antérieures ont démontré la faisabilité de délivrer l'ADNc d'une micro-dystrophine dans des muscles de souris et de singe par thérapie génique *ex vivo*. Cependant, ces modèles animaux ne reflètent pas complètement le phénotype d'un patient DMD. Étant donné que le phénotype du chien dystrophique est le phénotype animal se rapprochant le plus de celui d'un patient DMD, un lentivirus codant pour la micro-dystrophine de chien a été construit. Des myoblastes humains et des myoblastes de chien dystrophique ont été transduits avec ce vecteur puis transplantés dans des muscles de souris immunodéficientes. Un mois plus tard, des fibres exprimant le transgène furent retrouvées dans les muscles greffés. Une approche non virale a aussi été utilisée. Le plasmide codant pour la micro-dystrophine a été ainsi électroporé dans des muscles de souris et de chien. Deux semaines plus tard, le transgène fut détecté dans les muscles électroporés. En conséquence, la thérapie génique *ex vivo* et l'électroporation sont donc des méthodes envisageables pour introduire une version tronquée de la dystrophine dans des muscles de modèles animaux et éventuellement dans ceux des patients DMD.

Expression of Dog Micro-Dystrophin in Mouse and Dog Muscles by Gene Therapy

Christophe Pichavant¹, Pierre Chapdelaine¹, Daniel G. Cerri¹, Jean-Christophe Dominique¹, Simon P. Quenneville¹, Daniel Skuk¹, Joe N. Kornegay², João C. S. Bizarrio³, Xiao Xiao⁴, and Jacques P. Tremblay¹

¹ Unité de Recherche en Génétique Humaine, Centre de recherche du CHUL, CHUQ, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec, QC, Canada

² University of North Carolina School of Medicine, Department of Pathology, Chapel Hill, North Carolina, United States

³ Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP), School of Medicine, University of Ribeirão Preto, 14096-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil

⁴ University of North Carolina School of Medicine, Division of Molecular Pharmaceutics, Chapel Hill, North Carolina, United States

Correspondence should be addressed to: Jacques P. Tremblay Ph.D., Unité de Recherche en Génétique Humaine (RC 9300), Centre de recherche du CHUL, 2705 boulevard Laurier, Québec, QC, Canada, G1V 4G2. Phone: (418) 654-2186, Fax: (418) 654-2207

E-mail: Jacques-P.Tremblay@crchul.ulaval.ca

Short title: Expression of Dog Micro-Dystrophin in Muscles

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is characterised by the absence of dystrophin. Several previous studies demonstrated the feasibility of delivering micro-dystrophin cDNA into mouse and normal nonhuman primate muscles by *ex vivo* gene therapy. However, these animal models do not reproduce completely the human DMD phenotype, while the dystrophic dog model does. To progress towards the use of the best animal model of DMD, a dog micro-dystrophin was transduced into human and dystrophic dog muscle precursor cells (MPCs) with a lentivirus before their transplantation into mouse muscles. One month following MPC transplantation, myofibers expressing the dog micro-dystrophin were observed. We also used another approach to introduce this transgene into myofibers, i.e., the electrotransfer of a plasmid coding for the dog micro-dystrophin. The plasmid was injected into mouse and dog muscles, and brief electric pulses were applied in the region of injection. Two weeks later, the transgene was detected in both animals. Therefore, *ex vivo* gene therapy and electrotransfer are two possible methods to introduce a truncated version of dystrophin into myofibers of animal models and eventually into myofibers of DMD patients.

Introduction

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked genetic disease characterized by the absence of dystrophin. This large protein of 427 kDa is encoded by a 14 kb mRNA [1]. This protein, interacting with other membrane-associated proteins, would be needed to insure mechanical stress resistance of the sarcolemma during muscle contraction. The lack of dystrophin weakens the sarcolemma and thus makes myofibers less resistant to mechanical stress [2, 3].

There is currently no efficient treatment for DMD. Several groups have however obtained promising results with a variety of approaches in clinical and preclinical experiments such as the exon skipping [4] or the use of different types of stem cells [5]. The transplantation of normal allogeneic muscle precursor cells (MPCs) has been proven effective to restore the expression of dystrophin, but requires immunosuppression to avoid rejection of the allogeneic cells and myofibers [6, 7]. Cossu's laboratory reported good expression of dystrophin after intra-arterial delivery of normal mesoangioblasts in dystrophic dogs, but this therapeutic approach also needed immunosuppression because of the allogeneic context of the grafts [8]. The systemic delivery of mesoangioblasts seems very promising, but it will very important to verify the potential side-effects of the accumulation of these cells in different vital organs. Two recent experiments in dogs demonstrated good expression of dystrophin after intramuscular, regional limb delivery approach or intravenous delivery with an Adenovirus Associated Virus (AAV) in dystrophic dogs but they also needed immunosuppression to prevent an immune reaction against the delivered vector [9, 10].

Immunosuppressive drugs induce several adverse effects such as increased risks of cancer, infections, nephrotoxicity, neurotoxicity, and so on. One way to eventually avoid the immune problems associated with allogeneic cell transplantation or viral vector injections is to transplant autologous cells, which have been genetically modified *ex vivo*. This technique has been proven effective with a truncated version of dystrophin in the mouse [11] and in the nonhuman primate models [12]. However, the best animal model to study the effects of experimental therapies for DMD is the muscular dystrophy dog, since its dystrophic phenotype is closer to the DMD patient than the dystrophic mouse. Indeed,

while research with nonhuman primates is of importance, there is no monkey with muscular dystrophy available for experimentation. Therefore, the present study will focus on the use of the dog micro-dystrophin. A recent study showed expression of this truncated version of dog dystrophin into dystrophic dog muscles after its intramuscular delivery with an AAV, but immunosuppression would be required to obtain a long-term expression. With this therapeutic approach there is not only a requirement for immunosuppression but also some potential toxicity following the dissemination of the virus throughout the body [13]. Another approach to avoid these problems is to directly electrotransfer a cDNA coding for the gene of interest into muscles. A clinical trial performed on 9 DMD patients has shown weak expression of human dystrophin in up to 6% of the myofibers following intramuscular injection of a plasmid containing the full-length dystrophin gene [14]. This technique was safe, fast and easy to use, although it needs to be substantially improved, as could be the case using electrotransfer to increase the incorporation of the plasmid into more myofibers [15]. Moreover, this electrotransfer technique is already in clinical trials [16].

In the present study, a lentivirus vector was used to introduce a dog micro-dystrophin cDNA into human and dystrophic dog MPCs. This vector was selected for its property to integrate into the genome and to be able to carry a micro-dystrophin. The genetically modified MPCs were transplanted into immunodeficient mouse muscles and myofibers expressing the dog micro-dystrophin were observed. Moreover, the electrotransfer of the same cDNA was tested with success in mouse and dog muscles. Afterwards, we plan to introduce the micro-dystrophin into dystrophic dog muscles with these two techniques.

Results

In vitro expression of the dog micro-dystrophin

Since dystrophin is normally expressed in myotubes and muscle fibres but not in MPCs, we have chosen to clone the dog micro-dystrophin cDNA (μ Dys) under the control of a muscle creatine kinase (MCK) promoter in a lentiviral backbone. To track its expression, this transgene was fused with the V5 tag (μ DysV5). A puromycin resistance gene was also included in the backbone in order to allow cell selection. This plasmid (pLeMCK. μ DysV5) (**Fig. 1a**) was first transduced in human MPCs (hMPCs) using the packaging cell supernatant. Transduced cells were selected with two days exposure to puromycin. Puromycin-resistant cells were proliferated to confluence and placed 3 days in differentiation medium to form myotubes. Proteins were harvested from cells grown in proliferation and differentiation media to verify that the transgene was only expressed in myotubes and not in MPCs. A western blot with an antibody against the V5 tag was performed to verify whether the μ DysV5 protein was expressed in these cells. As expected, only the cultures of transduced hMPCs in differentiation medium expressed the dog micro-dystrophin (**Fig. 1b**).

Electrotransfer of the μ DysV5 plasmid into mouse muscles

In the aim to introduce the μ DysV5 transgene by electrotransfer in dog muscles, a pilot study was first made in mouse muscles. A plasmid coding for green fluorescent protein (pLeGFP) was initially injected into the *Tibialis anterior* (TA) to determine the efficiency of this method. Forty μ g of pLeGFP were electrotransferred into the TAs of immunodeficient (Rag^{-/-}) mice (n = 4). Two weeks later, the TAs were harvested and GFP was detected in cryostat sections up to 40% in the best cases (**Fig. 2a**). After this proof of principle, the pLeMCK. μ dysV5 (40 μ g) was electrotransferred into Rag^{-/-} mouse TAs (n = 8). Mice were sacrificed after two weeks and the TAs were analysed. Immunofluorescence with an antibody recognizing the V5 tag was performed revealing myofibers expressing V5, and thus the dog micro-dystrophin. In the best cases, up to 20% of the muscle fibres expressed the transgene (**Fig. 2b**).

LeMCK. μ DysV5-transduced hMPCs grafted in mouse muscles

After this first positive *in vivo* result, hMPCs were transduced with the LeMCK. μ dysV5 lentivirus. Cells were selected with puromycin and 10^6 puromycin-resistant hMPCs were transplanted in the TAs of Rag^{-/-} mice (n = 8). Two days before, the TAs of these mice were irradiated to inhibit the proliferation of the endogenous satellite cells [17] and injected with 1 μ g of cardiotoxin to damage the muscle [18]. One month after the transplantation, the TAs were harvested and immuno-histochemical staining of V5 tag was used to detect the expression of the dog μ Dys. Roughly 30 to 40% of the myofibers expressed V5 and thus the dog micro-dystrophin (**Figs. 3a-c**). The myofibers expressing this transgene, observed following the cell transplantation, were more abundant than those observed following electrotransfer.

Influence of donor's age in the success of dog MPC transplantation in mice

Muscle biopsies from a young (3 month old) and a mature (3 years old) dog were taken and their MPCs isolated and proliferated *in vitro*. Preliminary experiments showed that dog myoblasts had a tendency to fuse at confluence as low as 50% (even in high serum medium) and that their proliferation was not as good as that of hMPCs. The low proliferation and early fusion were even more important when MPCs were obtained from the older dog. Indeed, no myofiber expression of dog dystrophin was observed one month after transplantation of non-dystrophic MPCs (n = 4) from the older donor in Rag^{-/-} mouse muscles (**Fig. 4a**) whereas transplantation of non-dystrophic MPCs (n = 4) from the young donor showed many myofibers expressing dog dystrophin (**Fig. 4b**).

Immortalization and LeMCK. μ DysV5 transduction of dystrophic dog MPCs

Since we initially had just biopsies from a two years old dystrophic dog, its MPCs were transduced with lentivirus coding for Cyclin dependent kinase 4 (Cdk4) and telomerase to immortalize them. After two months, several clones were obtained from these immortalized dog MPCs, and some were selected for their high desmin expression and their

capacity to fuse *in vitro*. Western blot against telomerase, Cdk4 and desmin were done to confirm the two transductions and the myogenic potential of the transduced cells (**Fig. 5a**). The 2G4 clone was discarded since no expression of Cdk4 nor desmin was detected. The selected clones, 2C5, 5B7 and 5F10, were transduced with the LeMCK. μ dysV5 virus. As these clones already contained a puromycin resistance gene (included in the telomerase plasmid), puromycin selection of cells containing the MCK. μ dysV5 transgene was not possible. In consequence, the modified MPCs were transferred to a differentiation medium to activate the MCK promoter and proteins were harvested to make a western blot to detect V5 (**Fig. 5b**). The 2C5 clone expressed the dog micro-dystrophin while only a very weak band was observed in the 5B7 clone and no expression was detected for the 5F10 clone. Thus, the 2C5 clone expressed the MCK. μ DysV5 transgene.

Transplantation of LeMCK. μ DysV5-transduced dystrophic dog MPCs in mice

The three clones transduced with the LeMCK. μ DysV5 virus (5×10^5 cells each) were transplanted into the TA of Rag^{-/-} mice (n = 4 for each clone) before obtaining the western blot results for V5. In this case, the TAs did not receive irradiation nor cardiotoxin to be closer to the clinical situation of cell transplantation. One month after the graft, the TAs were harvested and immuno-histochemical staining for V5 was used to detect the expression of dog μ DysV5 in cryostat sections of the grafted muscles. As expected, no V5 expression was detected in muscles grafted with the 5F10 clone (**Fig. 6a**) nor with the 5B7 clone (**Fig. 6b**). Nevertheless, some myofibers expressing V5 were observed in muscles grafted with the 2C5 clone (**Fig. 6c**). Thus the transplantation of transduced dystrophic dog MPCs with the LeMCK. μ dysV5 virus allowed the expression of the dog micro-dystrophin in myofibers of the grafted muscles.

Electrotransfer of the pLeMCK. μ dysV5 into dog muscles

Finally, the pLeMCK. μ dysV5 was electrotransferred into dog muscles. Two hundred μ g of this plasmid were injected in the *Brachialis anterior* of three non-dystrophic two years old dogs. Two weeks after the electrotransfer, myofibers expressing the

transgenic dog micro-dystrophin were observed in cryosections of the three dogs using an antibody against the V5 flag (**Figs. 7a,c**), but twice less myofibers expressed this transgene than following electrotransfer into mouse muscles. To verify whether μ DysV5 induced an immune response in these animals, the muscle sections were stained with haematoxylin-eosin. Accumulations of mononuclear cells with a lymphocyte aspect were observed in the muscle sections. These lymphocyte accumulations co-localised (**Figs. 7c,d**) or did not co-localised (**Figs. 7a,b**) with myofibers expressing V5. An immuno-histochemical staining for CD8⁺ confirmed that many of these cells were cytotoxic T-lymphocytes (**Fig. 7e**).

Discussion

In this study, we have managed to introduce a truncated version of the dog dystrophin with a lentiviral vector into human and dystrophic dog MPCs. We also obtained the expression of the dog micro-dystrophin into mouse muscles following the transplantation of these genetically modified MPCs. This potential therapeutic approach consisting in the autotransplantation of the patient own cells after their genetic correction *in vitro* is called “*ex vivo* gene therapy”. In the case of genetic myopathies, *ex vivo* gene therapy has already shown promising results, using different techniques of gene modification in human, mouse and monkey cells, grafted in mice and non-human primates [11, 12, 19].

Our first experiment was to insert the dog micro-dystrophin cDNA into hMPCs. We begin with these cells because they are easy to proliferate in culture. Since dystrophin is usually only expressed in myotubes and muscle fibres but not in MPCs [20], we placed the micro-dystrophin cDNA under the control of a MCK promoter [21] to obtain dystrophin expression in physiological conditions. Using this promoter, the expression of the transgene following cell transplantation is only induced when the genetically modified MPCs fused with the host myofibers. Thus the expression of the dog micro-dystrophin was only detected in the myotubes formed in culture by transduced MPCs using western blot and in the muscles grafted with these cells by immunohistochemistry.

The V5 expression following transduced hMPC transplantation was more pronounced than following the transplantation of transduced dystrophic dog MPCs. This may be due to the lower proliferating capacity of the dog MPCs compared to human MPCs. Moreover, MPCs isolated from a young dog had more proliferation and fusion capacities than those from a mature dog. In some of our experiments, the transduced MPCs came from a dystrophic dog that was two years old and had been previously transduced with a telomerase and a Cdk4 lentivirus to increase their proliferation capacity [22]. Even if we selected the best cell clones, their capacity to proliferate and to fuse was inferior to those observed for MPCs derived from a 3 month old dog. It is also probable that the dystrophic dog MPCs were close to senescence before or between the two transductions and selections. The immortalisation induced by the transductions of the Cdk4 and telomerase

genes did not restore the low fusion capacity of these cells compared to the fusion capacity of MPCs isolated from a young dog. What is important, however, is that despite this potential senescence/fusion problem, we obtained some expression of dog micro-dystrophin after the graft of the MCK. μ dysV5-transduced dystrophic dog MPCs into mouse muscles. For future experiments, biopsies from dystrophic dogs should be taken from young dogs so that their proliferation and fusion capacity are better.

In addition to the experiments of *ex vivo* gene therapy, we also tested with success the electrotransfer of the plasmid coding for the dog micro-dystrophin both in mouse and dog muscles. However, our transgene was more expressed in the mouse muscles, probably simply due to an easier and more effective electrotransfer technique in the small muscles (i.e., mice) than bigger muscles (i.e., dogs). In addition, the electric parameters for electrotransfer in smaller muscles are already well established whereas this is not the case for large dog muscles.

This method combining the uses of electrotransfer and gene therapy has been used in muscles, tumours and skin in large animals such as dogs, pigs, non-human primates and is currently in clinical trials to treat different diseases [16, 23]. In particular, this technique allows a long-term expression of a plasmid in skeletal muscles because muscle fibres are post-mitotic. Compared to *ex vivo* gene therapy, this is a faster method since there is no cellular culture and this may also be less immunogenic and safer since viral capsids are not introduced in the patients [24]. Even if during the electrotransfer, some injected plasmids may reach the blood circulation, the use of a muscle specific promoter will insure that transgene expression is restricted to myofibers. In addition, the incorporation of naked plasmids by myofibers, without electrotransfer, is very low. Despite the lower electrotransfer efficiency in our experiments in comparison with the *ex vivo* gene therapy results, electrotransfer remains a potential method to introduce dystrophin cDNA especially in small muscles. This technique should be further improved in the future.

In our study, to detect the truncated dystrophin in the dogs, it was necessary to distinguish it from the endogenous dystrophin. To do so, we used a V5 tag in fusion with the protein. However, this tag may induce an immune response at long-term [12]. In our electrotransfer experiment in dogs, a cellular infiltration, i.e. a sign of a specific immune response, was observed in the regions expressing the transgene at two weeks. In the future,

we will extend our electrotransfer experiments in dystrophic dogs to verify whether the specific immune response producing the rejection of the myofibers is due to the micro-dystrophin itself or to the V5 tag. A specific immune response may also be induced by the use of antibiotic resistance genes used to select the transduced cells; in our case, the electrotransferred plasmid contained the μ DysV5 and the puromycin resistance gene. In fact, autologous grafts of dog MPCs genetically modified with a lentivirus, containing the μ DysV5 (see **Fig. 8**) or only the puromycin resistance gene (data not shown), induced a specific immune response at the injection sites. This preliminary result suggests that the puromycin resistance gene can induce an immune response by itself.

We expect that this immune problem will be absent in future experiments of electrotransfer or *ex vivo* gene therapy in dystrophic dogs. For these experiments, the V5 tag and the puromycin resistance gene will be removed from the plasmid since we will be able to detect the micro-dystrophin without needing a tag. Obviously, in this case the percentage of revertant fibres will have to be taken into account. However, we cannot exclude that an immune response against micro-dystrophin may appear. There were contradictory results in previous experiments in dystrophic mice receiving transplantation of syngeneic MPCs expressing normal dystrophin. One study reported the production of antibodies reacting with dystrophin, but without inducing rejection at long-term [25]. Another study reported both antibody production and specific T lymphocyte reaction against dystrophin, leading to rejection [26]. In DMD patients, anti-dystrophin antibodies were also observed following non-dystrophic MPC grafts [27].

Recent studies using intramuscular injection of AAV2 and AAV6 vectors carrying the canine micro-dystrophin cDNA in dystrophic dogs showed good expression of dystrophin, but a fast and strong immune response was observed against the capsid [9]. Using the AAV8 vector, this immune response was delayed to eight weeks, however, this delay will not insure a long-term micro-dystrophin expression if an immunosuppressive treatment is not administrated [10]. Another team obtained good results using an AAV carrying the canine micro-dystrophin without immunosuppression in *mdx* mice [28]. This team also observed canine micro-dystrophin expression for over one year with either direct intramuscular (AAV8) or regional limb or systemic intravenous (both AAV9) injection [29, 30]. If the AAV vectors are administered systemically by intravascular injection, they will

spread throughout the body reaching other organs than skeletal muscles [31]. In consequence, if there is an immune response against the viral capsid spread in the whole body, the risks of such a systemic immune response may be extremely severe. One study has shown weak toxicity following *in vivo* AAV systemic administration, but unfortunately the analyses were only done during three days [32]. With our *ex vivo* gene therapy approach, we avoid the problem of immune reactions against the viral capsid since the cells are genetically modified *in vitro*. The electrotransfer also avoid the immune response against the viral capsid because a naked plasmid is injected. Keeping in mind the considerations discussed above, it maybe possible to avoid immunosuppression with these two methods. Toxicity, the need of immunosuppression and the spreading of the viral particles are also problems observed following direct *in vivo* injections of adenovirus [33, 34] and for probably all viral vectors [35]. There is, however, currently no evidence in the literature of these problems with the use of a lentivirus following *ex vivo* gene therapy. For these reasons, the *ex vivo* gene therapy may be a safer method than the direct injection of viral vectors to introduce a micro-dystrophin cDNA into dystrophic muscles and, eventually, into muscles of DMD patients.

In a clinical set-up with our two methods, the dystrophin cDNA must be under the control of a muscle specific promoter to avoid toxicity due to dystrophin expression in unfused MPCs or due to the dispersion of the plasmid to other organs. The absence of an antibiotic-resistance gene in the plasmids will be needed to avoid immune reactions against its product. However, since the random integration of the vector may induce tumorigenicity [35], samples of the cells transduced with lentivirus should be tested *in vitro* and *in vivo*, as previously done by our team for clinical trials of non-dystrophic MPC transplantation [36].

In conclusion, *ex vivo* gene therapy and plasmid electrotransfer must be improved to be used as potential treatments of muscular dystrophies such as DMD.

Material and methods

Animals

Rag^{-/-} mice were provided by Charles River (Willington, MA). Non-dystrophic dogs were provided by *La ferme aux toits oranges* (Neuville, Canada). All the experiments made on these animals were approved by the Animal Protection Committee of Laval University. The dystrophic dog came from a colony founded from one carrier female donated by Dr. Kornegay. The genotypes of the wild-type dogs and the dystrophic dog in pedigrees segregating Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) were confirmed by exon 7 specific genomic polymerase chain reaction followed by Sau96I digestion and analyzed by restriction fragments length polymorphism as described [37]. The dystrophic dog was housed at the Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP, Brazil) according the guidelines set by the Institutional Laboratory Animal Care Committee of the University of Ribeirão Preto.

Cell culture

293T cells were cultured in DMEM-HG (Gibco, Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). The hMPCs were obtained from a post-mortem muscle sample of a normal 13 month-old male. These cells were proliferated in MCB120 medium (Hyclone, Mississauga, Canada) supplemented with 15% fetal bovine serum (Gibco), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), 10 µg/L of bFGF (Feldan, Quebec, Canada), 0.4 mg/L of dexamethasone (Sigma, Oakville, Canada) and 5 mg/L of insulin (Sigma). To obtain the activation of the MCK promoter, cells were cultured in differentiation medium [DMEM (Gibco) supplemented with 2% fetal bovine serum (Invitrogen)]. The dystrophic dog MPCs were isolated from a muscle biopsy of a two years old dystrophic animal. Non-dystrophic dog MPCs were obtained from muscle biopsies of a 3 month old dog and a 3 years old dog. Dystrophic and non-dystrophic dog MPCs were cultured in the same medium as the human MPCs. All the cells were maintained at 37°C under 5% CO₂.

Lentiviral plasmid construction

Dog micro-dystrophin cDNA contained in an AAV vector [28] was amplified with Turbo Pfu DNA polymerase with sense and reverse primers containing respectively at each ends BamH1 and Spe1 sites. Amplified product was purified from agarose gel and cloned by fusion (BD in Fusion, Clontech, Mountain View, CA) in BamH1/Spe1 sites of lentiviral vector L6/V5 (Invitrogen) in which Xho1 site was eliminated by cutting with Spe1/Xho1, followed by Klenow (GE healthcare, Mississauga, Canada) and ligated with T4 DNA ligase (NEB, Pickering, Canada). Moreover, blasticidin contained in the lentiviral plasmid L6/V5 has been substituted by a puromycin resistance gene between the sites of Sma1/Kpn1 in the viral vector. The original CMV promoter has been also substituted by the MCK promoter [38] making the final construct LeMCK. μ DysV5 (**Fig. 1a**). Constructs used to immortalize dog MPCs are described in reference [22]. Both cDNAs coding for telomerase and Cdk4 were cloned each in L6/V5 in which the original resistant gene blasticidin was respectively substituted by puromycin and hygromycin. Finally, pLeGFP construct is the result of cloning of eGFP cDNA [39] cloned in L6/V5 and expressed with a CMV promoter.

