

Université de Montréal

**Optimisation du vecteur adénoviral pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire
de Duchenne**

par

Marc-André Robert

Programmes de biologie moléculaire

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor*

aux programmes de biologie moléculaire

Décembre, 2012

© Marc-André Robert, 2012

Résumé

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie très sévère, progressive et sans traitement vraiment efficace. Elle est caractérisée par l'absence fonctionnelle de la dystrophine, une protéine essentielle au maintien des muscles squelettiques. La thérapie génique est actuellement envisagée comme approche thérapeutique pour livrer la dystrophine dans les muscles. Les vecteurs adénoviraux de troisième génération (*Helper-dependent adenoviral vector*, HD) sont des véhicules de transfert génique très prometteurs pour traiter la DMD. Puisque les gènes adénoviraux ont été enlevés complètement du HD, ils sont peu toxiques, faiblement immunogéniques et ils possèdent un espace cargo suffisant pour transporter l'ADN codant complet de la dystrophine. Bien que le HD puisse fournir la dystrophine de façon thérapeutique chez des souris dystrophiques (*mdx*), l'expression du gène thérapeutique est progressivement perdue plusieurs mois suivant l'injection intramusculaire. Deux stratégies innovantes furent explorées dans cette thèse dans le but de stabiliser l'expression de la dystrophine.

La première stratégie vise à l'intégration de l'ADN du HD dans les chromosomes cellulaires, ce qui pourrait le protéger contre son élimination progressive des muscles. Une intégrase site-spécifique issue du phage Φ C31 a été utilisée pour catalyser l'intégration d'un HD transportant un marqueur de sélection. Dans les cellules humaines et les myoblastes murins, l'activité de l'intégrase a été évaluée d'après son efficacité d'intégration (après sélection) et sa spécificité (dans les clones résistants). L'efficacité atteint jusqu'à 0,5 % par cellule et jusqu'à 76 % des événements d'intégration ont été réalisés de façon site-spécifique. Bien que des délétions aient été trouvées aux extrémités du vecteur, 70 % des clones analysés montraient une seule copie du vecteur intégré (le nombre attendu). Seulement une petite augmentation du nombre de brisures double-brin a été mesurée dans les myoblastes exprimant l'intégrase. En conclusion, l'intégration du HD est relativement efficace, spécifique et sécuritaire. Cette méthode est très prometteuse, car la dystrophine peut être livrée dans le muscle avec l'aide du HD et l'intégration de l'ADN du HD pourrait stabiliser son expression *in vivo*.

La deuxième stratégie implique l'utilisation d'un nouveau promoteur musculospécifique (Δ USEx3) pour réduire la toxicité induite liée à une expression trop étendue de la dystrophine. Dans cette étude, nous avons investigué l'effet du contexte viral sur l'activité du promoteur. Un HD et un vecteur lentiviral (LV) ont été construits avec le promoteur Δ USEx3 pour contrôler l'expression d'un gène rapporteur. Les résultats démontrent que Δ USEx3 confère une expression puissante, musculospécifique et stable (via le LV) *in vitro*. L'injection intramusculaire du HD a conduit à une expression puissante du transgène. Ces résultats contrastent avec ceux du LV, car après l'injection de ce dernier, l'expression était faible. La livraison du HD dans le muscle, mais aussi dans plusieurs organes démontre la musculospécificité de Δ USEx3. Par conséquent, le contexte du vecteur et l'environnement musculaire modulent tous les deux l'activité de Δ USEx3. Bien que Δ USEx3 soit musculospécifique, d'autres études sont requises pour déterminer si le promoteur peut stabiliser l'expression de la dystrophine *in vivo*.

Mots clefs : vecteurs adénoviraux de 3^e génération, intégrase Φ C31, vecteurs lentiviraux, muscle, souris *mdx*, promoteurs musculospécifiques, thérapie génique.

Abstract

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is a severe, progressive and orphan disease that is characterized by the absence of the functional muscle protein dystrophin. Gene therapy is currently investigated as a therapeutic approach to deliver dystrophin into muscles. Helper-dependent adenoviral vectors (HD) are promising gene transfer vehicles for gene therapy of DMD. Because HD are devoid of all adenoviral genes, they are weakly toxic, poorly immunogenic and possess sufficient cargo capacity to carry the full-length dystrophin cDNA. Although HD can provide dystrophin therapeutically in dystrophic mice, gene expression decays months after intramuscular injection. Two strategies that both aimed to stabilize dystrophin expression were explored here.

The first strategy involved the integration of HD DNA into cellular chromosomes. Stabilizing HD DNA could prevent its elimination from muscles. A site-specific integrase from phage Φ C31 was used to integrate an HD carrying a selection marker in human cells and murine myoblasts. Efficacy of integration (obtained after selection) reached up to 0.5% per cell, and up to 76% of integration events (in clones) were mediated site-specifically. Although some deletions in HD extremities occurred, 70% of clones analyzed showed one integrated copy of HD (as expected). Only a small increase in the number of double-strand breaks was found in myoblasts expressing the integrase. In conclusion, HD integration was relatively efficient, specific and safe. This method could be used to stabilize dystrophin expression *in vivo*.

The second strategy involved using a muscle-specific promoter (Δ USEx3) to reduce potential toxicity induced by widespread expression of dystrophin. Because Δ USEx3 would be delivered by HD, we investigated whether or not the viral context could affect Δ USEx3 activity. We constructed an HD and a lentiviral vector (LV) carrying a reporter gene under its control. Strong, muscle-specific and stable (with LV) expression was obtained *in vitro*. Intramuscular injection of HD resulted into a powerful transgene expression contrasting with

LV, where expression was relatively weak. Delivery of Δ USEx3 in multiple tissues by HD demonstrated its muscle-specificity. Therefore, both the viral context and the muscular environments modulate Δ USEx3 activity. Further studies are required to determine whether or not Δ USEx3 can stabilize dystrophin expression *in vivo*.

Keywords: helper-dependent adenoviral vectors, Φ C31 integrase, lentiviral vectors, muscle, *mdx* mice, muscle-specific promoters, gene therapy.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	vi
Liste des abréviations	ix
Listes des figures.....	xii
Listes des tables.....	xiv
Remerciements.....	xv
Avant-propos.....	xvi
1 Introduction.....	1
1.1 Le muscle squelettique.....	1
1.2 La dystrophine et la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD).....	7
1.3 La thérapie cellulaire à partir de cellules myogéniques.....	18
1.4 La livraison de transgènes par les vecteurs viraux.....	26
1.5 Comprendre et améliorer l'expression d'un transgène livré par un HD.....	72
1.6 L'intégration dirigée du HD dans les chromosomes cellulaires.....	78
1.7 L'intégrase du phage Φ C31.....	84
1.8 Les promoteurs musculospécifiques.....	96
2 Problématique générale.....	103
2.1 L'intégration de l'ADN du HD, hypothèse de travail et objectifs.....	103

2.2	L'expression musculospécifique