Virus production

Self-inactivating lentiviral vectors were produced with the third packaging system [40] and the co-transfection method allowed their production as previously described [41]. Briefly, psPAX2, pMD2G and the vector plasmid were transfected in 293T cells using CaCl₂ precipitation. The medium was removed 16 hr post-transfection and the supernatant was harvested at 12, 24 and 36 hr. Average titers were around 10⁶ TU/mL. Cells were transduced with the lentivirus with a MOI of 100 in the presence of 8 μ g/mL of polybrene. The medium was removed after 12 hr. Cells transduced with a lentivirus coding for the puromycin resistance or the hygromycin resistance gene were respectively selected during 2 days with the puromycin (Clontech) at 2 μ g/mL or during 1 week with the hygromycin (MultiCell Technologies, Woonsocket, RI) at 200 μ g/mL, starting two days after the transduction.

Cell transplantation in mice

For human cell transplantation, Rag^{-/-} mice were γ -ray irradiated (12Gy) at the leg level to inhibit the proliferation of the recipient satellite cells, a condition that favours the participation of grafted cells in recipient muscle regeneration [42]. Two days before the graft, 1 μ g of cardiotoxin (Sigma) was injected into the TAs to damage the muscle fibres inducing a process of muscle regeneration to induce the fusion of the transplanted cells [43]. For the transplantations of non-dystrophic and dystrophic dog MPCs, Rag^{-/-} mice did not receive cardiotoxin nor irradiation.

Ten intra-muscular injections were done for each MPC transplantation in the TA muscle. A total of 10^6 cells (for human MPCs) or 5×10^5 cells (for dog MPCs) resuspended in 8 μ L of HBSS (Gibco) in the TA were injected in each muscle. The grafted TAs were harvested one month after transplantation and were snap frozen in liquid nitrogen. Serial 12 μ m cryostat sections were obtained throughout the muscle.

Electrotransfer

Forty μ g of the pLeMCK. μ DysV5 were injected percutaneously at a final volume of 40 μ L of Tyrode's buffer 1X (Sigma) in the mouse muscle. A single longitudinal injection was made into the TA and the "Electrode Electrolyte" cream (Teca Corporation, Pleasantville, NY) was applied on the skin to favour the passage of the electric current between the two metal plaques. The generator used in this experiment delivers square wave pulses with the following parameters: 10 pulses of 200 V/cm, duration of 25 ms and delay of 300 ms. The electrotransferred muscles were harvested two weeks after the experiment and were processed as the cell-grafted muscles.

For dogs, 200 μ g of the pLeMCK. μ DysV5 were injected at a final volume of 200 μ L of Tyrode's buffer 1X (Sigma) into the *Brachialis anterior*. Two close injections of 100 μ L were directly made into the muscle previously exposed by cutting the skin. Afterwards, two needles separated by 4 mm were implanted around the plasmid injection area and the electric pulses were applied. The electrical parameters for dogs were the same as for mice: 10 pulses of 200 V/cm, duration of 25 ms and delay of 300 ms. Suture points were placed in the muscle to distinguish the area of electrotransfer. The electrotransferred regions were

biopsied two weeks later and the biopsies were prepared similar to that of the mouse muscles, except that the cryostat sections were 18 μm thick.

Western blot and histological analysis

Proteins from MPCs or myotubes (3 days in differentiation medium) were extracted by a methanol-chloroform technique to perform western blots. Thirty μg of proteins were loaded per well. The V5 tag was detected with a mouse anti-V5 antibody (1:5000, Invitrogen). The Cdk4 was detected with a rabbit anti-Cdk4 antibody (1:500, eBioscience, San Diego, CA). The telomerase was detected with a rabbit anti-telomerase antibody (1:500, Acris, Herford, Germany) and a goat anti-desmin antibody (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was used to detect desmin.

Haematoxylin-eosin staining was used for a morphological analysis of the grafted TAs. Immunohistochemistry to detect V5 was performed with a mouse anti-V5 antibody (1:200, Invitrogen) and dog dystrophin was detected with a mouse anti-dystrophin antibody MANDYS104 (1:8, CIND, Oswestry, UK), which reacts with dog but not mouse dystrophin. To detect the presence of CD8⁺ cells, a rat anti-CD8 antibody (1:80, AbD Serotec, Oxford, UK) was used. These primary antibodies were followed by incubation with a biotinylated anti-mouse or anti-rat antibody (1:300, Dako, Mississauga, Canada) and with the Streptavidin-Cy3 (1:300, Sigma). Afterwards, the sections were mounted in PBS-glycerol (1:1).

GFP and histological analyses were observed under fluorescence using an Axiophot microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Acknowledgments

We thank Glenn E. Morris and Le Thanh Lam (MRIC Biochemistry Group, Wrexham, UK) for providing the MANDYS104 antibody and Guylaine Jalbert for her technical assistance during the experiments performed in dogs. Dr Tremblay is the president and hold shares in CellGene inc., a biotech company involved in the development of cell and gene therapies.

References

1. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. **51**(6): p. 919-28.
2. Campbell, K.P. and S.D. Kahl, *Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 259-62.
3. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, *Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1121-31.
4. Aartsma-Rus, A. and G.J. van Ommen, *Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders*. Eur J Hum Genet, 2009.
5. Peault, B., et al., *Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy*. Mol Ther, 2007. **15**(5): p. 867-77.
6. Skuk, D., et al., *Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells*. Mol Ther, 2004. **9**(3): p. 475-82.
7. Skuk, D., et al., *First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up*. Neuromuscul Disord, 2007. **17**(1): p. 38-46.
8. Sampaolesi, M., et al., *Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 574-9.
9. 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, 2007. **15**(6): p. 1160-6.
10. Ohshima, S., et al., *Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle*. Mol Ther, 2009. **17**(1): p. 73-80.
11. Moisset, P.A., et al., *Successful transplantation of genetically corrected DMD myoblasts following ex vivo transduction with the dystrophin minigene*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 94-9.
12. Quenneville, S.P., et al., *Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models*. Mol Ther, 2007. **15**(2): p. 431-8.
13. Zaiss, A.K. and D.A. Muruve, *Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge*. Gene Ther, 2008. **15**(11): p. 808-16.
14. Romero, N.B., et al., *Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1065-76.
15. Mir, L.M., et al., *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4262-7.
16. Bodles-Brakhop, A.M., R. Heller, and R. Draghia-Akli, *Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments*. Mol Ther, 2009. **17**(4): p. 585-92.
17. Kinoshita, I., et al., *Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression*. Muscle Nerve, 1994. **17**(12): p. 1407-15.

18. Harris, J.B. and M.A. Johnson, *Further observations on the pathological responses of rat skeletal muscle to toxins isolated from the venom of the Australian tiger snake, Notechis scutatus scutatus*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1978. **5**(6): p. 587-600.
19. Floyd, S.S., Jr., et al., *Ex vivo gene transfer using adenovirus-mediated full-length dystrophin delivery to dystrophic muscles*. Gene Ther, 1998. **5**(1): p. 19-30.
20. Miranda, A.F., et al., *Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients*. Am J Pathol, 1988. **132**(3): p. 410-6.
21. Jaynes, J.B., et al., *The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(1): p. 62-70.
22. Zhu, C.H., et al., *Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies*. Aging Cell, 2007. **6**(4): p. 515-23.
23. Mir, L.M., *Nucleic acids electrotransfer-based gene therapy (electrogenetherapy): past, current, and future*. Mol Biotechnol, 2009. **43**(2): p. 167-76.
24. Trollet, C., D. Scherman, and P. Bigey, *Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges*. Methods Mol Biol, 2008. **423**: p. 199-214.
25. Vilquin, J.T., et al., *Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin*. J Cell Biol, 1995. **131**(4): p. 975-88.
26. Ohtsuka, Y., et al., *Dystrophin acts as a transplantation rejection antigen in dystrophin-deficient mice: implication for gene therapy*. J Immunol, 1998. **160**(9): p. 4635-40.
27. Roy, R., et al., *Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne-dystrophic patients, donor HLA compatible*. Transplant Proc, 1993. **25**(1 Pt 2): p. 995-7.
28. Wang, B., et al., *A canine minidystrophin is functional and therapeutic in mdx mice*. Gene Ther, 2008. **15**(15): p. 1099-106.
29. Kornegay, J.N., et al., *Widespread muscle expression of an AAV-9 human minidystrophin construct after systemic intravenous injection in golden retriever muscular dystrophy (GRMD) neonatal dogs*. Mol Ther, 2009. **17**(S1): p. S152-153.
30. Li, J., et al., *Hydrodynamic limb vein injection of AAV9 results in regional and systemic long-term expression of minidystrophin in young adult GRMD dogs*. Mol Ther, 2009. **17**(S1): p. S278.
31. Yue, Y., et al., *A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs*. Mol Ther, 2008. **16**(12): p. 1944-52.
32. Stone, D., et al., *Biodistribution and safety profile of recombinant adeno-associated virus serotype 6 vectors following intravenous delivery*. J Virol, 2008. **82**(15): p. 7711-5.
33. Douglas, J.T., *Adenoviral vectors for gene therapy*. Mol Biotechnol, 2007. **36**(1): p. 71-80.

34. Stolberg, S.G., *F.D.A. officials fault Penn team in gene therapy death*. NY Times (Print), 1999: p. A22.
35. Porteus, M.H., J.P. Connelly, and S.M. Pruet, *A look to future directions in gene therapy research for monogenic diseases*. PLoS Genet, 2006. **2**(9): p. e133.
36. Skuk, D., et al., *Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(4): p. 371-86.
37. Bartlett, R.J., et al., *Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs*. Am J Vet Res, 1996. **57**(5): p. 650-4.
38. Wang, B., J. Li, and X. Xiao, *Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(25): p. 13714-9.
39. Chapdelaine, P., et al., *Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development*. Protein Eng, 2000. **13**(9): p. 611-5.
40. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
41. Salmon, P. and D. Trono, *Production and titration of lentiviral vectors*. Curr Protoc Neurosci, 2006. **Chapter 4**: p. Unit 4 21.
42. Morgan, J.E., E.P. Hoffman, and T.A. Partridge, *Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse*. J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2437-49.
43. Wakeford, S., D.J. Watt, and T.A. Partridge, *X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD*. Muscle Nerve, 1991. **14**(1): p. 42-50.

Figure Legends

Figure 1.

***In vitro* experiments with the lentivirus coding for the dog micro-dystrophin fused with a V5 tag and for the puromycin resistance gene.** (a) Schematic representation of the pLeMCK.μDysV5. The dog micro-dystrophin (μDYS) is fused with the V5 tag and is under the control of the MCK promoter. The puromycin resistance gene is under the ubiquitous promoter SV40. (b) Western blot made with uninfected and infected hMPCs cultured in proliferation or in fusion media. The V5 tag was detected only in infected cells in fusion (150 kDa).

Figure 2.

Cross-sections of mouse muscles electrotransferred with the pLeGFP and pLeMCK.μDysV5. (a) The electrotransfer of the pLeGFP induced the expression of GFP in several myofibers. (b) The fluorescent immunodetection of V5 in a muscle electrotransferred with the pLeMCK.μDysV5 shows several myofibers expressing V5 in the typical subsarcolemmal location of dystrophin. Scale bar = 50 μm. The cross-sections represent the global result from the electrotransfer with n = 4 for pLeGFP and n = 8 for pLeMCK.μDysV5.

Figure 3.

Cross-sections of mouse muscles grafted with hMPCs transduced with the pLeMCK.μDysV5. The sections (a-c) of three different mice illustrate V5 expression in several myofibers in the typical sarcolemmal location of dystrophin. Scale bar = 50 μm. The cross-sections represent the global result from the transplantation with n = 8.

Figure 4.

Cross-sections of mouse muscles grafted with dog MPCs. An antibody that recognizes dog dystrophin but not mouse dystrophin was used in immuno-histochemistry. The transplantation of mature dog MPCs (a) did not induce expression of dog dystrophin while many fibres expressed dog dystrophin after the transplantation of young dog MPCs (b).

Scale bar = 100 μm . The cross-sections represent the global result from the transplantation with $n = 4$ for each group.

Figure 5.

Western blots on immortalized dog MPC clones transduced with LeMCK. μ DysV5. (a) Western blots to detect telomerase, Cdk4 and desmin in uninfected dog MPCs (U) and 4 different clones infected with the telomerase and the Cdk4 viruses, namely 2C5, 2G4, 5B7 and 5F10. Telomerase, Cdk4 and desmin were detected only in clones 2C5, 5B7 and 5F10. (b) Western blot to detect V5 in the three clones selected for their expression of telomerase, Cdk4 and desmin, transduced with the LeMCK. μ DysV5 virus and transferred in differentiation medium. A clear expression of V5 was detected (150 kDa) in clone 2C5, a very weak expression of V5 was distinguished in the 5B7 clone and no V5 expression was noticed in the 5F10 clone. MW = Molecular Weight.

Figure 6.

Cross-sections of mouse muscles transplanted with the three immortalized dog MPC clones infected with the LeMCK. μ DysV5 virus, treated for fluorescent immunodetection of V5. No V5 tag was detected in muscles grafted with the 5F10 (a) and 5B7 (b) clones. On the contrary, some myofibers expressed the V5 tag at the sarcolemmal position in the muscles grafted with the 2C5 clone (c). Scale bar = 50 μm . The cross-sections represent the global results from the transplantation with $n = 4$ for each group.

Figure 7.

Cross-sections of dog muscles electrotransferred with the pLeMCK. μ DysV5. Two regions (from two different muscles) are shown through serial sections respectively in a, b and c, d, e. Fluorescent immunodetection of V5 shows the typical sarcolemmal location of dystrophin in several myofibers (a,c). (b,d) The haematoxylin-eosin staining shows infiltrates of mononuclear cells with the aspect of lymphocytes (arrowheads) in the proximity of the V5-positive myofibers. (e) The fluorescent immunodetection of CD8+ cells shows that many cells in the mononuclear infiltrates are cytotoxic T lymphocytes. The asterisks indicate the same myofibers through the sections. Scale bar = 150 μm (a,b) and 75 μm (c-e). The cross-sections represent the global results from the electrotransfer with $n = 3$.

Figure 8.

Cross-sections of dog muscles transplanted with autologous MPCs expressing the MCK.μDysV5. (a,b) The haematoxylin-eosin staining shows infiltrates of mononuclear cells one month after the transplantation of MPCs transduced with the LeMCK.μDysV5. **(c)** Two months after the transplantation of these same cells, no mononuclear cells were observed in haematoxylin-eosin staining in the grafted muscles. The cross-sections are representative of the transplantations.

Figures

Figure 1

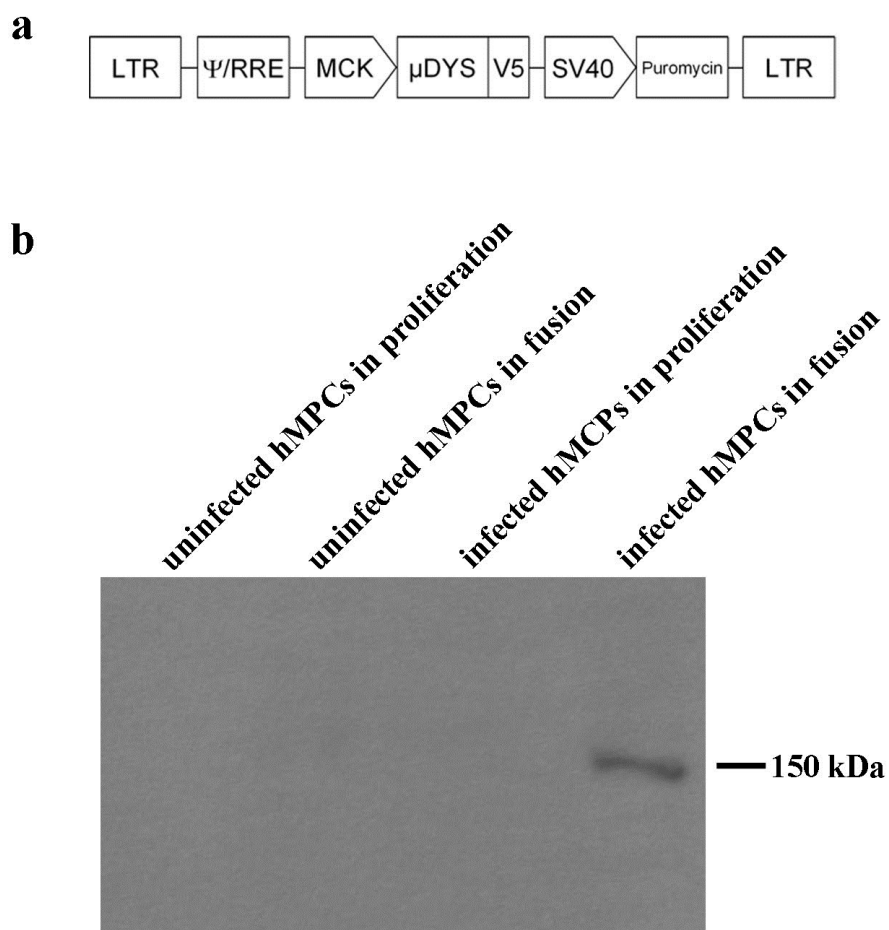


Figure 2

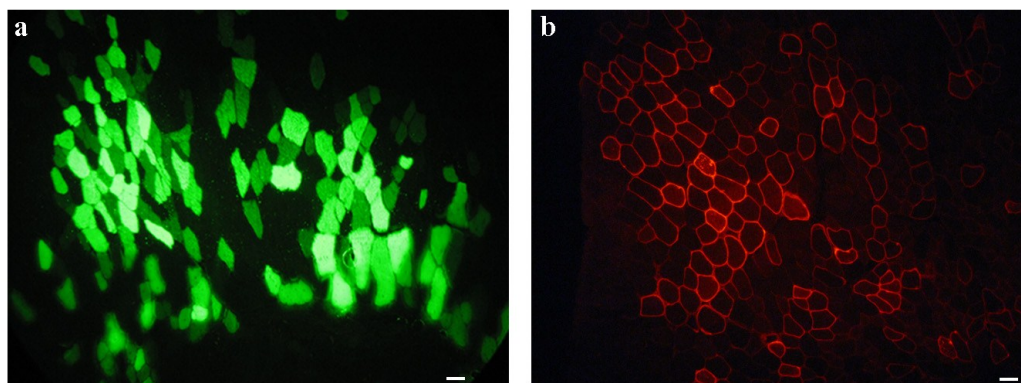


Figure 3

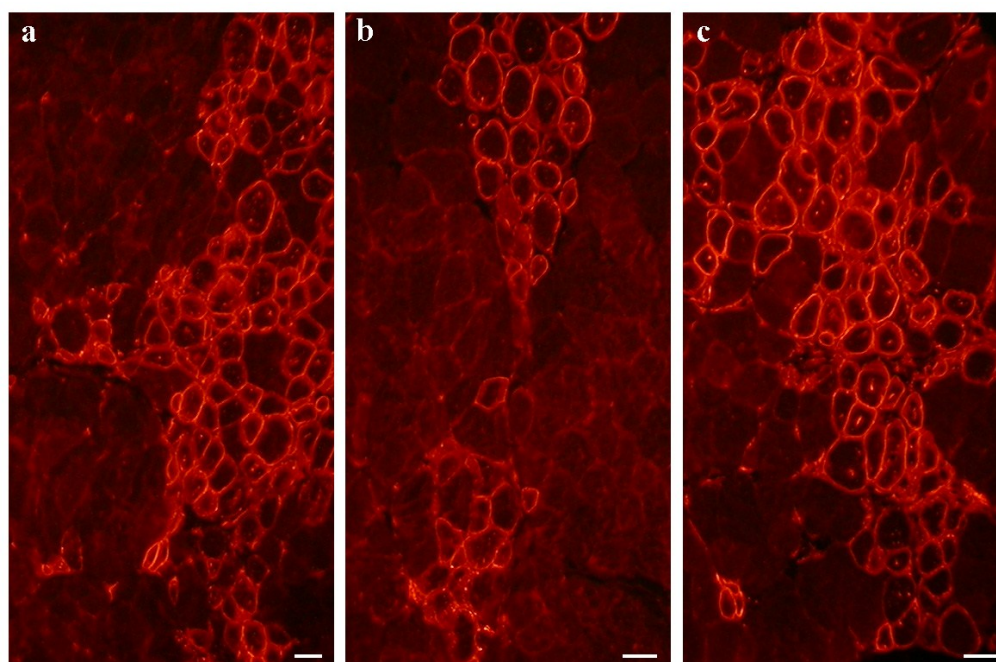


Figure 4

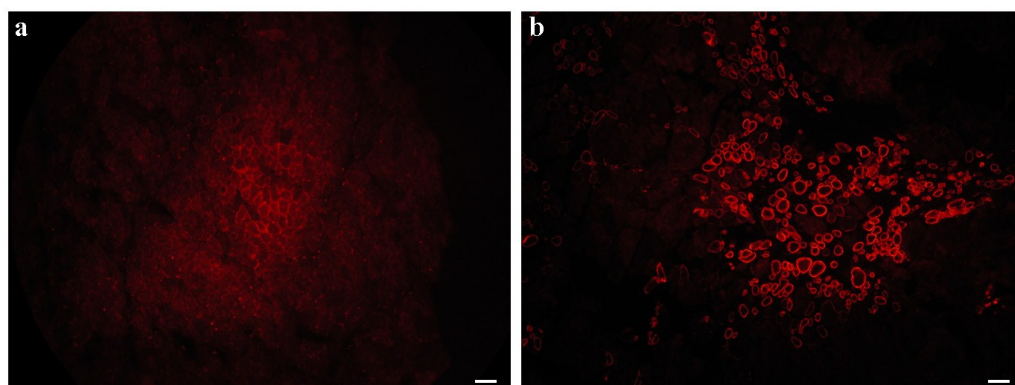


Figure 5

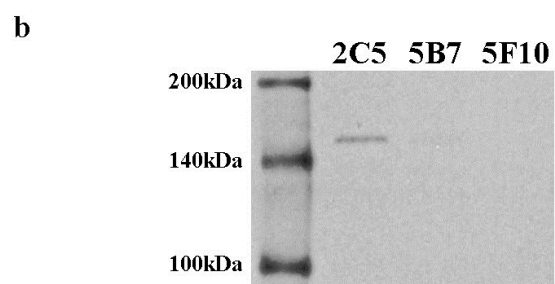
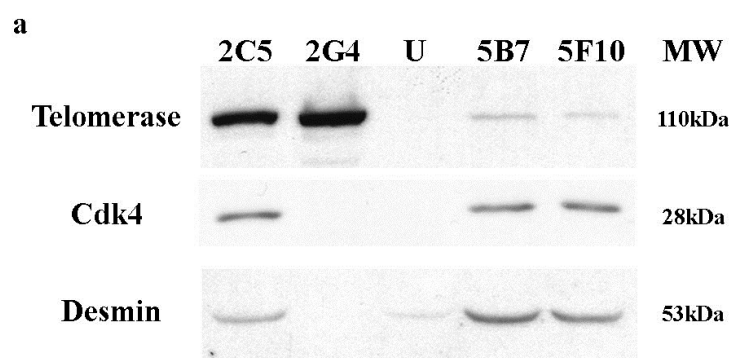


Figure 6

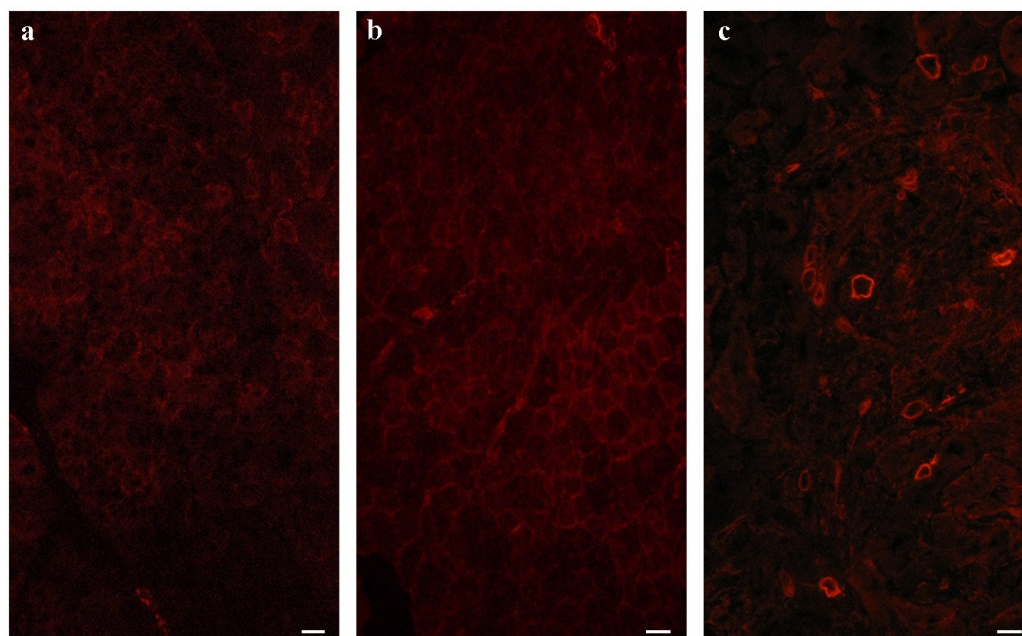


Figure 7

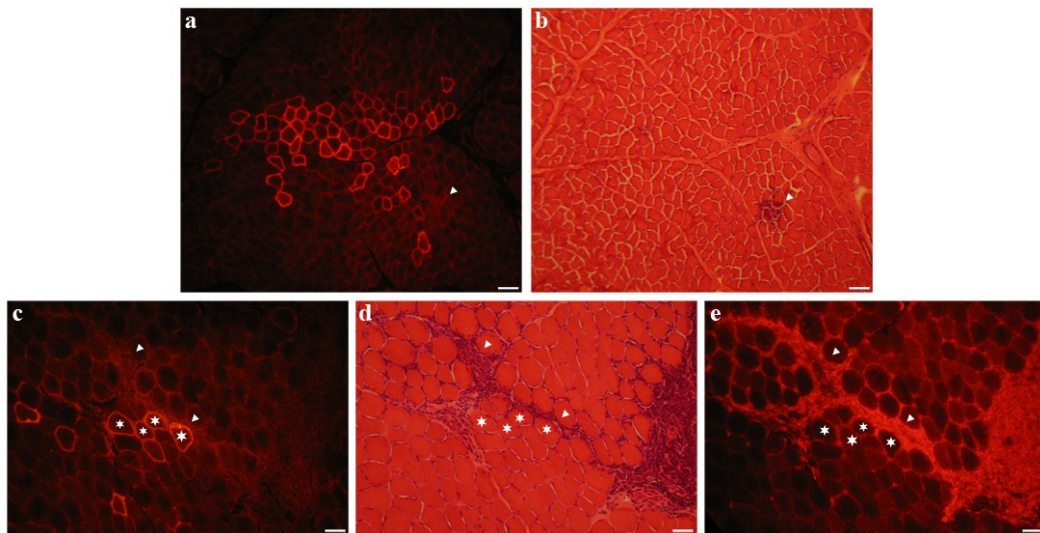
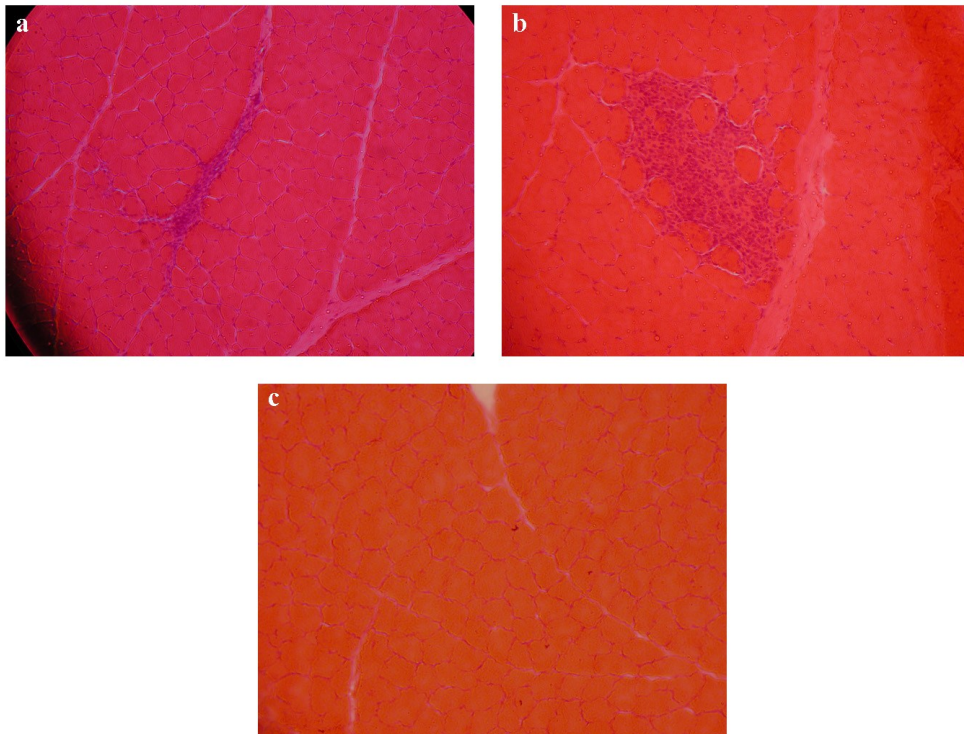


Figure 8



Chapitre 8 : Électroporation de la dystrophine de chien pleine longueur dans des muscles de souris et de chien dystrophique

Christophe Pichavant, Pierre Chapdelaine, Daniel G. Cerri, Joao C.S. Bizario et Jacques P. Tremblay

Contribution de chaque auteur :

J'ai effectué presque toutes les manipulations en lien avec cet article excepté ce qui suit. Pierre Chapdelaine m'a aidé à construire la dystrophine de chien pleine longueur, et Daniel G. Cerri et Joao C.S. Bizario ont fourni le chien dystrophique. J'ai rédigé ce manuscrit sous la supervision de Jacques P. Tremblay.

Résultats publiés dans le journal Human Gene Therapy, 2010

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique liée au chromosome X caractérisée par l'absence de dystrophine (427 kDa). Une approche pour éventuellement restaurer cette protéine chez le patient DMD est d'introduire un plasmide codant pour l'ADNc de la dystrophine dans ses muscles. Comme le phénotype du chien dystrophique est plus proche de celui du patient DMD comparé à celui de la souris *mdx*, nous avons étudié l'électroporation du plasmide codant pour la dystrophine de chien pleine longueur dans des muscles de chien dystrophique. Dans le but d'étudier cette méthode non virale, le transgène fut placé dans deux plasmides différents : l'un sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (CMV) et l'autre sous le contrôle d'un promoteur spécifique au muscle (MCK). Ces deux plasmides furent électroporés dans des muscles de souris immunodéficientes avec succès. L'électroporation du transgène placé sous le promoteur CMV dans un muscle de chien dystrophique mena aussi à l'expression de la dystrophine de chien dans le muscle traité. En conclusion, l'introduction de la dystrophine de chien pleine longueur par électroporation est une approche potentielle pour restaurer la dystrophine chez le patient DMD. Cependant, cette méthode doit être améliorée afin de pouvoir être applicable à l'Homme.

**ELECTROTRANSFER OF THE FULL LENGTH DOG DYSTROPHIN IN MOUSE
AND DYSTROPHIC DOG MUSCLES**

Christophe Pichavant¹, Pierre Chapdelaine¹, Daniel G. Cerri², Joao C.S. Bizario², Jacques P. Tremblay¹

¹ Unité de Recherche en Génétique Humaine, Centre de recherche de CHUL, CHUQ, Faculté de Médecine, Université Laval, Sainte-Foy, Québec, Canada

² Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP), School of Medicine, University of Ribeirão Preto, 14096-900 Ribeirão Preto-SP, Brazil

Correspondence should be addressed to: Jacques P. Tremblay Ph.D., Unité de Recherche en Génétique Humaine (RC 9300), Centre de recherche du CHUL, 2705 boulevard Laurier, Québec, QC, Canada, G1V 4G2. Phone: (418) 654-2186, Fax: (418) 654-2207
E-mail: Jacques-P.Tremblay@crchul.ulaval.ca

Running title: Electrotransfer of the Full Length Dog Dystrophin

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an X-linked genetic disease characterized by the absence of dystrophin (427 kDa). An approach to eventually restore this protein in DMD patients is to introduce a plasmid coding for dystrophin cDNA in their muscles. Since the phenotype of the dystrophic dog is closer to the human phenotype than the *mdx* mouse, we have studied the electrotransfer of a plasmid containing the full length dog dystrophin (FLDYS_{dog}) in dystrophic dog muscles. To achieve this non viral delivery, the FLDYS_{dog} cDNA was cloned in two plasmids containing either a CMV or a MCK promoter. In both cases, our results showed that the electrotransfer of these large plasmids (~17 kb) into mouse muscles allowed the FLDYS_{dog} expression in the treated muscles. The electrotransfer of pCMV.FLDYS_{dog} in a dystrophic dog muscle led also to the expression of dystrophin. In conclusion, the introduction of the full length dog dystrophin cDNA by electrotransfer in dystrophic dog muscles is a potential approach to restore the dystrophin in DMD patients. However, the electrotransfer procedure should be improved before applying it to humans.

Introduction

Muscular dystrophies are genetic diseases leading to muscle atrophy throughout the body. One of the most severe forms is Duchenne muscular dystrophy (DMD), which is characterized by the absence of dystrophin. This large protein of 427 kDa is encoded by a 14 kb mRNA (Hoffman *et al.*, 1987). Dystrophin is needed for the mechanical stability of muscle cells and its absence weakens the sarcolemma and thus makes myofibers less resistant to physical stress (Campbell and Kahl, 1989; Ervasti and Campbell, 1991). The introduction of dystrophin into dystrophic muscle fibres improves muscle resistance to stress and thus reduces inflammation within the muscles (Wang *et al.*, 2008). Since there is less inflammation, there is less secondary muscle fibre damage, thus less degeneration/regeneration cycles leading to satellite cell senescence and progressive replacement of muscle tissue by fat and connective tissue. Therefore, the restoration of dystrophin in dystrophic muscles would at least stabilise the muscular dystrophy phenotype.

There are two genes, which could be used to stop the progression of DMD. The first one is the full length dystrophin and the second one is a truncated version of this gene called a micro or a mini-dystrophin. The possibility of using a truncated gene to treat DMD originated from the observation of mild Becker muscular dystrophy patients (Beggs *et al.*, 1991). Indeed in Becker patients, there are different mutations in the dystrophin gene leading to partially functional dystrophin. However, since the full length dystrophin expression would provide a better stability to myofibers than the mini-dystrophin or the micro-dystrophin (Harper *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2009), we have studied the introduction of the full length dystrophin cDNA into muscles. Good results have previously been obtained with the delivery of the full length dystrophin with an adenoviral vector into neonatal *mdx* mouse muscles (Gilbert *et al.*, 2001). However, the same injection of this virus into adult *mdx* mouse muscles is less effective. Moreover, adenovirus injection has adverse effects, such as an immune response against the viral capsid and toxicity following the dissemination of the virus throughout the body (Douglas, 2007).

An approach, to avoid this problem, is to directly inject a cDNA coding for the gene of interest into muscles (Wolff *et al.*, 1990). A clinical trial performed on nine DMD

patients has shown the expression of human dystrophin in up to 6 % of the myofibers following intra-muscular injection of a plasmid coding for human full length dystrophin (Romero *et al.*, 2004). This technique is safe, fast and easy to use, but needs to be substantially improved. This could be done by using an electrotransfer technique to increase the incorporation of the plasmid into more myofibers (Aihara and Miyazaki, 1998; Mir *et al.*, 1999). Indeed, it is difficult to introduce large plasmids such as those containing dystrophin cDNA in muscle fibres. Since the first clinical trial in 1991 (Mir *et al.*, 1991), this technique involving gene therapy and electrotransfer has proven its safety and efficiency by introducing plasmids in several tissues such as skin, melanoma, etc (Favard *et al.*, 2007; Mir, 2008; Bodles-Brakhop *et al.*, 2009). With this approach, human and mouse full length dystrophin cDNA were introduced into *mdx* mouse muscles (Chapdelaine *et al.*, 2000; Vilquin *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 2008) but not yet in large animal.

Since there is no information about the use of the dog full length dystrophin and since the dystrophic dog is the best model to study DMD pathology, a dog full length dystrophin (FLDYS_{dog}) cDNA was cloned into a plasmid to allow its electrotransfer into muscles.

Materials and Methods

Animals

Rag^{-/-} *mdx* mice came from our own colony and C57BL/10SnJ mice were from Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The normal beagle dog was provided by Marshall BioResources (North Rose, NY). The dystrophic dog was born and housed at the Muscular Dystrophy Research Center (AADM/UNAERP, Brazil) in accordance with the guidelines set by the Institutional Laboratory Animal Care Committee of the University of Ribeirão Preto and arrived in our laboratory when it was two years old and was housed at Laval university animal service. The Brazilian colony was founded from one carrier female donated by Dr. Kornegay. The genotype analyses of the wild-type dogs and of the dystrophic dog in pedigrees segregating Golden retriever muscular dystrophy were previously described (Bartlett *et al.*, 1996). All the experiments made on these animals were approved by the Animal Protection Committee of Laval University.

Construct of the full length dog dystrophin plasmid

All the primers (Table 1) designed for the cloning of full length dystrophin were deduced from the *Canis lupus familiaris* dystrophin mRNA (accession sequence AF070485.1) submitted by Wilton's laboratory in 1998. The dog RNA was extracted from a biopsy of the *Brachialis anterior* muscle of a Beagle with Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) and afterwards reverse transcribed with Superscript III (Invitrogen) using reverse specific primers named GS 1, 2 and 3 (see Fig. 1A). The cDNA strands were transcribed with these specific primers covering entirely the dystrophin mRNA (11 kb). The cloning procedure of the full length dystrophin is summarized in Figure 1A showing the amplification of 4 amplicons named A, B, C and D resulting from a nested PCR strategy.

A first round of PCR reactions was done with 2 μ l of RT reaction for each amplicon, different sets of primer (noted 1s and 1r, see Table 1) used at 0.5 μ M each and Phusion DNA Polymerase (NEB, Pickering, Canada) in Phusion HF buffer as recommended by the manufacturer. Its thermal cycle program was at 98°C for 30 sec for the initial denaturation step following by 25 (for the fragment B) or 30 cycles (for the

fragments A, C and D) of denaturation (98°C, 10 sec), an annealing step (55°C, 30 sec) and an extension during 72°C for 1 min (B) or 1 min 30 sec (A, C and D). The final extension was at 72°C for 10 min and kept at 4°C. A second round of PCR was performed with 2 µl of the first round of PCR with primers annotated 2s and 2r (Table 1) and 35 cycles of PCR was performed as described for the first round PCR except for the 30 last annealing steps, which were done at 60°C. At the end of the extension step, Taq DNA polymerase (NEB) was added to the PCR medium and finally extended 10 minutes at 72°C.

The resulting amplicons A, B, C and D were cloned in TA cloning vector (pDrive, Qiagen, Mississauga, Canada) after the gel extraction of the agarose bands as suggested by the manufacturer. The sequential cloning of different amplicons were done in pCR3.1 EGFP vector (Chapdelaine *et al.*, 2000) where EGFP was removed by cutting the vector with *AgeI* and *Sall* followed by a Klenow treatment and religation regenerating a single *Sall* site in the cloning site. First, the fragment A coming from the pDrive containing this fragment (pDrive-A) was digested with *Sall/PstI* and ligated with T4 DNA ligase (NEB) in pCR3.1, cut with the same restriction enzymes and transformed chemically in competent DH5 α bacteria. The resulting pCR3.1-A was then cut with *PstI* and ligated to the fragment B obtained from the digestion of pDrive-B with *PstI*, the result of the ligation making pCR3.1-AB. To find the clones with the correct orientation of *PstI*-fragment B, an analysis with different restriction enzymes and sequencing were necessary to confirm its good orientation within the vector. As third cloning step, pCR3.1-AB was digested with *HindIII* (present only in *PstI*-fragment B and not in the vector) and the fragment C present in the pDrive-C was also digested with *HindIII*. The ligation between the pCR3.1-AB vector and the *HindIII*-fragment C was performed and transformed in DH5 α bacteria making pCR3.1-ABC bearing two sites *HindIII*. As previously described, the orientation of the obtained *HindIII*-fragment C was necessary to establish its good orientation in the vector construct. Finally, the last step consisted of the ligation of the pCR3.1-ABC digested with *KpnI* and the pDrive-D digested with *KpnI/ApaI*, making the final construct pCR3.1-ABCD (FLDYS_{dog}). Afterwards, it was transformed in competent Sure Cells (Stratagene, La Jolla, CA). The FLDYS_{dog} was driven by the CMV promoter present initially in pCR3.1 vector containing also the bGH polyadenylation site at 3' end as shown in Figure 1A. This vector was named pCMV.FLDYS_{dog}.

A second construct of FLDYS_{dog} was done by simply replacing the CMV promoter by the muscle creatine kinase (MCK) promoter (Jaynes *et al.*, 1988) to obtain expression only in myotubes or myofibers. This vector was named pMCK.FLDYS_{dog}.

Sequence analysis

Twenty primers, described in Table 2, were necessary to entirely sequence our 11 kb transgene. The obtained sequence is available on GenBank under the reference GU137540. The lalign program was used to compare two sequence alignments using the algorithm of Myers and Miller (Myers and Miller, 1988).

Cell culture

293T cells were cultured in DMEM-HG (Gibco, Burlington, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). Normal dog Muscle Precursor Cells (MPCs) came from muscle biopsies of a 3 month old dog. These cells were proliferated in MCBD120 medium (Hyclone, Mississauga, Canada) supplemented with 15% fetal bovine serum (Gibco), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), 10 µg/L of bFGF (Feldan, Saint-Laurent, Canada), 0.4 mg/L of dexamethasone (Sigma, Oakville, Canada) and 5 mg/L of insulin (Sigma). To obtain their differentiation in myotubes, cells were cultured in differentiation medium [DMEM (Gibco) supplemented with 2% fetal bovine serum (Invitrogen)]. All the cells were maintained at 37°C under 5% CO₂.

Plasmid transfection

Lipofectamine 2000 (Invitrogen) was used as a transfection reagent to obtain the expression of the pCMV.FLDYS_{dog} in 293T cells. The transfection protocol was the one recommended by the manufacturer. Briefly, 10 µg of plasmid in DMEM-HG was mixed with 10 µL of Lipofectamine 2000 in 40 µL of Opti-MEM and added to 293T cells. For the transfection control, the same amount of pCMV.GFP was transfected in other 293T cells.

Western blot

Proteins from differentiated normal dog MPCs (3 days in differentiation medium) and from transfected 293T cells (2 days after the transfection) were extracted by a methanol-chloroform technique to perform western blots. Twenty five μg of proteins were loaded per well. The dog dystrophin was detected with a mouse anti-dystrophin antibody MANHINGE1A (1:100, CIND, Oswestry, UK).

Electrotransfer

A single transcutaneous longitudinal injection of 40 μg of the pCMV.GFP or the FLDYS_{dog} plasmid at a final volume of 40 μL of Tyrode's buffer 1X (Sigma) was done in the *Tibialis anterior* (TA) of Rag^{-/-} mdx mice and the "Electrode Electrolyte" cream (Teca Corporation, Pleasantville, NY) was applied on the skin to favour the passage of the electric field between the two electrode plates. These plates were fitted on the skin of the mouse TA (4 to 5 mm of separation between the plates) and the voltage was delivered. The generator used in this experiment was a Grass S48 Stimulator (Astro-Med, West Warwick, RI) and delivered square wave pulses. The parameters were 12 pulses of 180 V/cm (approximately 80 to 90 V) of 25 ms duration spaced by 300 ms. The electrotransferred muscles were harvested two weeks after the experiment and were snap-frozen in liquid nitrogen. Serial 12 μm cryostat sections were obtained throughout the entire muscle.

For the dystrophic dog, 200 μg of the pCMV.FLDYS_{dog} were injected at a final volume of 200 μL of Tyrode's buffer 1X (Sigma) into the *Brachialis anterior*. Two close injections of 100 μL were directly made into the muscle previously exposed by cutting the skin. Afterwards, two needles (27G, Hamilton, Reno, NV) separated by 4 mm were implanted in the muscle at 1 cm deep around the plasmid injection area and 8 electric pulses of 100 V were applied without moving the needles. The pulsations lasted 25 ms and were spaced by 300 ms. For the negative control, 200 μL of Tyrode's buffer 1X (Sigma) were injected into the muscle. Suture points were placed in the muscle to distinguish the areas of electrotransfer. The regions that were electrotransferred were biopsied two weeks later and they were prepared as done for the mouse muscles, except that the cryostat sections were 18 μm thick.

Histological analysis

Haematoxylin-eosin staining was used for a morphological analysis of the electrotransferred muscles. Immuno-histofluorescence to detect the dystrophin was performed with a mouse anti-dystrophin antibody MANDYS104 (1:10, CIND), which reacts on dog but not on mouse dystrophin. To detect the presence of dog CD8⁺ cells, a rat anti-CD8 antibody (1:80, AbD Serotec, Oxford, UK) was used. Alpha-sarcoglycan was revealed with a mouse anti- α -sarcoglycan antibody NCL-a-SARC (1:100, Novocastra, Newcastle, UK). These primary antibodies were followed by an incubation with a biotinylated anti-mouse or anti-rat antibody (1:300, Dako, Mississauga, Canada) and with the Streptavidin-Cy3 (1:300, Sigma). Afterwards, the sections were mounted in PBS-glycerol (1:1). GFP and histological analysis were observed under fluorescence using an Axiophot microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

Results

The full length dog dystrophin plasmid

The RNA was extracted from a muscle biopsy of a beagle dog and three cDNA strands covering the full length dystrophin transcript were transcribed using three specific reverse primers (GS1, 2 and 3) as shown in Figure 1A. The use of a nested PCR strategy (Table 1 and Fig. 1A), as described in Materials and Methods, produced 4 amplicons (A, B, C and D) containing at their extremities different restriction enzyme sites. These amplicons were cloned consecutively in four steps into pCR3.1 vector according to their restriction sites, resulting to the dog FLDYS_{dog}. This transgene was driven by a CMV promoter present in pCR3.1 vector. The resulting plasmid was named pCMV.FLDYS_{dog} (Fig. 1A). The complete sequencing of FLDYS_{dog} plasmid was done using 20 primers (Table 2), which were necessary to cover the sequence of the transgene.

The obtained nucleotide and amino acid sequences (accession number GU137540) were then compared to the sequence submitted previously by the Wilton's team (accession number AF0704858.1). Our sequence had three nucleotides less than that of the Wilton's sequence – 11 040 vs 11 043 bp – and there were also 5 gaps and 28 nucleotide substitutions between the two sequences (Supplementary Table 1 and also described in our submission on GenBank). At the proteomic level, 23 amino acids were different and 15 of them had the same properties (Supplementary Table 2). Furthermore, we have compared our FLDYS_{dog} sequence with the predicted one (accession number XM_850502.1 derived from the genomic sequence NW_879562.1). Even if this sequence lacked the 91 first nucleotides compared to our sequence, we have just found 5 gaps and 4 nucleotide substitutions (Supplementary Table 3); these differences were also present in our first sequence comparison.

In vitro expression of dog dystrophin

To verify the expression of the FLDYS_{dog} contained in the pCR3.1 vector, the plasmid was transfected in 293T cells using Lipofectamine 2000. Two days later, proteins were extracted and a western blot was done. The detection of dog dystrophin was

performed with the use of a monoclonal antibody (MANHINGE1A) confirming that our plasmid FLDYS_{dog} was able to express the full length dystrophin protein at the expected size (~427 kDa) (Fig. 1B).

Electrotransfer in Rag^{-/-} mdx mouse muscles

After this positive *in vitro* result, our plasmid was also transduced in mouse muscles using the electrotransfer technique to allow a better penetration of the plasmids previously injected in the muscle into fibres via an electric field. To set the best effective parameters for the electrotransfer, 40 µg of the plasmid coding for green fluorescent protein (pCMV.GFP) were electrotransferred into the TA of immunodeficient (Rag^{-/-}) *mdx* mice (n = 6). Two weeks later, the TAs were harvested and GFP was detected in cryostat sections (Fig. 2a). This method was thus efficient to introduce plasmids in muscles. Forty µg of pCMV.FLDYS_{dog} was thus electrotransferred in 6 TAs of Rag^{-/-} *mdx* mice (n = 6) and these TAs were analysed two weeks later by immuno-histofluorescence with an antibody recognizing the dystrophin (MANDYS104). The muscles electrotransferred with the GFP plasmid, were used as a negative control for dystrophin expression. As expected, no myofiber expressing the dystrophin was detected in the GFP electrotransferred muscles (Fig. 2b), while 50 to 70 dystrophin positive myofibers were detected per cryosection in muscles electrotransferred with the pCMV.FLDYS_{dog} (Fig. 2c and d).

The FLDYS_{dog} expression was also tested under a muscle specific promoter: the MCK promoter. The plasmid was obtained by replacing the CMV promoter with the MCK promoter, giving the pMCK.FLDYS_{dog}. Forty µg of this new plasmid were electrotransferred into the TAs of Rag^{-/-} *mdx* mice (n = 4) and two weeks later, the TAs were harvested. Immuno-histofluorescence with the MANDYS104 antibody was used to detect myofibers expressing dystrophin (Fig. 2e and f). Between 25 and 40 myofibers expressing this transgene per cryosection were observed following this electrotransfer. The number of dystrophin-positive myofibers was thus lower with the MCK promoter than with the CMV promoter.

Restoration of α -sarcoglycan in electrotransferred mouse muscles

The dystrophin is normally associated with other proteins to form a complex: the Dystrophin-associated Glycoprotein Complex (DGC) and the absence of dystrophin leads to an instability of this complex (Ervasti *et al.*, 1990). To confirm whether the expression of FLDYS_{dog} was associated with the restoration of the DGC, an immunohistofluorescence against the α -sarcoglycan protein, one of its components, was performed on the mouse muscles electrotransferred with the pCMV.FLDYS_{dog}. Rag^{-/-} *mdx* mouse and non-dystrophic mouse (C57BL/10SnJ) muscles were respectively used as negative (Fig. 3a) and positive (Fig. 3b) control for α -sarcoglycan expression. As shown in Figure 3 lower panel, the presence of FLDYS_{dog} (Fig. 3c) was co-localized with the expression of α -sarcoglycan (Fig. 3d) on electrotransferred mouse muscles, proving that the introduction of FLDYS_{dog} leads to the expression of α -sarcoglycan.

Electrotransfer in dystrophic dog muscles

After these positive results in mice, an electrotransfer experiment was done in the dystrophic dog since it is the best model to study the DMD pathology. Two hundred μ g of pCMV.FLDYS_{dog} were injected in the *Brachialis anterior* of a dystrophic dog (n = 1). The electrotransferred region was biopsied two weeks later and myofibers expressing the FLDYS_{dog} were observed by immuno-histofluorescence in cryosections (Fig. 4a and d). Up to 35 dystrophin positive fibres were counted per cryosection of this muscle whereas the muscle electrotransferred with only the saline solution, i.e., used as negative control for the experiment, did not present more than three dystrophin positive fibres per cryosection (Fig. 5a). To verify whether the plasmid expression can induce an immune response in the dystrophic dog, the muscle sections were stained with haematoxylin-eosin. No cell accumulation was detected in the muscle electrotransferred with the saline solution (Fig. 5b) nor in the non-electrotransferred muscle (data not shown). However, accumulations of mononuclear cells with the morphology of lymphocytes were observed in the muscles electrotransferred with FLDYS_{dog}. Indeed, the lymphocyte infiltration was co-localised (Fig. 4b and c) or not (Fig. 4e and f) with the myofibers expressing the FLDYS_{dog} (Fig. 4a and d). An immuno-histochemical staining of CD8⁺ confirmed that many cells in these cellular accumulations were cytotoxic T-lymphocytes (Fig. 4).

Discussion

When we looked for the sequence of dog dystrophin in databases, we first found a sequence submitted in 1998 by the Wilton's laboratory (accession number AF0704858.1), another one accessible in 2008 (NM_001003343.1) and one predicted by an automated computational analysis (XM_850502.1). The first two sequences were identical, thus these two sequences could be put together in GenBank. Concerning the last sequence, it lacks some nucleotides in N-terminal, which brings the first codon (ATG) to the position 279 instead of being further up in the sequence, compiling a sequence of only 10 674 nucleotides. The fact that our sequence of 11 040 bp is different from that of Wilton's group (i.e., 5 gaps and 28 nucleotide substitutions) may be due to two main reasons: first of all, the dog strain used to obtain our dog dystrophin was a Beagle whereas they used a Golden retriever. The second reason may be due to the progress in technology between the time of their sequencing and ours (more than 10 years). Nevertheless, there is more than 99 % of homology between the previously published sequences and our sequence without the presence of significant variations

The plasmid coding for our cloned full length dog dystrophin cDNA was shown to be functional following the dystrophin detection by western blot in cells transfected with this plasmid. This expression was also obtained *in vivo* after its introduction in mouse and dystrophic dog muscles with a non viral gene therapy method, the DNA electrotransfer. This technique allows to transfect all myofiber types (Fewell *et al.*, 2001; Bertrand *et al.*, 2003) and allows a long-term expression of a plasmid in skeletal muscles since myofibers are post-mitotic. Compared to viral gene therapies, this is a faster method since no virus production is required and may be as well less immunogenic and safer since no virus or viral capsid is introduced into the body (Wang *et al.*, 2007; Trollet *et al.*, 2008; Ohshima *et al.*, 2009). Even if some plasmids injected during the electrotransfer may go into the bloodstream, the use of a muscle specific promoter will insure that the transgene expression is restricted to myofibers (Miranda *et al.*, 1988); this can also be the case for virus injections. However, the incorporation of naked plasmids by cells is very weak without the use of electrotransfer, whereas a virus circulating in the blood can spread throughout the body reaching other organs than muscles (Douglas, 2007; Zaiss and Muruve, 2008). This

method combining electrotransfer and gene therapy has been used in muscles, tumours and skin in large animal such as dogs, pigs, non-human primates, etc and is currently in clinical trials to treat different diseases (Bodles-Brakhop *et al.*, 2009).

Others efficient non viral gene therapies exist to introduce a plasmid into muscles. The first one is the delivery of a plasmid by hydrodynamic limb vein injection, which was initiated by the Wolff's team (Hagstrom *et al.*, 2004). Their most recent study using this technique showed up to 20 % of dystrophin expression throughout the injected *mdx* muscles (Zhang *et al.*, 2009) but there is a lack of information about this procedure since it is still recent. The use of minicircle plasmids seems to be also an interesting venue (Mayrhofer *et al.*, 2009). This approach allows to remove the bacterial backbone sequence consisting of an antibiotic resistance gene, an origin of replication and inflammatory sequences intrinsic to bacterial DNA gene, for an improved safety profile. In addition, the size of the plasmid is reduced to increase the gene transfer efficiency. Another method allowing a better plasmid dispersion is to fuse the transgene of interest with a peptide containing a protein transduction domain (PTD) and a nuclear localization signal (NLS), such as VP22 (Xiong *et al.*, 2007) or TAT κ (Flinterman *et al.*, 2009).

The GFP expression in the muscles electrotransferred with the pCMV.GFP was more important than that of the dystrophin following the electrotransfer of the pCMV.FLDYS_{dog}. This was expected since the efficiency of plasmid transduction decreases with its increasing size (Wells *et al.*, 2008). Indeed, the pCMV.FLDYS_{dog} size is almost three times superior to that of pCMV.GFP (17 kb vs 5.8 kb). The dystrophin expression was twice more important in the mouse muscles electrotransferred with the pCMV.FLDYS_{dog} than those electrotransferred with the pMCK.FLDYS_{dog}. Even if the MCK promoter insures the transgene expression restricted to myofibers, it is less strong than the CMV promoter (Fabre *et al.*, 2006), this can explain the difference of efficiency. For the dystrophic dog, the dystrophin expression was less important in its electrotransferred muscle than that observed in the mouse muscles electrotransferred with the pCMV.FLDYS_{dog} but its level of expression corresponds to the one obtained in the mouse muscles electrotransferred when the transgene was under the control of the MCK promoter. This difference of efficiency is probably simply due to an easier and more effective electrotransfer technique in smaller muscles, such as those of mice, than in bigger

muscles, such as those of dog. In addition, the electric parameters for electrotransfer in smaller muscles are already well established, which is not the case for large dog muscles (Jiao *et al.*, 1992; Fewell *et al.*, 2001; Fattori *et al.*, 2005).

The restoration of the α -sarcoglycan, a protein of the DGC, was also verified in the mouse muscles electrotransferred with the pCMV.FLDYS_{dog}. Indeed, the dystrophin expression was correlated with the α -sarcoglycan expression. This shows that the FLDYS_{dog} can bind to the DGC, restore this complex and thus be functional.

The electrotransfer of pCMV.FLDYS_{dog} in dog muscle led to the expression of FLDYS_{dog} but also to mononuclear cell infiltration. Dystrophin expression was either observed alone (i), or colocalised with cytotoxic T-lymphocytes (ii). The presence of cytotoxic T-lymphocytes without the expression of dystrophin was also observed (iii). The observed infiltration can be due to either a non-specific immune response or a specific immune response. Concerning the non-specific immune response, some signs of inflammatory response may still be present in a muscle that has been electrotransferred two weeks before. However, none of these signs was noticed in the muscle electrotransferred with only the saline solution. Therefore, the observed infiltration is related to an adaptive immune response. Indeed, it is as if we have managed to fix the sequence of events corresponding to an immune response: the expression of an antigen (i), the infiltration of cytotoxic cells near the muscle fibres expressing the antigen (ii) and the elimination of the muscle fibres expressing this antigen (iii). The cause(s) of this specific immune response remain(s) to be determined but it seems to be due to one or more components of the plasmid. The first one is the FLDYS_{dog}. There are contradictory results in dystrophic mouse experiments receiving transplantation of syngeneic MPCs expressing normal dystrophin. One study reported the production of antibodies reacting with dystrophin, but without inducing rejection at long-term (Vilquin *et al.*, 1995). Whereas another study reported both antibody production and specific T-lymphocyte reaction against dystrophin, leading to rejection (Ohtsuka *et al.*, 1998). In DMD patients, anti-dystrophin antibodies were also observed following normal MPC grafts (Roy *et al.*, 1993). However, we recently observed the same type of immune response in normal dog muscles electrotransferred with a dog micro-dystrophin plasmid (Pichavant *et al.*). For this reason, it does not seem that the dystrophin expression is the major cause of rejection in our case even if its expression can

be part of it. Therefore, it seems that other components of the plasmid are more involved in the observed immune response such as the antibiotic resistance gene or CpG sequence motifs (Mayrhofer *et al.*, 2009; Tolmachov, 2009).

In the dog experiment, a longer term study should thus be made to verify whether there will still be an expression of dystrophin and to verify the absence or presence of cellular infiltrations. Therefore, in the future, modifications of plasmid should be taken into consideration to check the immunogenicity of plasmid components.

The first time that a restoration of full length dog dystrophin was observed in dystrophic dogs was in 2006 by Cossu's laboratory with an intra-arterial delivery of wild-type dog mesoangioblasts. However, the treated dystrophic dogs needed immunosuppression since allogenic mesoangioblasts were used (Sampaolesi *et al.*, 2006). Thus, we are the first ones to demonstrate a local restoration of the full length dog dystrophin in dystrophic dog muscle by gene therapy, and more precisely by electrotransfer, a method requiring neither cell nor virus and a possible alternative to viral approaches for *in vivo* gene transfer. Since the phenotype of dystrophic dogs is the closest to that of the DMD patient, plasmid electrotransfer could be a possible avenue to study the function of the full length dystrophin in the dystrophic dog and a potential treatment for muscular dystrophies such as DMD.

Although it seems that the full length dystrophin provides a better stability to myofibers than the mini-dystrophin or the micro-dystrophin (Harper *et al.*, 2002; Banks *et al.*, 2009), the fibre number expressing the FLDYS_{dog} following the electrotransfer was lower than the electrotransfer of dog micro-dystrophin in dog muscle (Pichavant *et al.*, 2010). However, it remains to determine if it is better to have a high number of micro-dystrophin positive fibres or a lower number of full length dystrophin positive fibres regarding to the stability provided by these two transgenes to the myofibers.

To restore muscle strength and thus to correct the phenotype of the dystrophic dog, the next step will be to improve the efficiency of the delivery method, such as the use of minicircle or a protein transduction domain coupled with a nuclear localization signal (PTD-NLS). This will also require a more detailed study of the electrotransfer parameters to obtain a wider expression of the FLDYS_{dog} such as the use of a combination of low-voltage and high-voltage pulses (Andre *et al.*, 2008; Hojman *et al.*, 2008). These

parameters should be considered to study the introduction of the dystrophin in a complete dog muscle.

Acknowledgments

We thank Dr. Glenn E. Morris and Dr. Le Thanh Lam (Wolfson Centre for Inherited Neuromuscular Disease, Oswestry, UK) for providing the MANHINGE1A and MANDYS104 antibodies, and Guylaine Jalbert and Dr. Brigitte Dubé for their technical assistances during the experiments performed in dogs. Dr Tremblay is the president and hold shares in CellGene inc., a biotech company involved in the development of cell and gene therapies.

References

- AIHARA, H., and MIYAZAKI, J. (1998). Gene transfer into muscle by electroporation in vivo. *Nat Biotechnol* **16**, 867-870.
- ANDRE, F.M., GEHL, J., SERSA, G., PREAT, V., HOJMAN, P., ERIKSEN, J., GOLZIO, M., CEMAZAR, M., PAVSELJ, N., ROLS, M.P., MIKLAVCIC, D., NEUMANN, E., TEISSIE, J., and MIR, L.M. (2008). Efficiency of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle, liver, tumor, and skin. *Hum Gene Ther* **19**, 1261-1271.
- BANKS, G.B., CHAMBERLAIN, J.S., and FROEHNER, S.C. (2009). Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure. *Mol Cell Neurosci* **40**, 433-441.
- BARTLETT, R.J., WINAND, N.J., SECORE, S.L., SINGER, J.T., FLETCHER, S., WILTON, S., BOGAN, D.J., METCALF-BOGAN, J.R., BARTLETT, W.T., HOWELL, J.M., COOPER, B.J., and KORNEGAY, J.N. (1996). Mutation segregation and rapid carrier detection of X-linked muscular dystrophy in dogs. *Am J Vet Res* **57**, 650-654.
- BEGGS, A.H., HOFFMAN, E.P., SNYDER, J.R., ARAHATA, K., SPECHT, L., SHAPIRO, F., ANGELINI, C., SUGITA, H., and KUNKEL, L.M. (1991). Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies. *Am J Hum Genet* **49**, 54-67.
- BERTRAND, A., NGO-MULLER, V., HENTZEN, D., CONCORDET, J.P., DAEGELEN, D., and TUIL, D. (2003). Muscle electrotransfer as a tool for studying muscle fiber-specific and nerve-dependent activity of promoters. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**, C1071-1081.
- BODLES-BRAKHOP, A.M., HELLER, R., and DRAGHIA-AKLI, R. (2009). Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments. *Mol Ther* **17**, 585-592.
- CAMPBELL, K.P., and KAHL, S.D. (1989). Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature* **338**, 259-262.
- CHAPDELAIN, P., MOISSET, P.A., CAMPEAU, P., ASSELIN, I., VILQUIN, J.T., and TREMBLAY, J.P. (2000). Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development. *Protein Eng* **13**, 611-615.
- DOUGLAS, J.T. (2007). Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol* **36**, 71-80.
- ERVASTI, J.M., and CAMPBELL, K.P. (1991). Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* **66**, 1121-1131.
- ERVASTI, J.M., OHLENDIECK, K., KAHL, S.D., GAVER, M.G., and CAMPBELL, K.P. (1990). Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature* **345**, 315-319.
- FABRE, E.E., BIGEY, P., ORSINI, C., and SCHERMAN, D. (2006). Comparison of promoter region constructs for in vivo intramuscular expression. *J Gene Med* **8**, 636-645.
- FATTORI, E., CAPPELLETTI, M., ZAMPAGLIONE, I., MENNUNI, C., CALVARUSO, F., ARCURI, M., RIZZUTO, G., COSTA, P., PERRETTA, G., CILIBERTO, G.,

- and LA MONICA, N. (2005). Gene electro-transfer of an improved erythropoietin plasmid in mice and non-human primates. *J Gene Med* **7**, 228-236.
- FAVARD, C., DEAN, D.S., and ROLS, M.P. (2007). Electrotransfer as a non viral method of gene delivery. *Curr Gene Ther* **7**, 67-77.
- FEWELL, J.G., MACLAUGHLIN, F., MEHTA, V., GONDO, M., NICOL, F., WILSON, E., and SMITH, L.C. (2001). Gene therapy for the treatment of hemophilia B using PINC-formulated plasmid delivered to muscle with electroporation. *Mol Ther* **3**, 574-583.
- FLINTERMAN, M., FARZANEH, F., HABIB, N., MALIK, F., GAKEN, J., and TAVASSOLI, M. (2009). Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products. *Mol Ther* **17**, 334-342.
- GILBERT, R., NALBANTOGLU, J., HOWELL, J.M., DAVIES, L., FLETCHER, S., AMALFITANO, A., PETROF, B.J., KAMEN, A., MASSIE, B., and KARPATI, G. (2001). Dystrophin expression in muscle following gene transfer with a fully deleted ("guttled") adenovirus is markedly improved by trans-acting adenoviral gene products. *Hum Gene Ther* **12**, 1741-1755.
- HAGSTROM, J.E., HEGGE, J., ZHANG, G., NOBLE, M., BUDKER, V., LEWIS, D.L., HERWEIJER, H., and WOLFF, J.A. (2004). A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. *Mol Ther* **10**, 386-398.
- HARPER, S.Q., HAUSER, M.A., DELLORUSSO, C., DUAN, D., CRAWFORD, R.W., PHELPS, S.F., HARPER, H.A., ROBINSON, A.S., ENGELHARDT, J.F., BROOKS, S.V., and CHAMBERLAIN, J.S. (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med* **8**, 253-261.
- HOFFMAN, E.P., BROWN, R.H., JR., and KUNKEL, L.M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* **51**, 919-928.
- HOJMAN, P., GISSEL, H., ANDRE, F.M., COURNIL-HENRIONNET, C., ERIKSEN, J., GEHL, J., and MIR, L.M. (2008). Physiological effects of high- and low-voltage pulse combinations for gene electrotransfer in muscle. *Hum Gene Ther* **19**, 1249-1260.
- JAYNES, J.B., JOHNSON, J.E., BUSKIN, J.N., GARTSIDE, C.L., and HAUSCHKA, S.D. (1988). The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. *Mol Cell Biol* **8**, 62-70.
- JIAO, S., WILLIAMS, P., BERG, R.K., HODGEMAN, B.A., LIU, L., REPETTO, G., and WOLFF, J.A. (1992). Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum Gene Ther* **3**, 21-33.
- MAYRHOFER, P., SCHLEEF, M., and JECHLINGER, W. (2009). Use of minicircle plasmids for gene therapy. *Methods Mol Biol* **542**, 87-104.
- MIR, L.M. (2008). Application of electroporation gene therapy: past, current, and future. *Methods Mol Biol* **423**, 3-17.
- MIR, L.M., BELEHRADEK, M., DOMENGE, C., ORLOWSKI, S., PODDEVIN, B., BELEHRADEK, J., JR., SCHWAAB, G., LUBOINSKI, B., and PAOLETTI, C. (1991). [Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]. *C R Acad Sci III* **313**, 613-618.

- MIR, L.M., BUREAU, M.F., GEHL, J., RANGARA, R., ROUY, D., CAILLAUD, J.M., DELAERE, P., BRANELLEC, D., SCHWARTZ, B., and SCHERMAN, D. (1999). High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4262-4267.
- MIRANDA, A.F., BONILLA, E., MARTUCCI, G., MORAES, C.T., HAYS, A.P., and DIMAURO, S. (1988). Immunocytochemical study of dystrophin in muscle cultures from patients with Duchenne muscular dystrophy and unaffected control patients. *Am J Pathol* **132**, 410-416.
- MYERS, E.W., and MILLER, W. (1988). Optimal alignments in linear space. *Comput Appl Biosci* **4**, 11-17.
- OHSHIMA, S., SHIN, J.H., YUASA, K., NISHIYAMA, A., KIRA, J., OKADA, T., and TAKEDA, S. (2009). Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle. *Mol Ther* **17**, 73-80.
- OHTSUKA, Y., UDAKA, K., YAMASHIRO, Y., YAGITA, H., and OKUMURA, K. (1998). Dystrophin acts as a transplantation rejection antigen in dystrophin-deficient mice: implication for gene therapy. *J Immunol* **160**, 4635-4640.
- PICHAVANT, C., CHAPDELAIN, P., CERRI, D.G., DOMINIQUE, J.C., QUENNEVILLE, S.P., SKUK, D., KORNEGAY, J.N., BIZARIO, J.C., XIAO, X., and TREMBLAY, J.P. Expression of dog microdystrophin in mouse and dog muscles by gene therapy. *Mol Ther* **18**, 1002-1009.
- ROMERO, N.B., BRAUN, S., BENVENISTE, O., LETURCQ, F., HOGREL, J.Y., MORRIS, G.E., BAROIS, A., EYMARD, B., PAYAN, C., ORTEGA, V., BOCH, A.L., LEJEAN, L., THIOUDELLET, C., MOUROT, B., ESCOT, C., CHOQUEL, A., RECAN, D., KAPLAN, J.C., DICKSON, G., KLATZMANN, D., MOLINIER-FRENCKEL, V., GUILLET, J.G., SQUIBAN, P., HERSON, S., and FARDEAU, M. (2004). Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **15**, 1065-1076.
- ROY, R., TREMBLAY, J.P., HUARD, J., RICHARDS, C., MALOUIN, F., and BOUCHARD, J.P. (1993). Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne-dystrophic patients, donor HLA compatible. *Transplant Proc* **25**, 995-997.
- SAMPAOLESI, M., BLOT, S., D'ANTONA, G., GRANGER, N., TONLORENZI, R., INNOCENZI, A., MOGNOL, P., THIBAUD, J.L., GALVEZ, B.G., BARTHELEMY, I., PERANI, L., MANTERO, S., GUTTINGER, M., PANSARASA, O., RINALDI, C., CUSELLA DE ANGELIS, M.G., TORRENTE, Y., BORDIGNON, C., BOTTINELLI, R., and COSSU, G. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature* **444**, 574-579.
- TOLMACHOV, O. (2009). Designing plasmid vectors. *Methods Mol Biol* **542**, 117-129.
- TROLLET, C., SCHERMAN, D., and BIGEY, P. (2008). Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges. *Methods Mol Biol* **423**, 199-214.
- VILQUIN, J.T., KENNEL, P.F., PATURNEAU-JOUAS, M., CHAPDELAIN, P., BOISSEL, N., DELAERE, P., TREMBLAY, J.P., SCHERMAN, D., FISZMAN, M.Y., and SCHWARTZ, K. (2001). Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies. *Gene Ther* **8**, 1097-1107.

- VILQUIN, J.T., WAGNER, E., KINOSHITA, I., ROY, R., and TREMBLAY, J.P. (1995). Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin. *J Cell Biol* **131**, 975-988.
- WANG, B., LI, J., QIAO, C., CHEN, C., HU, P., ZHU, X., ZHOU, L., BOGAN, J., KORNEGAY, J., and XIAO, X. (2008). A canine minidystrophin is functional and therapeutic in mdx mice. *Gene Ther* **15**, 1099-1106.
- WANG, Z., KUHR, C.S., ALLEN, J.M., BLANKINSHIP, M., GREGOREVIC, P., CHAMBERLAIN, J.S., TAPSCOTT, S.J., and STORB, R. (2007). Sustained AAV-mediated dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy with a brief course of immunosuppression. *Mol Ther* **15**, 1160-1166.
- WELLS, K.E., MCMAHON, J., FOSTER, H., FERRER, A., and WELLS, D.J. (2008). Gene delivery to dystrophic muscle. *Methods Mol Biol* **423**, 421-431.
- WOLFF, J.A., MALONE, R.W., WILLIAMS, P., CHONG, W., ACSADI, G., JANI, A., and FELGNER, P.L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465-1468.
- XIONG, F., XIAO, S., YU, M., LI, W., ZHENG, H., SHANG, Y., PENG, F., ZHAO, C., ZHOU, W., CHEN, H., FANG, L., CHAMBERLAIN, J.S., and ZHANG, C. (2007). Enhanced effect of microdystrophin gene transfection by HSV-VP22 mediated intercellular protein transport. *BMC Neurosci* **8**, 50.
- ZAISS, A.K., and MURUVE, D.A. (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* **15**, 808-816.
- ZHANG, G., WOODDELL, C.I., HEGGE, J.O., GRIFFIN, J.B., HUSS, T., BRAUN, S., and WOLFF, J.A. (2009). Functional Efficacy of Dystrophin Expression from Plasmids Delivered to mdx Mice by Hydrodynamic Limb Vein Injection. *Hum Gene Ther*.

Figure Legend

FIG. 1. The full length dog dystrophin plasmid. **(A)** Schematic representation of the steps of the cloning procedure of the FLDYS_{dog}. GS 1, 2 and 3 were reverse specific primers to obtain the cDNA of the FLDYS_{dog} from the RNA. A, B, C and D corresponded to 4 amplicons resulting of nested PCR strategy where the primer sequence of each amplicon is shown in Table 1. The plasmid used to clone the FLDYS_{dog} was a PCR3.1 vector, this transgene was thus under the control of a CMV promoter and also linked to the bGH polyadenylation site at 3'end. In addition, this plasmid contained antibiotic resistance genes to the ampicillin and to the neomycin. The plasmid resulting of this cloning was named pCMV.FLDYS_{dog}. **(B)** Western blot anti-dystrophin made with FLDYS_{dog} transfected 293T cells, GFP transfected 293T cells as negative control and normal dog muscle precursor cells (MPCs) in differentiation as positive control. Dystrophin expression was thus found in FLDYS_{dog} transfected cells.

FIG. 2. Electrotransfer in Rag^{-/-} *mdx* mouse muscles. **(a)** The electrotransfer of the pCMV.GFP induced the expression of GFP in several myofibers. **(b)** No dystrophin expression was detected following the immuno-histofluorescence for this protein in muscles electrotransferred with the pCMV.GFP. **c,d** and **e,f** are two different sections of muscles electrotransferred respectively with pCMV.FLDYS_{dog} and pMCK.FLDYS_{dog}. These sections show several myofibers expressing dystrophin in its typical subsarcolemmal location. Scale bar = 50 μ m. The cross-sections represent the global result from the electrotransfer with n = 6 for pCMV.GFP, n = 6 for pCMV.FLDYS_{dog} and n = 4 for pMCK.FLDYS_{dog}.

FIG. 3. Co-localisation of the FLDYS_{dog} and α -sarcoglycan in electrotransferred mouse muscles. **a** and **b** are respectively two cryostat sections of a Rag^{-/-} *mdx* and a C57BL/10SnJ mouse muscle and correspond to the negative and positive control for α -sarcoglycan expression. **c** and **d** are two regions of a same mouse muscle electrotransferred with pCMV.FLDYS_{dog} and shown in serial sections. Immuno-histofluorescence of dystrophin **(c)** is correlated with the α -sarcoglycan expression **(d)**. The asterisks indicate the same

dystrophin-positive myofibers throughout the sections. Scale bar = 50 μm . The cross-sections represent the global result from the electrotransfer of pCMV.FLDYS_{dog} in mouse muscles with n = 6.

FIG. 4. Electrotransfer of the pCMV.FLDYS_{dog} into a dystrophic dog muscle. Two regions of the electrotransferred muscle are shown in serial sections respectively in **a-c** and **d-f**. (**a,d**) Dystrophin was detected in the muscle electrotransferred with the pCMV.FLDYS_{dog}. Infiltrations (arrowheads) of mononuclear cells, with lymphocyte morphology, were observed by haematoxylin-eosin staining in the proximity of some dystrophin-positive myofibers (**b**) but not in the proximity of other dystrophin-positive fibers (**e**). The immunohistofluorescence of CD8⁺ cells confirmed that many cells in these cell accumulations were cytotoxic T-lymphocytes (**c**). The expression level of CD8⁺ cell detected in (**f**) corresponded to the background of the dystrophic dog (data not shown). The asterisks indicate the same dystrophin-positive myofibers through the sections. Scale bar = 50 μm . The cross-sections represent the global results from the electrotransfer.

FIG. 5. Dystrophic dog muscle electrotransferred with the saline solution. Two electrotransferred muscle regions are shown in serial sections **a** and **b**. (**a**) Presence of one revertant (dystrophin positive) fibre detected in the muscle electrotransferred with the saline solution. (**b**) Haematoxylin-eosin staining showed the general aspect of the dog dystrophic muscle control. Scale bar = 100 μm . The cross-sections represent the global aspect of the negative control of the electrotransfer in dystrophic dog muscle.

Figures

Figure 1

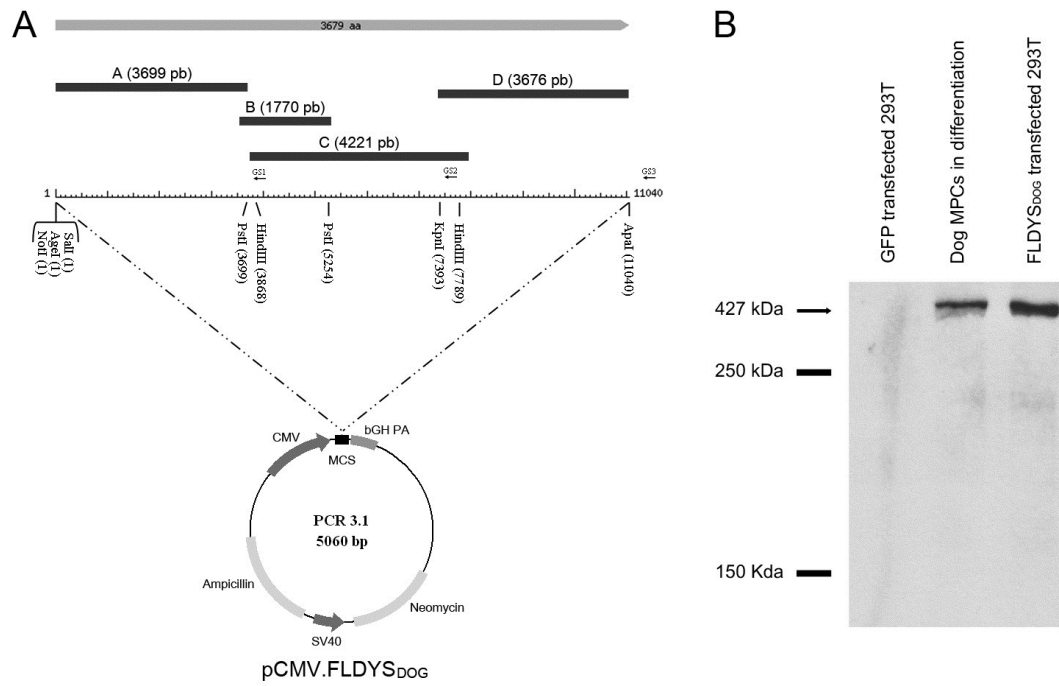


Figure 2

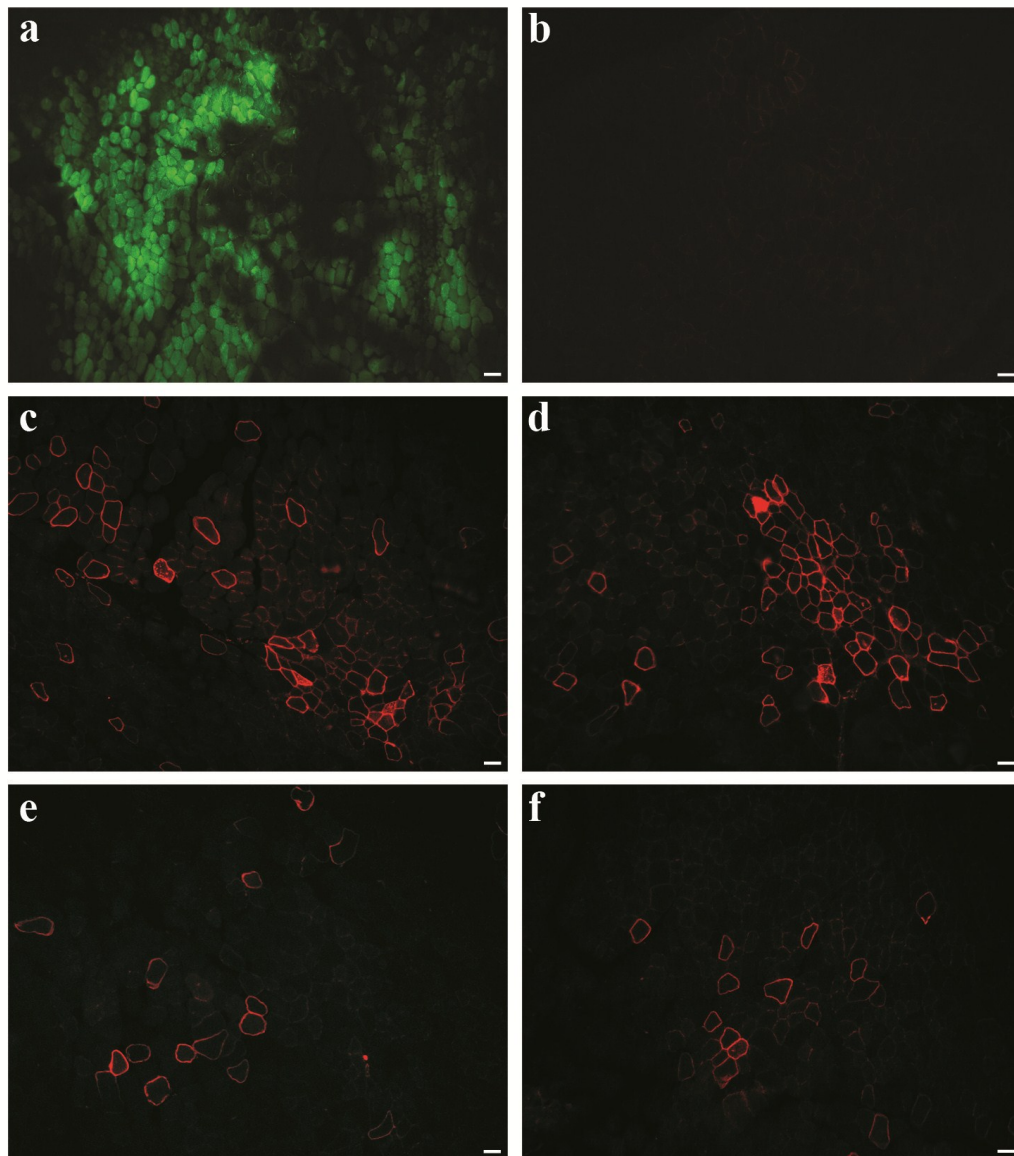


Figure 3

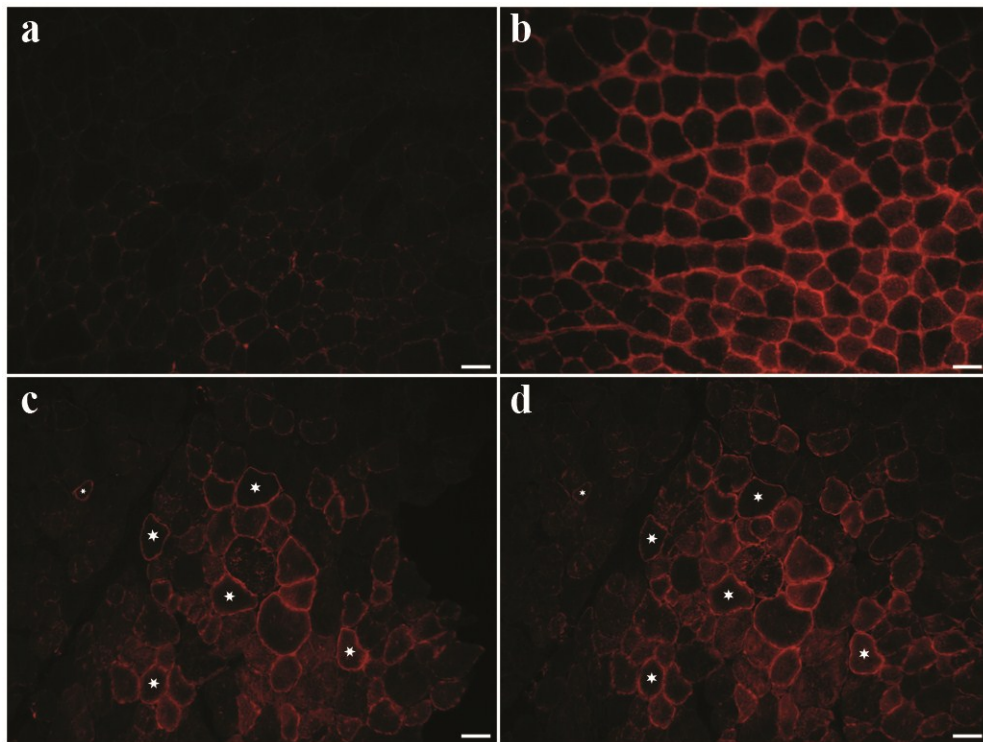


Figure 4

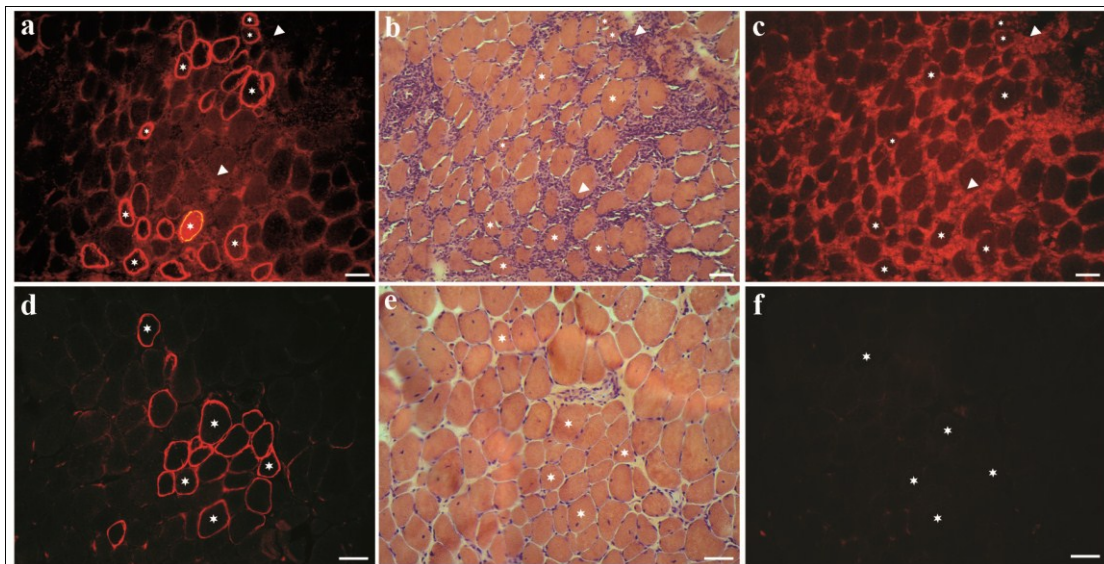
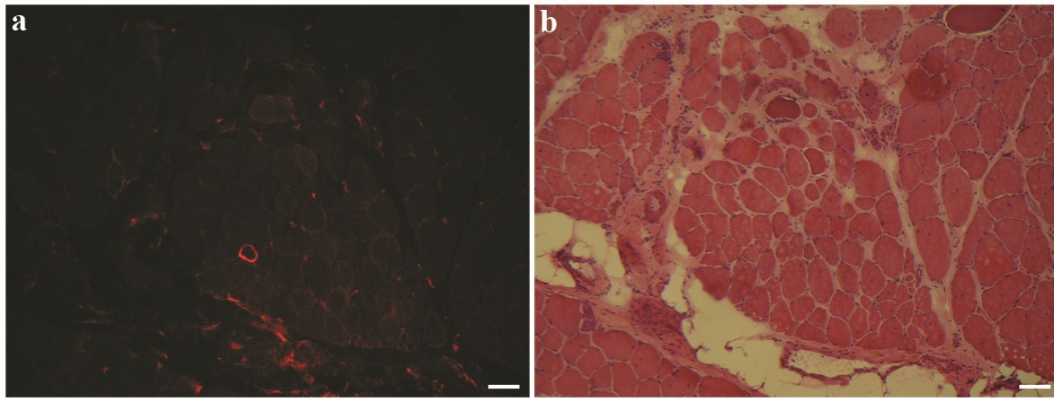


Figure 5



Tables

Table 1 List and sequence of primers of the transcribed FLDYS_{dog}.

Amplicon A, PCR size product: 3699 pb

GS1 (3839): 5'-CTTCTCCAAGTAGGACAATAACTC-3'
 A1s (-209): 5'-AAACCTATTGGAGCACTTAAGTTG-3'
 A1r (3769): 5'-GAGCCTGGTGCAGAGCCACTGCTAG-3'
 A2s (1): 5'-GTTTAAACTTAAGCTTGTTCGACGCGCCGCCACCATGCTTTGGTGGGAAGAAGTAGAGG-3'
 A2r (3699): 5'-ACTGTGCTGGATATCTGCAGGTGGAGCCTGAGCTATGAC-3'

Amplicon B (Pst1) PCR size product: 1770 pb

GS2 (7530): 5'-GCCTTCTGCTTGATGATCATCTCG-3'
 B1s (3495): 5'-GAAAGATCTGTCAGAGATGCATGAGTG-3'
 B1r (5367): 5'-GTTAAACTGCTCCAATTCCTTCAAAG-3'
 B2s (3541): 5'-GAATACCTAGAGAGAGATTTCAATAC-3'
 B2r (5310): 5'-GAGAAATGGCTGCAAATCGATGGTTG-3'

Amplicon C (HindIII) PCR size product: 4221 pb

GS3 (11620): 5'-ACAATTGCATAGACGTGTGAAACC-3'
 C1s (3684): 5'-CAGGCTCCACCTGCAGCACAAGAG-3'
 C1r (8040): 5'-CAGAGCAGCCTCTCGCTCACTCAATC-3'
 C2s (3721): 5'-GAACTTGACACTCTCACCACCAACTAC-3'
 C2r (7950): 5'-GTATCATCTGCAGAAATAATCTCGGAG-3'

Amplicon D (Kpn1) PCR size product: 3676 pb

GS3 (11620): 5'-ACAATTGCATAGACGTGTGAAACC-3'
 D1s (7342): 5'-GAAACTGCCATCTCCAAACTAGAAATGCC-3'
 D1r (11490): 5'-CTCTTACTGTCTAATCCTCTTTGTTGTATG-3'
 D2s (7375): 5'-TCATTGCTGTTGGAGGTACCTGCACTGGCAGATTTCAACCGAGCTTG-3'
 D2r (11040): 5'-AGGGCCCTCACATTGTGTCCTCTCTCATTGG-3'

These primers were design from the predicted sequence of the dog dystrophin.

Table 2: List and sequence of primers covering FLDYS_{dog} plasmid construct and used for the sequencing.

787	: 5'-GGCAAATGGGCGGTAGGCGTG -3'	(in CMV promoter)
958	: 5'-TCAACATTGCCAAATATCAATTAG-3'	599-623
959	: 5'-GAAGTGCAGGAACAAATGAATCTC-3'	1258-1281
960	: 5'-CAAAGTGAAGTGTTATCAAATCTTC-3'	1780-1804
961	: 5'-AGCATCAAACAAGCCTCCGAACAAC-3'	2401-2425
962	: 5'-CAATCAGAATTTGAGAGATTGAG-3'	3061-3084
963	: 5'-CAGGCTCCACCTGCAGCACAAAGAG-3'	3685-3708
964	: 5'-GACAAAGTGGATGCAGCTCAGATG-3'	4201-4224
965	: 5'-AAAGAGATTGAGAAACAGAAGGTTTC-3'	4861-4885
966	: 5'-TCACAGATGAGAGAAAGCGAGAGG-3'	5518-5542
967	: 5'-AAGAACATAAAAGACAGCCTGCAAC-3'	6121-6145
968	: 5'-GAACAAGTCAAGTTACTGGCAGAAG-3'	6757-6781
969	: 5'-CTGTTGGAGGTACCTGCACTGGCAG-3'	7381-7405
970	: 5'-GTGAGCGAGAGGCTGCTCTGGAAG-3'	8015-8038
971	: 5'-GACTGTACGAATATTTCTGACAGAG-3'	8583-8607
972	: 5'-CCTCCAGCACTTCCTTTCCACTTC-3'	9125-9149
973	: 5'-CTCCTCTGCATGACTCTATCCAG-3'	9688-9711
974	: 5'-CCTCAGCTTTCACACGATGATACTC-3'	10258-10282
975	: 5'-GCCAAGGTGAATGGTACAACGGTG-3'	10792-10815
1778	: 5'-AGGGCCCTCACATTTGTCTCCTCTCATTGG-3'	(in PolyA)

These primers have been used directly in the sequencing of FLDYS_{dog} plasmid.

Conclusion

Chapitre 9 : Discussion / Conclusion

9.1 Thérapie génique *ex vivo* dans le cadre de la DMD

9.1.1 Inconvénients

Comme pour la thérapie cellulaire, la thérapie génique *ex vivo* est aussi confrontée aux problèmes de migration et de dispersion des cellules greffées ainsi qu'à leurs morts précoces. La transplantation cellulaire de petits muscles et de muscles difficiles d'accès est également compliquée.

En plus de ces problèmes, il y a ceux liés à l'utilisation d'un vecteur viral [389]. Le fait d'infecter les cellules peut amener des problèmes de tumorigénicité. En effet, le transgène délivré par le vecteur viral peut s'insérer dans le génome et selon sa zone d'insertion, il peut activer un oncogène ou mener à une mutagenèse d'insertion. Ce phénomène est encore plus important lorsqu'on utilise un lentivirus puisqu'il est intégratif. Cependant, avec la thérapie génique *ex vivo*, on peut effectuer des tests *in vitro* et *in vivo* pour évaluer le potentiel tumorigénique des cellules infectées avant de les transplanter chez le patient [270]. Les tests *in vitro* consistent à faire proliférer les cellules sur agar mou [390] et les tests *in vivo* à transplanter les cellules dans des souris immunodéficientes.

9.1.2 Avantages

La thérapie génique *ex vivo* consiste à modifier génétiquement des myoblastes de patients DMD pour qu'ils expriment la dystrophine et à les transplanter par la suite dans les muscles de ces patients. Dans ce cas, comme il s'agit d'une autotransplantation, le patient n'a pas besoin d'être sous immunosuppression.

Lorsqu'un vecteur viral est directement injecté dans un organisme, il y a dispersion des particules virales au sein de cet organisme. Ces dernières peuvent être reconnues par le

système immunitaire et ainsi déclencher une réponse immunitaire contre les protéines virales telles que celles de la capsidie ou de l'enveloppe. Dans le cas d'une thérapie *ex vivo*, les cellules sont génétiquement modifiées *in vitro* évitant ainsi tout contact entre l'organisme et le virus. De plus, elles peuvent être testées *in vitro* et *in vivo* (voir section ci-haut) avant toute transplantation chez le patient DMD.

Le vecteur lentiviral possède aussi une grande capacité d'infection des cellules humaines, ceci en fait donc un vecteur de choix pour la transduction de myoblastes.

9.1.3 Nos résultats

Le lentivirus que nous avons mis au point contenait la cassette de la micro-dystrophine de chien en fusion avec un tag V5 sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique (MCK). Ce vecteur comportait aussi le gène de résistance à la puromycine sous le contrôle d'un promoteur ubiquitaire (SV40). Ce virus fut nommé Le.MCK μ DysV5.Puro. Le virus produit pouvait infecter un grand nombre de cellules que ce soient les cellules 293T, les myoblastes de chien ou les myoblastes humains et cela de manière efficace. Notre taux d'infection étant très bon (supérieur à 90 %), nous n'avons même pas eu besoin d'utiliser le gène de sélection à la puromycine présent dans le vecteur. Nous avons par ailleurs remarqué qu'effectuer une sélection de myoblastes avec un antibiotique n'est jamais très profitable puisque cet antibiotique possède quant même une certaine toxicité pour les cellules eucaryotes même si ces dernières comportent le dit gène de sélection.

Les myoblastes infectés avec le lentivirus n'ont jamais présenté de comportements anormaux *in vitro* et *in vivo*. Les résultats obtenus avec la transplantation de myoblastes humains infectés avec le lentivirus chez la souris immunodéficiente sont bien supérieurs comparés à ceux obtenus suite à la transplantation des myoblastes de chien dystrophique infectés. Cela étant probablement dû aux plus faibles capacités initiales de fusion des myoblastes de chien adulte. En effet par la suite, nous avons obtenu de bien meilleurs résultats de transplantation en greffant des myoblastes de chien issus de donneurs jeunes (3 mois) qu'avec ceux obtenus de donneurs plus âgés (1 an et plus).

Des transplantations autologues de myoblastes chez le chien dystrophique et non dystrophique ont aussi été réalisées. Les cellules greffées étaient des myoblastes de chien infectés avec le Le.MCK μ DysV5.Puro ou infectés avec un lentivirus codant uniquement pour le gène de résistance à la puromycine (Le.Puro). Un mois après la transplantation de ces cellules, nous avons été confrontés à un rejet spécifique dans les 2 groupes de cellules injectées. Dans le cas des cellules infectées avec le Le.Puro, le rejet semble dû au gène de résistance à la puromycine. On ne peut néanmoins exclure la possibilité d'un rejet dû aux protéines bovines présentes dans le milieu de culture ou dû à la présence de particules virales sur les cellules. Quant à la cause du rejet des cellules infectées avec le Le.MCK μ DysV5.Puro, les hypothèses sont multiples. Sachant que les chiens transplantés n'étaient pas dystrophiques, un rejet dû à la micro-dystrophine est à exclure puisque ces chiens exprimaient la dystrophine (qui inclut tous les antigènes présents dans la micro-dystrophine). Cependant, on ne peut pas écarter une réponse immunitaire due au tag V5, comme observée auparavant chez le singe [338], ou due au gène de sélection à la puromycine, comme ce fut probablement le cas pour les cellules infectées avec le Le.Puro.

9.2 Électroporation dans le cadre de la DMD

9.2.1 Inconvénients

Tout comme la thérapie cellulaire, il est difficile d'atteindre de petits muscles ou des muscles difficiles d'accès avec l'électroporation. Cette thérapie génique non virale est aussi, souvent, bien moins performante que la thérapie génique virale. Même si le phénomène d'intégration est très faible avec l'électroporation, il faut garder à l'esprit que cela pourrait tout de même arriver.

Une inflammation ainsi qu'un dommage aux fibres musculaires, suite au courant électrique délivré dans le muscle, surviennent au site de positionnement des électrodes. Cependant, ceux-ci se résorbent au fil des jours et en moins de 3 semaines, le muscle est entièrement régénéré et plus aucune trace des effets secondaires de l'électroporation n'est visible [378].

9.2.2 Avantages

Beaucoup de muscles sont tout de même accessibles à l'électroporation comme ceux de la posture ou de la préhension de même que le muscle cardiaque, bien que cela puisse sembler surprenant [379]. Un gros avantage de cette thérapie génique est l'absence de particule virale. En effet, aucune protéine virale n'entre en contact avec un individu traité par électroporation. Cette technique est relativement simple puisqu'elle ne nécessite qu'une bonne quantité de plasmides ; il n'y a aucune production de virus ou de culture cellulaire. Cette méthode n'est également pas limitée quant à la taille du transgène à délivrer ; elle est cependant plus efficace avec de petits transgènes.

9.2.3 Nos résultats

Deux de nos constructions ont été électroporées chez l'animal. La première est le plasmide codant pour MCK μ DysV5.Puro contenu dans le backbone lentiviral. Ce plasmide a été électroporé avec succès dans des muscles de souris immunodéficientes. Cependant, le nombre de fibres exprimant ce transgène fut inférieur à celui obtenu via la thérapie génique *ex vivo*. Il est cependant difficile de comparer ces 2 méthodes car il existe beaucoup de facteurs qui peuvent les influencer comme le nombre de cellules transplantées ou la quantité de plasmides injectée. L'expression de micro-dystrophine de chien fut aussi observée chez le chien suite à l'électroporation du plasmide codant pour MCK μ DysV5.Puro. Néanmoins, dans les biopsies obtenues à deux semaines, certaines cellules lymphocytaires furent localisées près de fibres exprimant la micro-dystrophine. Bien que le courant électrique provoque une certaine inflammation au site d'électroporation, on n'est pas censé y retrouver ce type de cellules deux semaines après. On peut donc penser que le plasmide a induit une réponse immunitaire spécifique chez le chien. Un peu comme pour le rejet observé avec la thérapie *ex vivo*, la micro-dystrophine de chien ne semble pas en tant que telle immunogène pour le chien non dystrophique. Dans le cas de l'électroporation, la réponse immune ne peut être due aux les protéines bovines et aux particules virales puisque cette technique ne requiert aucune culture cellulaire ni production de virus. La présence d'endotoxines suite à la production du plasmide pourrait aussi être mise en cause mais une purification sur chlorure de césium permet d'obtenir un

plasmide d'une grande pureté. Il semble donc que les éléments immunogènes soient plus le gène de résistance à la puromycine et le tag V5. Les motifs CpG pourraient aussi jouer un rôle dans la réponse immunitaire observée [391]. En effet, puisque les plasmides sont produits dans des bactéries, leurs motifs CpG ne sont pas méthylés. Ces derniers pouvant activer le système immunitaire de l'hôte via les cellules NK entre autres, les motifs CpG présents sur un plasmide pourraient mener à un rejet de celui-ci.

Pour ce qui est de la dystrophine de chien pleine longueur, nous avons observé son expression après avoir électroporé le plasmide codant pour ce transgène dans des muscles de souris immunodéficientes et de chien dystrophique. La présence de cellules immunitaires a aussi été mise en évidence chez le chien dystrophique électroporé, tout comme lors de l'électroporation du plasmide MCK μ DysV5.Puro chez le chien non dystrophique. Bien que le plasmide contienne un gène de résistance à un antibiotique pouvant induire une réponse immunitaire, il contenait aussi un autre transgène susceptible de l'induire : la dystrophine. En effet, il existe différentes études sur le fait que la dystrophine soit immunogène pour la souris *mdx* ou le patient DMD. Bien qu'une première étude ait montré la présence de dystrophine (durant au moins un an) suite à la greffe syngénique de myoblastes non dystrophiques dans des muscles de souris *mdx* [392], cette étude n'a jamais été reconfirmée par la suite. De même que présentement dans le laboratoire, ce type de greffe se fait sous immunosuppresseur. Concernant les patients DMD, dès les premiers essais cliniques réalisés dans le début des années 1990, on montra la présence d'anticorps contre la dystrophine suite à la transplantation de myoblastes (dans des conditions d'immuno-histocompatibilité) [393]. Récemment, un essai clinique mené par le Dr. Mendell mit aussi en évidence, chez des patients DMD, la présence de lymphocytes T pouvant réagir contre certains épitopes de la dystrophine (absents de leurs fibres révertantes) suite à l'injection d'un AAV codant pour la mini-dystrophine [394]. En plus du gène de résistance à l'antibiotique et de l'ADNc codant pour la dystrophine de chien, les motifs CpG présents dans le plasmide pourraient aussi jouer un rôle dans la réponse immunitaire observée.

9.3 Optimisation des méthodes utilisées

9.3.1 Thérapie génique *ex vivo*

La thérapie génique *ex vivo* est constituée de deux composantes : la thérapie cellulaire et la thérapie génique. Son amélioration passe donc par l'optimisation de ces deux thérapies. Pour ce qui est de la thérapie cellulaire, nous avons déjà vu qu'elle était limitée dans la dispersion / fusion et dans la mort précoce des myoblastes greffés. Ces points peuvent être améliorés par l'ajout de facteurs de croissance ou d'agents anti-apoptotiques comme vu dans la partie traitant de ces problèmes dans le chapitre sur la thérapie cellulaire. Concernant le rejet immunitaire spécifique, il semble que la dystrophine soit considérée comme un antigène du non-soi chez le patient DMD. En conséquence, même si la dystrophine serait introduite via une thérapie génique *ex vivo* dans leurs muscles, il faudrait vraisemblablement que le patient soit sous traitement immunosuppresseur. Afin d'éviter des intégrations aléatoires du lentivirus, certaines protéines permettent d'effectuer des intégrations dans des sites spécifiques comme Rep78 par exemple [395]. Pour ce qui est des gènes de sélection aux antibiotiques, nous avons vu qu'en produisant un bon vecteur viral, on était capable de s'en passer. De ce fait, en ne les incluant pas dans le vecteur viral, on favoriserait ainsi l'efficacité de transduction du vecteur viral puisque la taille du transgène en serait réduite, tout en évitant une réponse immunitaire liée à sa présence.

9.3.2 Électroporation

Il y a deux points qui peuvent être améliorés avec la technique de l'électroporation. Le premier est les paramètres de l'électroporation. En effet, selon le type d'électrodes et leurs espacements, la durée des pulsations, leurs fréquences et leurs voltages, les effets sont différents [396]. De plus, peu d'expérience d'électroporation dans de gros muscles ont été faites. Il reste donc un travail important à faire au niveau des paramètres de l'électroporation pour améliorer l'efficacité de cette technique non virale.

L'autre élément pouvant être optimisé est le plasmide en tant que tel. Plus la grosseur du plasmide est petite, plus celui-ci rentrera facilement dans les fibres musculaires. L'utilisation de « mini circles » pourrait être alors intéressante. En effet, ces derniers sont

seulement composés du promoteur, du transgène et de son signal de polyadénylation ; le reste (origine de réplication, gène de résistance à un antibiotique...) étant enlevé. La taille du plasmide étant rendue plus petite, son introduction dans le muscle par électroporation en est facilitée. Afin d'obtenir une expression plus importante d'un transgène, celui-ci peut aussi être placé derrière un signal d'exportation/importation nucléaire tel que les PTD ou les NLS tels que TATκ [397]. Ces derniers permettent d'obtenir une diffusion plus grande du plasmide à travers un tissu donné.

9.4 Conclusion générale

Nous avons vu que la thérapie génique *ex vivo* et l'électroporation sont des approches intéressantes comme traitements potentiels dans le cadre de la maladie de Duchenne. Cependant, il reste beaucoup de travail à effectuer avant d'en arriver là. Le modèle canin de la DMD est un modèle animal intéressant puisqu'il se rapproche le plus du phénotype du patient DMD. Nos expériences nous ont permis de mettre en évidence les difficultés liées à nos approches dont la principale étant le possible rejet de la dystrophine par les patients DMD. La prochaine étape est d'optimiser nos techniques, comme vu ci-haut, afin de pouvoir améliorer l'histologie des muscles des chiens dystrophiques traités ainsi que l'améliorer la résistance aux bris des muscles traités. Cependant, le fait que les patients DMD ont de moins en moins de fibres musculaires et donc moins de myoblastes est un obstacle pour les traitements basés sur la restauration de dystrophine dont font partie les principales approches utilisées dans la DMD (dont les nôtres).

En effet, dans la thérapie cellulaire, on a besoin de myoblastes. Ces derniers peuvent provenir directement du patient dans le but d'en restaurer la dystrophine par génie génétique et de les lui retransplanter par la suite, ou alors provenir de donneur sain. Cependant, il semble que dans ces deux cas, il soit nécessaire que le patient soit sous immunosuppresseur avec tous les effets secondaires qui y sont reliés. De plus, avec l'âge, même si on restaure la dystrophine, cela ne redonne pas au patient sa force d'antan. Néanmoins, la thérapie génique *ex vivo* et l'électroporation peuvent être des approches intéressantes pour améliorer la qualité de vie des patients en ciblant certains muscles de la préhension pour qu'ils puissent s'alimenter seul ou se déplacer via leur fauteuil électrique

plus aisément. Il faut tout de même garder en tête que plus ils seront traités tôt, plus les effets des traitements seront bénéfiques.

Bien que cette maladie soit difficile, j'espère que la progression incessante des technologies et que la ténacité des chercheurs permettront de trouver un traitement pour la dystrophie musculaire de Duchenne. La route reste cependant encore longue et semée d'embûches.

Bibliographie

1. Buckingham, M., et al., *The formation of skeletal muscle: from somite to limb*. J Anat, 2003. **202**(1): p. 59-68.
2. Pownall, M.E., M.K. Gustafsson, and C.P. Emerson, Jr., *Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 747-83.
3. Brunelli, S., et al., *Beta catenin-independent activation of MyoD in presomitic mesoderm requires PKC and depends on Pax3 transcriptional activity*. Dev Biol, 2007. **304**(2): p. 604-14.
4. Bober, E., et al., *Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells*. Development, 1994. **120**(3): p. 603-12.
5. Mansouri, A., et al., *Dysgenesis of cephalic neural crest derivatives in Pax7-/- mutant mice*. Development, 1996. **122**(3): p. 831-8.
6. Rudnicki, M.A., et al., *MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1351-9.
7. Braun, T., et al., *Targeted inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death*. Cell, 1992. **71**(3): p. 369-82.
8. Rudnicki, M.A., et al., *Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal muscle development*. Cell, 1992. **71**(3): p. 383-90.
9. Kablar, B., et al., *MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle*. Development, 1997. **124**(23): p. 4729-38.
10. Ott, M.O., et al., *Early expression of the myogenic regulatory gene, myf-5, in precursor cells of skeletal muscle in the mouse embryo*. Development, 1991. **111**(4): p. 1097-107.
11. Mankoo, B.S., et al., *Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development*. Nature, 1999. **400**(6739): p. 69-73.
12. Rudnicki, M.A. and R. Jaenisch, *The MyoD family of transcription factors and skeletal myogenesis*. Bioessays, 1995. **17**(3): p. 203-9.
13. Mauro, A., *Satellite cell of skeletal muscle fibers*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **9**: p. 493-5.
14. Thayer R.E., R.C.L., Pettigrew F.P., Noble E.G. and Taylor A.W., *The fibre composition of skeletal muscle*, in *Principles of exercise biochemistry*, J.R. Poortmans, Editor. 1993, Karger: Basel. p. 25-50.
15. Kirkendall, D.T. and W.E. Garrett, Jr., *The effects of aging and training on skeletal muscle*. Am J Sports Med, 1998. **26**(4): p. 598-602.
16. Stockdale, F.E. and H. Holtzer, *DNA synthesis and myogenesis*. Exp Cell Res, 1961. **24**: p. 508-20.
17. Decary, S., et al., *Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implications for satellite cell-mediated gene therapy*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(12): p. 1429-38.

18. Robertson, T.A., M.D. Grounds, and J.M. Papadimitriou, *Elucidation of aspects of murine skeletal muscle regeneration using local and whole body irradiation*. J Anat, 1992. **181 (Pt 2)**: p. 265-76.
19. Orimo, S., et al., *Analysis of inflammatory cells and complement C3 in bupivacaine-induced myonecrosis*. Muscle Nerve, 1991. **14(6)**: p. 515-20.
20. Tiidus, P.M., *Radical species in inflammation and overtraining*. Can J Physiol Pharmacol, 1998. **76(5)**: p. 533-8.
21. Cannon, J.G. and B.A. St Pierre, *Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury*. Mol Cell Biochem, 1998. **179(1-2)**: p. 159-67.
22. Kyriakides, C., et al., *Skeletal muscle reperfusion injury is mediated by neutrophils and the complement membrane attack complex*. Am J Physiol, 1999. **277(6 Pt 1)**: p. C1263-8.
23. McLennan, I.S., *Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres*. Cell Tissue Res, 1993. **272(1)**: p. 193-6.
24. Smith, C., et al., *The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities*. Sports Med, 2008. **38(11)**: p. 947-69.
25. Hurme, T., et al., *Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study*. Med Sci Sports Exerc, 1991. **23(7)**: p. 801-10.
26. Jarvinen, T.A., et al., *Muscle injuries: biology and treatment*. Am J Sports Med, 2005. **33(5)**: p. 745-64.
27. Charge, S.B. and M.A. Rudnicki, *Cellular and molecular regulation of muscle regeneration*. Physiol Rev, 2004. **84(1)**: p. 209-38.
28. Seale, P., et al., *Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells*. Cell, 2000. **102(6)**: p. 777-86.
29. Oustanina, S., G. Hause, and T. Braun, *Pax7 directs postnatal renewal and propagation of myogenic satellite cells but not their specification*. EMBO J, 2004. **23(16)**: p. 3430-9.
30. Lepper, C., S.J. Conway, and C.M. Fan, *Adult satellite cells and embryonic muscle progenitors have distinct genetic requirements*. Nature, 2009. **460(7255)**: p. 627-31.
31. Relaix, F., et al., *Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells*. J Cell Biol, 2006. **172(1)**: p. 91-102.
32. Montarras, D., et al., *Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration*. Science, 2005. **309(5743)**: p. 2064-7.
33. Irintchev, A., et al., *Expression pattern of M-cadherin in normal, denervated, and regenerating mouse muscles*. Dev Dyn, 1994. **199(4)**: p. 326-37.
34. Cornelison, D.D. and B.J. Wold, *Single-cell analysis of regulatory gene expression in quiescent and activated mouse skeletal muscle satellite cells*. Dev Biol, 1997. **191(2)**: p. 270-83.
35. Beauchamp, J.R., et al., *Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells*. J Cell Biol, 2000. **151(6)**: p. 1221-34.
36. Tedesco, F.S., et al., *Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells*. J Clin Invest. **120(1)**: p. 11-9.
37. Peault, B., et al., *Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy*. Mol Ther, 2007. **15(5)**: p. 867-77.

38. Kuang, S., et al., *Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle*. Cell, 2007. **129**(5): p. 999-1010.
39. Rudnicki, M.A., et al., *The molecular regulation of muscle stem cell function*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008. **73**: p. 323-31.
40. Relaix, F. and C. Marcelle, *Muscle stem cells*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(6): p. 748-53.
41. Mackey, A.L., et al., *Assessment of satellite cell number and activity status in human skeletal muscle biopsies*. Muscle Nerve, 2009. **40**(3): p. 455-65.
42. Hawke, T.J. and D.J. Garry, *Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology*. J Appl Physiol, 2001. **91**(2): p. 534-51.
43. Robertson, T.A., et al., *The role of macrophages in skeletal muscle regeneration with particular reference to chemotaxis*. Exp Cell Res, 1993. **207**(2): p. 321-31.
44. Smith, T.H., et al., *A unique pattern of expression of the four muscle regulatory factor proteins distinguishes somitic from embryonic, fetal and newborn mouse myogenic cells*. Development, 1993. **117**(3): p. 1125-33.
45. Haldar, M., et al., *Two cell lineages, myf5 and myf5-independent, participate in mouse skeletal myogenesis*. Dev Cell, 2008. **14**(3): p. 437-45.
46. Gensch, N., et al., *Different autonomous myogenic cell populations revealed by ablation of Myf5-expressing cells during mouse embryogenesis*. Development, 2008. **135**(9): p. 1597-604.
47. Megeney, L.A. and M.A. Rudnicki, *Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors*. Biochem Cell Biol, 1995. **73**(9-10): p. 723-32.
48. Zetser, A., E. Gredinger, and E. Bengal, *p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor*. J Biol Chem, 1999. **274**(8): p. 5193-200.
49. Meyron, E., *On fatty degeneration of the voluntary muscles*. Lancet, 1851. **2**: p. 588-589.
50. Duchenne, G.B.A., *De l'électrisation localisée et son application à la physiologie, à la pathologie et à la thérapeutique*. 1861, Paris: J.-B. Baillière et fils.
51. Duchenne, G.B.A., *Recherches sur la paralysie musculaire pseudo-hypertrophique ou paralysie myo-sclerosique*. Archives Generales de Medicine, 1868. **11**: p. 5-25, 179-209, 305-321, 421-448, 552-588.
52. Gowers, W., *Clinical lecture on pseudo-hypertrophic muscular paralysis*. Lancet, 1879. **2**: p. 113-116.
53. Ingalls, W. and S.G. Webber, *A case of progressive muscular sclerosis, with a paper on the same*. Boston Med Surg J, 1870. **6**: p. 321-325.
54. Emery, A.E., *Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey*. Neuromuscul Disord, 1991. **1**(1): p. 19-29.
55. Hoffman, E.P., R.H. Brown, Jr., and L.M. Kunkel, *Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus*. Cell, 1987. **51**(6): p. 919-28.
56. Gomez, M.R., et al., *Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X-chromosome in one of female identical twins*. Neurology, 1977. **27**(6): p. 537-41.
57. Azofeifa, J., et al., *X-chromosome methylation in manifesting and healthy carriers of dystrophinopathies: concordance of activation ratios among first degree female*

- relatives and skewed inactivation as cause of the affected phenotypes.* Hum Genet, 1995. **96**(2): p. 167-76.
58. Chelly, J., et al., *De novo DNA microdeletion in a girl with Turner syndrome and Duchenne muscular dystrophy.* Hum Genet, 1986. **74**(2): p. 193-6.
 59. Baiget, M., et al., *DMD carrier detection in a female with mosaic Turner's syndrome.* J Med Genet, 1991. **28**(3): p. 209-10.
 60. Lukasik, E., *Electrocardiographic studies in female carriers of Duchenne muscular dystrophy.* J Neurol, 1975. **209**(4): p. 279-85.
 61. Hoogerwaard, E.M., et al., *Cardiac involvement in carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy.* Neuromuscul Disord, 1999. **9**(5): p. 347-51.
 62. Moser, H. and A.E. Emery, *The manifesting carrier in Duchenne muscular dystrophy.* Clin Genet, 1974. **5**(4): p. 271-84.
 63. Haldane, J.B., *The rate of spontaneous mutation of a human gene. 1935.* J Genet, 2004. **83**(3): p. 235-44.
 64. Bakker, E., et al., *Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations.* Nature, 1987. **329**(6139): p. 554-6.
 65. Helderma-van den Enden, A.T., et al., *Recurrence risk due to germ line mosaicism: Duchenne and Becker muscular dystrophy.* Clin Genet, 2009. **75**(5): p. 465-72.
 66. Pearce, J.M., R.J. Pennington, and J.N. Walton, *Serum Enzyme Studies in Muscle Disease. Iii. Serum Creatine Kinase Activity in Relatives of Patients with the Duchenne Type of Muscular Dystrophy.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1964. **27**: p. 181-5.
 67. Tyler, K.L., *Origins and early descriptions of "Duchenne muscular dystrophy".* Muscle Nerve, 2003. **28**(4): p. 402-22.
 68. Zatz, M., et al., *Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus.* J Med Genet, 1981. **18**(6): p. 442-7.
 69. Davies, K.E., et al., *Linkage analysis of two cloned DNA sequences flanking the Duchenne muscular dystrophy locus on the short arm of the human X chromosome.* Nucleic Acids Res, 1983. **11**(8): p. 2303-12.
 70. Monaco, A.P., et al., *Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene.* Nature, 1986. **323**(6089): p. 646-50.
 71. 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, 1987. **50**(3): p. 509-17.
 72. Koenig, M., A.P. Monaco, and L.M. Kunkel, *The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein.* Cell, 1988. **53**(2): p. 219-28.
 73. Zubrzycka-Gaarn, E.E., et al., *The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle.* Nature, 1988. **333**(6172): p. 466-9.
 74. Skuk, D., *Myoblast transplantation for inherited myopathies: a clinical approach.* Expert Opin Biol Ther, 2004. **4**(12): p. 1871-85.
 75. Wessels, A., et al., *Different localization of dystrophin in developing and adult human skeletal muscle.* Muscle Nerve, 1991. **14**(1): p. 1-7.

76. Torelli, S., et al., *Expression, regulation and localisation of dystrophin isoforms in human foetal skeletal and cardiac muscle*. Neuromuscul Disord, 1999. **9**(8): p. 541-51.
77. Houzelstein, D., et al., *Localization of dystrophin gene transcripts during mouse embryogenesis*. J Cell Biol, 1992. **119**(4): p. 811-21.
78. Ervasti, J.M. and K.P. Campbell, *Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex*. Cell, 1991. **66**(6): p. 1121-31.
79. Ervasti, J.M., *Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(2): p. 108-17.
80. Pilgram, G.S., et al., *The roles of the dystrophin-associated glycoprotein complex at the synapse*. Mol Neurobiol. **41**(1): p. 1-21.
81. Levine, B.A., et al., *The interaction of actin with dystrophin*. FEBS Lett, 1990. **263**(1): p. 159-62.
82. Amann, K.J., B.A. Renley, and J.M. Ervasti, *A cluster of basic repeats in the dystrophin rod domain binds F-actin through an electrostatic interaction*. J Biol Chem, 1998. **273**(43): p. 28419-23.
83. 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, 2009. **119**(3): p. 624-35.
84. Stamler, J.S. and G. Meissner, *Physiology of nitric oxide in skeletal muscle*. Physiol Rev, 2001. **81**(1): p. 209-237.
85. Koenig, M. and L.M. Kunkel, *Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility*. J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4560-6.
86. Ishikawa-Sakurai, M., et al., *ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(7): p. 693-702.
87. Matsumura, K., et al., *Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle*. Nature, 1992. **360**(6404): p. 588-91.
88. Lim, L.E. and K.P. Campbell, *The sarcoglycan complex in limb-girdle muscular dystrophy*. Curr Opin Neurol, 1998. **11**(5): p. 443-52.
89. Crosbie, R.H., et al., *Membrane targeting and stabilization of sarcospan is mediated by the sarcoglycan subcomplex*. J Cell Biol, 1999. **145**(1): p. 153-65.
90. Yoshida, M., et al., *Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy*. Hum Mol Genet, 2000. **9**(7): p. 1033-40.
91. Bowe, M.A., et al., *Identification and purification of an agrin receptor from Torpedo postsynaptic membranes: a heteromeric complex related to the dystroglycans*. Neuron, 1994. **12**(5): p. 1173-80.
92. Peng, H.B., et al., *The relationship between perlecan and dystroglycan and its implication in the formation of the neuromuscular junction*. Cell Adhes Commun, 1998. **5**(6): p. 475-89.
93. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., et al., *Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix*. Nature, 1992. **355**(6362): p. 696-702.

94. Adams, M.E., et al., *Two forms of mouse syntrophin, a 58 kd dystrophin-associated protein, differ in primary structure and tissue distribution.* Neuron, 1993. **11**(3): p. 531-40.
95. Ahn, A.H. and L.M. Kunkel, *Syntrophin binds to an alternatively spliced exon of dystrophin.* J Cell Biol, 1995. **128**(3): p. 363-71.
96. Adams, M.E., H.A. Mueller, and S.C. Froehner, *In vivo requirement of the alpha-syntrophin PDZ domain for the sarcolemmal localization of nNOS and aquaporin-4.* J Cell Biol, 2001. **155**(1): p. 113-22.
97. Peters, M.F., et al., *Differential membrane localization and intermolecular associations of alpha-dystrobrevin isoforms in skeletal muscle.* J Cell Biol, 1998. **142**(5): p. 1269-78.
98. Newey, S.E., et al., *Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex.* Curr Biol, 2000. **10**(20): p. 1295-8.
99. Newey, S.E., et al., *Syncoilin, a novel member of the intermediate filament superfamily that interacts with alpha-dystrobrevin in skeletal muscle.* J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6645-55.
100. Mizuno, Y., et al., *Desmuslin, an intermediate filament protein that interacts with alpha -dystrobrevin and desmin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(11): p. 6156-61.
101. Poon, E., et al., *Association of syncoilin and desmin: linking intermediate filament proteins to the dystrophin-associated protein complex.* J Biol Chem, 2002. **277**(5): p. 3433-9.
102. Sun, N., et al., *Identification of a repeated domain within mammalian alpha-synemin that interacts directly with talin.* Exp Cell Res, 2008. **314**(8): p. 1839-49.
103. Sun, N., et al., *Human alpha-synemin interacts directly with vinculin and metavinculin.* Biochem J, 2008. **409**(3): p. 657-67.
104. Aartsma-Rus, A., et al., *Entries in the Leiden Duchenne muscular dystrophy mutation database: an overview of mutation types and paradoxical cases that confirm the reading-frame rule.* Muscle Nerve, 2006. **34**(2): p. 135-44.
105. Scheuerbrandt, G., *Approaching therapies for boys with Duchenne muscular dystrophy. Parent Project Muscular Dystrophy. Annual conference in Cincinnati/Ohio, 13-16 July 2006.* Acta Myol, 2006. **25**(2): p. 77-97.
106. Cunniff, C., et al., *Mutation analysis in a population-based cohort of boys with Duchenne or Becker muscular dystrophy.* J Child Neurol, 2009. **24**(4): p. 425-30.
107. Flanigan, K.M., et al., *Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort.* Hum Mutat, 2009. **30**(12): p. 1657-66.
108. Aartsma-Rus, A., et al., *Theoretic applicability of antisense-mediated exon skipping for Duchenne muscular dystrophy mutations.* Hum Mutat, 2009. **30**(3): p. 293-9.
109. Monaco, A.P., et al., *An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus.* Genomics, 1988. **2**(1): p. 90-5.
110. Becker, P.E. and F. Kiener, *[A new x-chromosomal muscular dystrophy.]* Arch Psychiatr Nervenkr Z Gesamte Neurol Psychiatr, 1955. **193**(4): p. 427-48.
111. Malhotra, S.B., et al., *Frame-shift deletions in patients with Duchenne and Becker muscular dystrophy.* Science, 1988. **242**(4879): p. 755-9.

112. England, S.B., et al., *Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin*. Nature, 1990. **343**(6254): p. 180-2.
113. Beggs, A.H., et al., *Exploring the molecular basis for variability among patients with Becker muscular dystrophy: dystrophin gene and protein studies*. Am J Hum Genet, 1991. **49**(1): p. 54-67.
114. Nicholson, L.V., et al., *Dystrophin in skeletal muscle. II. Immunoreactivity in patients with Xp21 muscular dystrophy*. J Neurol Sci, 1989. **94**(1-3): p. 137-46.
115. Klein, C.J., et al., *Somatic reversion/suppression in Duchenne muscular dystrophy (DMD): evidence supporting a frame-restoring mechanism in rare dystrophin-positive fibers*. Am J Hum Genet, 1992. **50**(5): p. 950-9.
116. Ervasti, J.M., et al., *Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle*. Nature, 1990. **345**(6273): p. 315-9.
117. Ohlendieck, K. and K.P. Campbell, *Dystrophin-associated proteins are greatly reduced in skeletal muscle from mdx mice*. J Cell Biol, 1991. **115**(6): p. 1685-94.
118. Matsumura, K., et al., *Deficiency of the 50K dystrophin-associated glycoprotein in severe childhood autosomal recessive muscular dystrophy*. Nature, 1992. **359**(6393): p. 320-2.
119. Ohlendieck, K., et al., *Duchenne muscular dystrophy: deficiency of dystrophin-associated proteins in the sarcolemma*. Neurology, 1993. **43**(4): p. 795-800.
120. Matsumura, K. and K.P. Campbell, *Dystrophin-glycoprotein complex: its role in the molecular pathogenesis of muscular dystrophies*. Muscle Nerve, 1994. **17**(1): p. 2-15.
121. Campbell, K.P. and S.D. Kahl, *Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 259-62.
122. Maier, F. and A. Bornemann, *Comparison of the muscle fiber diameter and satellite cell frequency in human muscle biopsies*. Muscle Nerve, 1999. **22**(5): p. 578-83.
123. Decary, S., et al., *Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children*. Neuromuscul Disord, 2000. **10**(2): p. 113-20.
124. Cullen, M.J. and F.L. Mastaglia, *Morphological changes in dystrophic muscle*. Br Med Bull, 1980. **36**(2): p. 145-22.
125. Hoffman, E.P. and L.M. Kunkel, *Dystrophin abnormalities in Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Neuron, 1989. **2**(1): p. 1019-29.
126. Watchko, J.F., T.L. O'Day, and E.P. Hoffman, *Functional characteristics of dystrophic skeletal muscle: insights from animal models*. J Appl Physiol, 2002. **93**(2): p. 407-17.
127. Durbeej, M. and K.P. Campbell, *Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models*. Curr Opin Genet Dev, 2002. **12**(3): p. 349-61.
128. Sicinski, P., et al., *The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation*. Science, 1989. **244**(4912): p. 1578-80.
129. Bulfield, G., et al., *X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(4): p. 1189-92.
130. Chamberlain, J.S., et al., *Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma*. FASEB J, 2007. **21**(9): p. 2195-204.

131. Torres, L.F. and L.W. Duchon, *The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates.* Brain, 1987. **110 (Pt 2)**: p. 269-99.
132. Stedman, H.H., et al., *The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy.* Nature, 1991. **352(6335)**: p. 536-9.
133. Carter, G.T., et al., *Effect of voluntary wheel-running exercise on muscles of the mdx mouse.* Neuromuscul Disord, 1995. **5(4)**: p. 323-32.
134. Deconinck, N., et al., *Consequences of the combined deficiency in dystrophin and utrophin on the mechanical properties and myosin composition of some limb and respiratory muscles of the mouse.* Neuromuscul Disord, 1998. **8(6)**: p. 362-70.
135. Lynch, G.S., et al., *IGF-I treatment improves the functional properties of fast- and slow-twitch skeletal muscles from dystrophic mice.* Neuromuscul Disord, 2001. **11(3)**: p. 260-8.
136. DelloRusso, C., et al., *Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99(20)**: p. 12979-84.
137. Quinlan, J.G., et al., *Evolution of the mdx mouse cardiomyopathy: physiological and morphological findings.* Neuromuscul Disord, 2004. **14(8-9)**: p. 491-6.
138. Chapman, V.M., et al., *Recovery of induced mutations for X chromosome-linked muscular dystrophy in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86(4)**: p. 1292-6.
139. Danko, I., V. Chapman, and J.A. Wolff, *The frequency of revertants in mdx mouse genetic models for Duchenne muscular dystrophy.* Pediatr Res, 1992. **32(1)**: p. 128-31.
140. Tinsley, J.M., et al., *Primary structure of dystrophin-related protein.* Nature, 1992. **360(6404)**: p. 591-3.
141. Tanaka, H., et al., *Expression of a dystrophin-related protein associated with the skeletal muscle cell membrane.* Histochemistry, 1991. **96(1)**: p. 1-5.
142. Mizuno, Y., et al., *Reciprocal expression of dystrophin and utrophin in muscles of Duchenne muscular dystrophy patients, female DMD-carriers and control subjects.* J Neurol Sci, 1993. **119(1)**: p. 43-52.
143. Deconinck, A.E., et al., *Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy.* Cell, 1997. **90(4)**: p. 717-27.
144. Grady, R.M., et al., *Skeletal and cardiac myopathies in mice lacking utrophin and dystrophin: a model for Duchenne muscular dystrophy.* Cell, 1997. **90(4)**: p. 729-38.
145. Megeney, L.A., et al., *MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle.* Genes Dev, 1996. **10(10)**: p. 1173-83.
146. Megeney, L.A., et al., *Severe cardiomyopathy in mice lacking dystrophin and MyoD.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96(1)**: p. 220-5.
147. Burkin, D.J. and S.J. Kaufman, *The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease.* Cell Tissue Res, 1999. **296(1)**: p. 183-90.
148. Guo, C., et al., *Absence of alpha 7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy.* Hum Mol Genet, 2006. **15(6)**: p. 989-98.
149. Fukada, S.I., et al., *Genetic Background Affects Properties of Satellite Cells and mdx Phenotypes.* Am J Pathol.

150. Partridge, T., *Models of dystrophinopathy, pathological mechanisms and assessment of therapies*. In: *Dystrophin: Gene, Protein and Cell Biology*, in *Dystrophin: Gene, Protein and Cell Biology*, J.A. Lucy, Editor. 1997, Cambridge University Press: Cambridge. p. 310-331.
151. Schatzberg, S.J., et al., *Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog*. *Neuromuscul Disord*, 1999. **9**(5): p. 289-95.
152. Shimatsu, Y., et al., *Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ)*. *Exp Anim*, 2003. **52**(2): p. 93-7.
153. Sharp, N.J., et al., *An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy*. *Genomics*, 1992. **13**(1): p. 115-21.
154. Valentine, B.A., et al., *Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies*. *J Neurol Sci*, 1988. **88**(1-3): p. 69-81.
155. Valentine, B.A., et al., *Canine X-linked muscular dystrophy: morphologic lesions*. *J Neurol Sci*, 1990. **97**(1): p. 1-23.
156. Banks, G.B. and J.S. Chamberlain, *The value of mammalian models for duchenne muscular dystrophy in developing therapeutic strategies*. *Curr Top Dev Biol*, 2008. **84**: p. 431-53.
157. Zucconi, E., et al., *Ringo: discordance between the molecular and clinical manifestation in a golden retriever muscular dystrophy dog*. *Neuromuscul Disord*. **20**(1): p. 64-70.
158. Schatzberg, S.J., et al., *Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy*. *Muscle Nerve*, 1998. **21**(8): p. 991-8.
159. Winnard, A.V., et al., *Frameshift deletions of exons 3-7 and revertant fibers in Duchenne muscular dystrophy: mechanisms of dystrophin production*. *Am J Hum Genet*, 1995. **56**(1): p. 158-66.
160. Carpenter, J.L., et al., *Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency*. *Am J Pathol*, 1989. **135**(5): p. 909-19.
161. Gaschen, F.P., et al., *Dystrophin deficiency causes lethal muscle hypertrophy in cats*. *J Neurol Sci*, 1992. **110**(1-2): p. 149-59.
162. Kaspar, R.W., H.D. Allen, and F. Montanaro, *Current understanding and management of dilated cardiomyopathy in Duchenne and Becker muscular dystrophy*. *J Am Acad Nurse Pract*, 2009. **21**(5): p. 241-9.
163. Angelini, C., *The role of corticosteroids in muscular dystrophy: a critical appraisal*. *Muscle Nerve*, 2007. **36**(4): p. 424-35.
164. Manzur, A.Y., et al., *Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy*. *Cochrane Database Syst Rev*, 2008(1): p. CD003725.
165. Bushby, K., et al., *Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management*. *Lancet Neurol*. **9**(1): p. 77-93.
166. Stoddard, B.L., *Homing endonuclease structure and function*. *Q Rev Biophys*, 2005. **38**(1): p. 49-95.
167. Paques, F. and J.E. Haber, *Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae**. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1999. **63**(2): p. 349-404.

168. Chapdelaine, P., et al., *Meganucleases can restore the reading frame of a mutated dystrophin*. Gene Ther. **17**(7): p. 846-58.
169. Singh, A., D. Ursic, and J. Davies, *Phenotypic suppression and misreading Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 1979. **277**(5692): p. 146-8.
170. Palmer, E., J.M. Wilhelm, and F. Sherman, *Phenotypic suppression of nonsense mutants in yeast by aminoglycoside antibiotics*. Nature, 1979. **277**(5692): p. 148-50.
171. Yoshizawa, S., D. Fourmy, and J.D. Puglisi, *Structural origins of gentamicin antibiotic action*. EMBO J, 1998. **17**(22): p. 6437-48.
172. Kaufman, R.J., *Correction of genetic disease by making sense from nonsense*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 367-8.
173. Aurino, S. and V. Nigro, *Readthrough strategies for stop codons in Duchenne muscular dystrophy*. Acta Myol, 2006. **25**(1): p. 5-12.
174. Manuvakhova, M., K. Keeling, and D.M. Bedwell, *Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system*. RNA, 2000. **6**(7): p. 1044-55.
175. Barton-Davis, E.R., et al., *Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice*. J Clin Invest, 1999. **104**(4): p. 375-81.
176. Wagner, K.R., et al., *Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations*. Ann Neurol, 2001. **49**(6): p. 706-11.
177. Politano, L., et al., *Gentamicin administration in Duchenne patients with premature stop codon. Preliminary results*. Acta Myol, 2003. **22**(1): p. 15-21.
178. Dunant, P., et al., *Gentamicin fails to increase dystrophin expression in dystrophin-deficient muscle*. Muscle Nerve, 2003. **27**(5): p. 624-7.
179. Arakawa, M., et al., *Negamycin restores dystrophin expression in skeletal and cardiac muscles of mdx mice*. J Biochem, 2003. **134**(5): p. 751-8.
180. http://www.ptcbio.com/3.1.1_genetic_disorders.aspx.
181. Hirawat, S., et al., *Safety, tolerability, and pharmacokinetics of PTC124, a nonaminoglycoside nonsense mutation suppressor, following single- and multiple-dose administration to healthy male and female adult volunteers*. J Clin Pharmacol, 2007. **47**(4): p. 430-44.
182. Welch, E.M., et al., *PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations*. Nature, 2007. **447**(7140): p. 87-91.
183. <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=ptc124>.
184. Pramono, Z.A., et al., *Induction of exon skipping of the dystrophin transcript in lymphoblastoid cells by transfecting an antisense oligodeoxynucleotide complementary to an exon recognition sequence*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **226**(2): p. 445-9.
185. van Deutekom, J.C., et al., *Local dystrophin restoration with antisense oligonucleotide PRO051*. N Engl J Med, 2007. **357**(26): p. 2677-86.
186. Dias, N. and C.A. Stein, *Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(5): p. 347-55.
187. Stein, C.A. and Y.C. Cheng, *Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?* Science, 1993. **261**(5124): p. 1004-12.
188. Monia, B.P., et al., *Evaluation of 2'-modified oligonucleotides containing 2'-deoxy gaps as antisense inhibitors of gene expression*. J Biol Chem, 1993. **268**(19): p. 14514-22.

189. Baker, B.F., et al., *2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(18): p. 11994-2000.
190. van Deutekom, J.C., et al., *Antisense-induced exon skipping restores dystrophin expression in DMD patient derived muscle cells*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(15): p. 1547-54.
191. Aartsma-Rus, A., et al., *Targeted exon skipping as a potential gene correction therapy for Duchenne muscular dystrophy*. Neuromuscul Disord, 2002. **12 Suppl 1**: p. S71-7.
192. Lu, Q.L., et al., *Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse*. Nat Med, 2003. **9**(8): p. 1009-14.
193. Lu, Q.L., et al., *Systemic delivery of antisense oligonucleotide restores dystrophin expression in body-wide skeletal muscles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(1): p. 198-203.
194. Heemskerk, H., et al., *Preclinical PK and PD Studies on 2'-O-Methylphosphorothioate RNA Antisense Oligonucleotides in the mdx Mouse Model*. Mol Ther.
195. Aartsma-Rus, A. and G.J. van Ommen, *Progress in therapeutic antisense applications for neuromuscular disorders*. Eur J Hum Genet. **18**(2): p. 146-53.
196. Corey, D.R. and J.M. Abrams, *Morpholino antisense oligonucleotides: tools for investigating vertebrate development*. Genome Biol, 2001. **2**(5): p. REVIEWS1015.
197. Summerton, J. and D. Weller, *Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1997. **7**(3): p. 187-95.
198. Gryaznov, S.M., et al., *Oligonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(13): p. 5798-802.
199. Chen, J.K., et al., *Synthesis of oligodeoxyribonucleotide N3'-->P5' phosphoramidates*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(14): p. 2661-8.
200. Hudziak, R.M., et al., *Resistance of morpholino phosphorodiamidate oligomers to enzymatic degradation*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1996. **6**(4): p. 267-72.
201. Partridge, M., et al., *A simple method for delivering morpholino antisense oligos into the cytoplasm of cells*. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 1996. **6**(3): p. 169-75.
202. Gebiski, B.L., et al., *Morpholino antisense oligonucleotide induced dystrophin exon 23 skipping in mdx mouse muscle*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(15): p. 1801-11.
203. Alter, J., et al., *Systemic delivery of morpholino oligonucleotide restores dystrophin expression bodywide and improves dystrophic pathology*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 175-7.
204. Fletcher, S., et al., *Dystrophin expression in the mdx mouse after localised and systemic administration of a morpholino antisense oligonucleotide*. J Gene Med, 2006. **8**(2): p. 207-16.
205. Wu, B., et al., *Dose-dependent restoration of dystrophin expression in cardiac muscle of dystrophic mice by systemically delivered morpholino*. Gene Ther. **17**(1): p. 132-40.

206. Yokota, T., et al., *Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs*. *Ann Neurol*, 2009. **65**(6): p. 667-76.
207. Kinali, M., et al., *Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study*. *Lancet Neurol*, 2009. **8**(10): p. 918-28.
208. Heemskerk, H.A., et al., *In vivo comparison of 2'-O-methyl phosphorothioate and morpholino antisense oligonucleotides for Duchenne muscular dystrophy exon skipping*. *J Gene Med*, 2009. **11**(3): p. 257-66.
209. McPherron, A.C., A.M. Lawler, and S.J. Lee, *Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member*. *Nature*, 1997. **387**(6628): p. 83-90.
210. Schuelke, M., et al., *Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(26): p. 2682-8.
211. Wagner, K.R., et al., *Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice*. *Ann Neurol*, 2002. **52**(6): p. 832-6.
212. Bogdanovich, S., et al., *Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade*. *Nature*, 2002. **420**(6914): p. 418-21.
213. Gamer, L.W., et al., *A novel BMP expressed in developing mouse limb, spinal cord, and tail bud is a potent mesoderm inducer in Xenopus embryos*. *Dev Biol*, 1999. **208**(1): p. 222-32.
214. Bottinger, E.P., et al., *The recombinant proregion of transforming growth factor beta1 (latency-associated peptide) inhibits active transforming growth factor beta1 in transgenic mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(12): p. 5877-82.
215. Lee, S.J. and A.C. McPherron, *Regulation of myostatin activity and muscle growth*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(16): p. 9306-11.
216. Wagner, K.R., et al., *A phase I/II trial of MYO-029 in adult subjects with muscular dystrophy*. *Ann Neurol*, 2008. **63**(5): p. 561-71.
217. Tinsley, J., et al., *Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice*. *Nat Med*, 1998. **4**(12): p. 1441-4.
218. Krag, T.O., et al., *Heregulin ameliorates the dystrophic phenotype in mdx mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(38): p. 13856-60.
219. Chaubourt, E., et al., *Nitric oxide and l-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: a possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy*. *Neurobiol Dis*, 1999. **6**(6): p. 499-507.
220. Sonnemann, K.J., et al., *Functional substitution by TAT-utrophin in dystrophin-deficient mice*. *PLoS Med*, 2009. **6**(5): p. e1000083.
221. Squire, S., et al., *Prevention of pathology in mdx mice by expression of utrophin: analysis using an inducible transgenic expression system*. *Hum Mol Genet*, 2002. **11**(26): p. 3333-44.
222. Miura, P. and B.J. Jasmin, *Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we?* *Trends Mol Med*, 2006. **12**(3): p. 122-9.
223. Partridge, T.A., et al., *Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts*. *Nature*, 1989. **337**(6203): p. 176-9.
224. Torrente, Y., et al., *Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle*. *J Clin Invest*, 2004. **114**(2): p. 182-95.

225. Negroni, E., et al., *In vivo myogenic potential of human CD133+ muscle-derived stem cells: a quantitative study*. Mol Ther, 2009. **17**(10): p. 1771-8.
226. Torrente, Y., et al., *Autologous transplantation of muscle-derived CD133+ stem cells in Duchenne muscle patients*. Cell Transplant, 2007. **16**(6): p. 563-77.
227. Minasi, M.G., et al., *The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues*. Development, 2002. **129**(11): p. 2773-83.
228. Cossu, G. and P. Bianco, *Mesoangioblasts--vascular progenitors for extravascular mesodermal tissues*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(5): p. 537-42.
229. Sampaolesi, M., et al., *Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts*. Science, 2003. **301**(5632): p. 487-92.
230. Sampaolesi, M., et al., *Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs*. Nature, 2006. **444**(7119): p. 574-9.
231. Dellavalle, A., et al., *Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(3): p. 255-67.
232. Cossu, G. and M. Sampaolesi, *New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials*. Trends Mol Med, 2007. **13**(12): p. 520-6.
233. Caplan, A.I., *All MSCs are pericytes?* Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 229-30.
234. Farini, A., et al., *Cell based therapy for Duchenne muscular dystrophy*. J Cell Physiol, 2009. **221**(3): p. 526-34.
235. Crisan, M., et al., *A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(3): p. 301-13.
236. Ferrari, G., et al., *Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1528-30.
237. Goodell, M.A., et al., *Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo*. J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1797-806.
238. Gussoni, E., et al., *Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation*. Nature, 1999. **401**(6751): p. 390-4.
239. Corti, S., et al., *A subpopulation of murine bone marrow cells fully differentiates along the myogenic pathway and participates in muscle repair in the mdx dystrophic mouse*. Exp Cell Res, 2002. **277**(1): p. 74-85.
240. LaBarge, M.A. and H.M. Blau, *Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury*. Cell, 2002. **111**(4): p. 589-601.
241. McKinney-Freeman, S.L., et al., *Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(3): p. 1341-6.
242. Ferrari, G., A. Stornaiuolo, and F. Mavilio, *Failure to correct murine muscular dystrophy*. Nature, 2001. **411**(6841): p. 1014-5.
243. Gussoni, E., et al., *Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 807-14.
244. Dominici, M., et al., *Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*. Cytotherapy, 2006. **8**(4): p. 315-7.

245. Pittenger, M.F., et al., *Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells*. Science, 1999. **284**(5411): p. 143-7.
246. Dezawa, M., et al., *Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration*. Science, 2005. **309**(5732): p. 314-7.
247. De Bari, C., et al., *Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane*. J Cell Biol, 2003. **160**(6): p. 909-18.
248. Gang, E.J., et al., *Engraftment of mesenchymal stem cells into dystrophin-deficient mice is not accompanied by functional recovery*. Exp Cell Res, 2009. **315**(15): p. 2624-36.
249. Caplan, A.I., *Why are MSCs therapeutic? New data: new insight*. J Pathol, 2009. **217**(2): p. 318-24.
250. Lipton, B.H. and E. Schultz, *Developmental fate of skeletal muscle satellite cells*. Science, 1979. **205**(4412): p. 1292-4.
251. Watt, D.J., et al., *Incorporation of donor muscle precursor cells into an area of muscle regeneration in the host mouse*. J Neurol Sci, 1982. **57**(2-3): p. 319-31.
252. Kinoshita, I., et al., *Myoblast allotransplantation in primates*. Muscle Nerve, 1995. **18**(10): p. 1217-8.
253. Matsumura, K., et al., *Restoration of dystrophin-associated proteins in skeletal muscle of mdx mice transgenic for dystrophin gene*. FEBS Lett, 1993. **320**(3): p. 276-80.
254. Brussee, V., et al., *Normal myoblast implantation in MDX mice prevents muscle damage by exercise*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **250**(2): p. 321-7.
255. Rousseau, J., et al., *Dystrophin expression following the transplantation of normal muscle precursor cells protects mdx muscle from contraction-induced damage*. Cell Transplant.
256. Yao, S.N. and K. Kurachi, *Implanted myoblasts not only fuse with myofibers but also survive as muscle precursor cells*. J Cell Sci, 1993. **105 (Pt 4)**: p. 957-63.
257. Skuk, D., et al., *Intramuscular Transplantation of Human Postnatal Myoblasts Generates Functional Donor-Derived Satellite Cells*. Mol Ther.
258. Partridge, T.A., *Invited review: myoblast transfer: a possible therapy for inherited myopathies?* Muscle Nerve, 1991. **14**(3): p. 197-212.
259. Neumeyer, A.M., D.M. DiGregorio, and R.H. Brown, Jr., *Arterial delivery of myoblasts to skeletal muscle*. Neurology, 1992. **42**(12): p. 2258-62.
260. Skuk, D. and J.P. Tremblay, *A Historic Recapitulation of Myoblast Transplantation*, S. London, Editor. 2005: Guildford, UK. p. 61-79.
261. Menasche, P., et al., *Myoblast transplantation for heart failure*. Lancet, 2001. **357**(9252): p. 279-80.
262. Herreros, J., et al., *Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction*. Eur Heart J, 2003. **24**(22): p. 2012-20.
263. Menasche, P., et al., *The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation*. Circulation, 2008. **117**(9): p. 1189-200.
264. Lainscak, M., et al., *Clinical trials update from the Heart Failure Society of America Meeting 2009: FAST, IMPROVE-HF, COACH galectin-3 substudy, HF-*

- ACTION nuclear substudy, DAD-HF, and MARVEL-1.* Eur J Heart Fail. **12**(2): p. 193-6.
265. Lattanzi, L., et al., *High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies.* J Clin Invest, 1998. **101**(10): p. 2119-28.
266. Kimura, E., et al., *Cell-lineage regulated myogenesis for dystrophin replacement: a novel therapeutic approach for treatment of muscular dystrophy.* Hum Mol Genet, 2008. **17**(16): p. 2507-17.
267. Chaouch, S., et al., *Immortalized skin fibroblasts expressing conditional MyoD as a renewable and reliable source of converted human muscle cells to assess therapeutic strategies for muscular dystrophies: validation of an exon-skipping approach to restore dystrophin in Duchenne muscular dystrophy cells.* Hum Gene Ther, 2009. **20**(7): p. 784-90.
268. Hardiman, O., R.M. Sklar, and R.H. Brown, Jr., *Direct effects of cyclosporin A and cyclophosphamide on differentiation of normal human myoblasts in culture.* Neurology, 1993. **43**(7): p. 1432-4.
269. Skuk, D., et al., *Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells.* Mol Ther, 2004. **9**(3): p. 475-82.
270. Skuk, D., et al., *Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells.* J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(4): p. 371-86.
271. Skuk, D., et al., *First test of a "high-density injection" protocol for myogenic cell transplantation throughout large volumes of muscles in a Duchenne muscular dystrophy patient: eighteen months follow-up.* Neuromuscul Disord, 2007. **17**(1): p. 38-46.
272. Skuk, D. and J.P. Tremblay, *"Engineering" myoblast transplantation.* Graft, 2001(4): p. 558-570.
273. Guerette, B., et al., *Prevention by anti-LFA-1 of acute myoblast death following transplantation.* J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2522-31.
274. Skuk, D., et al., *Resetting the problem of cell death following muscle-derived cell transplantation: detection, dynamics and mechanisms.* J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(9): p. 951-67.
275. Skuk, D., et al., *Dynamics of the early immune cellular reactions after myogenic cell transplantation.* Cell Transplant, 2002. **11**(7): p. 671-81.
276. Bouchentouf, M., et al., *Induction of Anoikis following myoblast transplantation into SCID mouse muscles requires the Bit1 and FADD pathways.* Am J Transplant, 2007. **7**(6): p. 1491-505.
277. Bouchentouf, M., et al., *Vascular endothelial growth factor reduced hypoxia-induced death of human myoblasts and improved their engraftment in mouse muscles.* Gene Ther, 2008. **15**(6): p. 404-14.
278. Morgan, J.E., E.P. Hoffman, and T.A. Partridge, *Normal myogenic cells from newborn mice restore normal histology to degenerating muscles of the mdx mouse.* J Cell Biol, 1990. **111**(6 Pt 1): p. 2437-49.
279. Wakeford, S., D.J. Watt, and T.A. Partridge, *X-irradiation improves mdx mouse muscle as a model of myofiber loss in DMD.* Muscle Nerve, 1991. **14**(1): p. 42-50.

280. Kinoshita, I., J.T. Vilquin, and J.P. Tremblay, *Pretreatment of myoblast cultures with basic fibroblast growth factor increases the efficacy of their transplantation in mdx mice*. Muscle Nerve, 1995. **18**(8): p. 834-41.
281. Lafreniere, J.F., et al., *Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity*. Transplantation, 2004. **77**(11): p. 1741-7.
282. Stephan, L., et al., *1,25-dihydroxyvitamin D3 increases the transplantation success of human muscle precursor cells in SCID mice*. Cell Transplant, 2007. **16**(4): p. 391-402.
283. Mills, P., et al., *A synthetic mechano growth factor E Peptide enhances myogenic precursor cell transplantation success*. Am J Transplant, 2007. **7**(10): p. 2247-59.
284. El Fahime, E., et al., *The urokinase plasminogen activator: an interesting way to improve myoblast migration following their transplantation*. Exp Cell Res, 2002. **280**(2): p. 169-78.
285. Benabdallah, B.F., et al., *Inhibiting myostatin with follistatin improves the success of myoblast transplantation in dystrophic mice*. Cell Transplant, 2008. **17**(3): p. 337-50.
286. Guerette, B., et al., *Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mdx mice*. Muscle Nerve, 1995. **18**(1): p. 39-51.
287. Kinoshita, I., et al., *Very efficient myoblast allotransplantation in mice under FK506 immunosuppression*. Muscle Nerve, 1994. **17**(12): p. 1407-15.
288. Kinoshita, I., et al., *Myoblast transplantation in monkeys: control of immune response by FK506*. J Neuropathol Exp Neurol, 1996. **55**(6): p. 687-97.
289. Camirand, G., et al., *Treatment with anti-CD154 antibody and donor-specific transfusion prevents acute rejection of myoblast transplantation*. Transplantation, 2002. **73**(3): p. 453-61.
290. Stephan, L., et al., *Induction of tolerance across fully mismatched barriers by a nonmyeloablative treatment excluding antibodies or irradiation use*. Cell Transplant, 2006. **15**(8-9): p. 835-46.
291. Floyd, S.S., Jr., et al., *Ex vivo gene transfer using adenovirus-mediated full-length dystrophin delivery to dystrophic muscles*. Gene Ther, 1998. **5**(1): p. 19-30.
292. Moisset, P.A., et al., *Successful transplantation of genetically corrected DMD myoblasts following ex vivo transduction with the dystrophin minigene*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): p. 94-9.
293. Anderson, W.F., *September 14, 1990: the beginning*. Hum Gene Ther, 1990. **1**(4): p. 371-2.
294. Lehrman, S., *Virus treatment questioned after gene therapy death*. Nature, 1999. **401**(6753): p. 517-8.
295. Hacein-Bey-Abina, S., et al., *A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency*. N Engl J Med, 2003. **348**(3): p. 255-6.
296. Phelps, S.F., et al., *Expression of full-length and truncated dystrophin mini-genes in transgenic mdx mice*. Hum Mol Genet, 1995. **4**(8): p. 1251-8.
297. Banks, G.B., J.S. Chamberlain, and S.C. Froehner, *Truncated dystrophins can influence neuromuscular synapse structure*. Mol Cell Neurosci, 2009. **40**(4): p. 433-41.

298. Rafael, J.A., et al., *Forced expression of dystrophin deletion constructs reveals structure-function correlations*. J Cell Biol, 1996. **134**(1): p. 93-102.
299. Harper, S.Q., et al., *Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy*. Nat Med, 2002. **8**(3): p. 253-61.
300. Wang, B., et al., *A canine minidystrophin is functional and therapeutic in mdx mice*. Gene Ther, 2008. **15**(15): p. 1099-106.
301. Banks, G.B., et al., *The polyproline site in hinge 2 influences the functional capacity of truncated dystrophins*. PLoS Genet. **6**(5): p. e1000958.
302. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
303. Chan, D.C. and P.S. Kim, *HIV entry and its inhibition*. Cell, 1998. **93**(5): p. 681-4.
304. Malim, M.H., et al., *The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA*. Nature, 1989. **338**(6212): p. 254-7.
305. Cullen, B.R., *Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism*. Cell, 1986. **46**(7): p. 973-82.
306. Klimatcheva, E., J.D. Rosenblatt, and V. Planelles, *Lentiviral vectors and gene therapy*. Front Biosci, 1999. **4**: p. D481-96.
307. Sirven, A., et al., *The human immunodeficiency virus type-1 central DNA flap is a crucial determinant for lentiviral vector nuclear import and gene transduction of human hematopoietic stem cells*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4103-10.
308. Miles, L.R., et al., *Effect of polypurine tract (PPT) mutations on human immunodeficiency virus type 1 replication: a virus with a completely randomized PPT retains low infectivity*. J Virol, 2005. **79**(11): p. 6859-67.
309. Taganov, K.D., et al., *Integrase-specific enhancement and suppression of retroviral DNA integration by compacted chromatin structure in vitro*. J Virol, 2004. **78**(11): p. 5848-55.
310. Scherдин, U., K. Rhodes, and M. Breindl, *Transcriptionally active genome regions are preferred targets for retrovirus integration*. J Virol, 1990. **64**(2): p. 907-12.
311. Zufferey, R., et al., *Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo*. Nat Biotechnol, 1997. **15**(9): p. 871-5.
312. Dull, T., et al., *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system*. J Virol, 1998. **72**(11): p. 8463-71.
313. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
314. Zufferey, R., et al., *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2886-92.
315. Cronin, J., X.Y. Zhang, and J. Reiser, *Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(4): p. 387-98.
316. <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/>.
317. Hakim, F.A. and I.M. Tleyjeh, *Severe adenovirus pneumonia in immunocompetent adults: a case report and review of the literature*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2008. **27**(2): p. 153-8.

318. Walsh, M.P., et al., *Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen*. J Clin Microbiol. **48**(3): p. 991-3.
319. Zaiss, A.K., H.B. Machado, and H.R. Herschman, *The influence of innate and pre-existing immunity on adenovirus therapy*. J Cell Biochem, 2009. **108**(4): p. 778-90.
320. Mitani, K., et al., *Rescue, propagation, and partial purification of a helper virus-dependent adenovirus vector*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3854-8.
321. Fisher, K.J., et al., *Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis*. Virology, 1996. **217**(1): p. 11-22.
322. Alba, R., A. Bosch, and M. Chillon, *Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy*. Gene Ther, 2005. **12 Suppl 1**: p. S18-27.
323. Atchison, R.W., B.C. Casto, and W.M. Hammon, *Adenovirus-Associated Defective Virus Particles*. Science, 1965. **149**: p. 754-6.
324. Geoffroy, M.C. and A. Salvetti, *Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth*. Curr Gene Ther, 2005. **5**(3): p. 265-71.
325. Schmidt, M., et al., *Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity*. J Virol, 2008. **82**(3): p. 1399-406.
326. McCarty, D.M., S.M. Young, Jr., and R.J. Samulski, *Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors*. Annu Rev Genet, 2004. **38**: p. 819-45.
327. Smith, R.H., *Adeno-associated virus integration: virus versus vector*. Gene Ther, 2008. **15**(11): p. 817-22.
328. Merten, O.W., C. Geny-Fiamma, and A.M. Douar, *Current issues in adeno-associated viral vector production*. Gene Ther, 2005. **12 Suppl 1**: p. S51-61.
329. Clement, N., D.R. Knop, and B.J. Byrne, *Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(8): p. 796-806.
330. Thorne, B.A., R.K. Takeya, and R.W. Peluso, *Manufacturing recombinant adeno-associated viral vectors from producer cell clones*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(7): p. 707-14.
331. Lock, M., et al., *Rapid, Simple and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors at Scale*. Hum Gene Ther.
332. Kafri, T., et al., *Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors*. Nat Genet, 1997. **17**(3): p. 314-7.
333. Seppen, J., et al., *Lentivirus administration to rat muscle provides efficient sustained expression of erythropoietin*. Blood, 2001. **98**(3): p. 594-6.
334. Kobinger, G.P., et al., *Correction of the dystrophic phenotype by in vivo targeting of muscle progenitor cells*. Hum Gene Ther, 2003. **14**(15): p. 1441-9.
335. Kimura, E., et al., *Dystrophin delivery to muscles of mdx mice using lentiviral vectors leads to myogenic progenitor targeting and stable gene expression*. Mol Ther. **18**(1): p. 206-13.
336. Bachrach, E., et al., *Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3581-6.

337. Bachrach, E., et al., *Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation*. *Muscle Nerve*, 2006. **34**(1): p. 44-52.
338. Quenneville, S.P., et al., *Autologous transplantation of muscle precursor cells modified with a lentivirus for muscular dystrophy: human cells and primate models*. *Mol Ther*, 2007. **15**(2): p. 431-8.
339. Gorman, L., et al., *Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(9): p. 4929-34.
340. Benchaouir, R., et al., *Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(6): p. 646-57.
341. Ragot, T., et al., *Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice*. *Nature*, 1993. **361**(6413): p. 647-50.
342. Deconinck, N., et al., *Functional protection of dystrophic mouse (mdx) muscles after adenovirus-mediated transfer of a dystrophin minigene*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(8): p. 3570-4.
343. Vincent, N., et al., *Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene*. *Nat Genet*, 1993. **5**(2): p. 130-4.
344. Acsadi, G., et al., *A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity*. *Hum Mol Genet*, 1994. **3**(4): p. 579-84.
345. Howell, J.M., et al., *High-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscle of dystrophic dogs: prolongation of expression with immunosuppression*. *Hum Gene Ther*, 1998. **9**(5): p. 629-34.
346. Dudley, R.W., et al., *Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector*. *Hum Gene Ther*, 2004. **15**(2): p. 145-56.
347. Gilbert, R., et al., *Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles*. *Hum Gene Ther*, 1999. **10**(8): p. 1299-310.
348. Li, D., et al., *Sarcolemmal nNOS anchoring reveals a qualitative difference between dystrophin and utrophin*. *J Cell Sci*. **123**(Pt 12): p. 2008-13.
349. Wang, Z., et al., *Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart*. *Nat Biotechnol*, 2005. **23**(3): p. 321-8.
350. Wang, B., J. Li, and X. Xiao, *Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(25): p. 13714-9.
351. 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*, 2007. **15**(6): p. 1160-6.
352. Ohshima, S., et al., *Transduction efficiency and immune response associated with the administration of AAV8 vector into dog skeletal muscle*. *Mol Ther*, 2009. **17**(1): p. 73-80.
353. Wang, Z., et al., *Immune responses to AAV in canine muscle monitored by cellular assays and noninvasive imaging*. *Mol Ther*. **18**(3): p. 617-24.

354. Rodino-Klapac, L.R., et al., *Persistent expression of FLAG-tagged micro dystrophin in nonhuman primates following intramuscular and vascular delivery*. Mol Ther. **18**(1): p. 109-17.
355. Goyenvalle, A., et al., *Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping*. Science, 2004. **306**(5702): p. 1796-9.
356. Denti, M.A., et al., *Long-term benefit of adeno-associated virus/antisense-mediated exon skipping in dystrophic mice*. Hum Gene Ther, 2008. **19**(6): p. 601-8.
357. 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, 2008. **19**(3): p. 241-54.
358. Qiao, C., et al., *Hydrodynamic limb vein injection of adeno-associated virus serotype 8 vector carrying canine myostatin propeptide gene into normal dogs enhances muscle growth*. Hum Gene Ther, 2009. **20**(1): p. 1-10.
359. Wolff, J.A., et al., *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo*. Science, 1990. **247**(4949 Pt 1): p. 1465-8.
360. Acsadi, G., et al., *Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs*. Nature, 1991. **352**(6338): p. 815-8.
361. Danko, I., et al., *Dystrophin expression improves myofiber survival in mdx muscle following intramuscular plasmid DNA injection*. Hum Mol Genet, 1993. **2**(12): p. 2055-61.
362. Romero, N.B., et al., *Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy*. Hum Gene Ther, 2004. **15**(11): p. 1065-76.
363. Liu, D., T. Ren, and X. Gao, *Cationic transfection lipids*. Curr Med Chem, 2003. **10**(14): p. 1307-15.
364. Rettig, G.R. and K.G. Rice, *Non-viral gene delivery: from the needle to the nucleus*. Expert Opin Biol Ther, 2007. **7**(6): p. 799-808.
365. Gau-Racine, J., et al., *PEO-PPO block copolymer vectors do not interact directly with DNA but with lipid membranes*. J Phys Chem B, 2007. **111**(33): p. 9900-7.
366. Roques, C., E. Fattal, and Y. Fromes, *Comparison of toxicity and transfection efficiency of amphiphilic block copolymers and polycationic polymers in striated muscles*. J Gene Med, 2009. **11**(3): p. 240-9.
367. Budker, V., et al., *Naked DNA delivered intraportally expresses efficiently in hepatocytes*. Gene Ther, 1996. **3**(7): p. 593-8.
368. Hagstrom, J.E., et al., *A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs*. Mol Ther, 2004. **10**(2): p. 386-98.
369. Wolff, J., et al., *Non-viral approaches for gene transfer*. Acta Myol, 2005. **24**(3): p. 202-8.
370. Braun, S., *Muscular gene transfer using nonviral vectors*. Curr Gene Ther, 2008. **8**(5): p. 391-405.
371. Zhang, G., et al., *Functional efficacy of dystrophin expression from plasmids delivered to mdx mice by hydrodynamic limb vein injection*. Hum Gene Ther. **21**(2): p. 221-37.
372. Danialou, G., et al., *Ultrasound increases plasmid-mediated gene transfer to dystrophic muscles without collateral damage*. Mol Ther, 2002. **6**(5): p. 687-93.

373. Bekeredjian, R., et al., *Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart*. *Circulation*, 2003. **108**(8): p. 1022-6.
374. Lu, Q.L., et al., *Microbubble ultrasound improves the efficiency of gene transduction in skeletal muscle in vivo with reduced tissue damage*. *Gene Ther*, 2003. **10**(5): p. 396-405.
375. Aihara, H. and J. Miyazaki, *Gene transfer into muscle by electroporation in vivo*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(9): p. 867-70.
376. Mir, L.M., et al., *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(8): p. 4262-7.
377. Gissel, H. and T. Clausen, *Excitation-induced Ca²⁺ influx and skeletal muscle cell damage*. *Acta Physiol Scand*, 2001. **171**(3): p. 327-34.
378. Trollet, C., D. Scherman, and P. Bigey, *Delivery of DNA into muscle for treating systemic diseases: advantages and challenges*. *Methods Mol Biol*, 2008. **423**: p. 199-214.
379. Marshall, W.G., Jr., et al., *Electroporation-mediated delivery of a naked DNA plasmid expressing VEGF to the porcine heart enhances protein expression*. *Gene Ther*. **17**(3): p. 419-23.
380. Peng, B., et al., *In vivo plasmid DNA electroporation resulted in transfection of satellite cells and lasting transgene expression in regenerated muscle fibers*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005. **338**(3): p. 1490-8.
381. Trollet, C., et al., *Electrotransfer into skeletal muscle for protein expression*. *Curr Gene Ther*, 2006. **6**(5): p. 561-78.
382. Kawai, M., et al., *Simultaneous gene transfer of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-7 by in vivo electroporation induces rapid bone formation and BMP-4 expression*. *BMC Musculoskelet Disord*, 2006. **7**: p. 62.
383. Mir, L.M., et al., *[Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial]*. *C R Acad Sci III*, 1991. **313**(13): p. 613-8.
384. Favard, C., D.S. Dean, and M.P. Rols, *Electrotransfer as a non viral method of gene delivery*. *Curr Gene Ther*, 2007. **7**(1): p. 67-77.
385. Bodles-Brakhop, A.M., R. Heller, and R. Draghia-Akli, *Electroporation for the delivery of DNA-based vaccines and immunotherapeutics: current clinical developments*. *Mol Ther*, 2009. **17**(4): p. 585-92.
386. Mir, L.M., *Application of electroporation gene therapy: past, current, and future*. *Methods Mol Biol*, 2008. **423**: p. 3-17.
387. Chapdelaine, P., et al., *Functional EGFP-dystrophin fusion proteins for gene therapy vector development*. *Protein Eng*, 2000. **13**(9): p. 611-5.
388. Vilquin, J.T., et al., *Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies*. *Gene Ther*, 2001. **8**(14): p. 1097-107.
389. Escors, D. and K. Breckpot, *Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. **58**(2): p. 107-19.
390. Tremblay, J.P., B. Roy, and M. Goulet, *Human myoblast transplantation: a simple assay for tumorigenicity*. *Neuromuscul Disord*, 1991. **1**(5): p. 341-3.
391. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. *Annu Rev Immunol*, 2002. **20**: p. 709-60.

392. Vilquin, J.T., et al., *Successful histocompatible myoblast transplantation in dystrophin-deficient mdx mouse despite the production of antibodies against dystrophin*. J Cell Biol, 1995. **131**(4): p. 975-88.
393. Roy, R., et al., *Antibody formation after myoblast transplantation in Duchenne-dystrophic patients, donor HLA compatible*. Transplant Proc, 1993. **25**(1 Pt 2): p. 995-7.
394. Mendell, J.R., et al., *Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy*. N Engl J Med. **363**(15): p. 1429-37.
395. Owens, R.A., *Second generation adeno-associated virus type 2-based gene therapy systems with the potential for preferential integration into AAVS1*. Curr Gene Ther, 2002. **2**(2): p. 145-59.
396. Mir, L.M., et al., *Electric pulse-mediated gene delivery to various animal tissues*. Adv Genet, 2005. **54**: p. 83-114.
397. Flinterman, M., et al., *Delivery of therapeutic proteins as secretable TAT fusion products*. Mol Ther, 2009. **17**(2): p. 334-42.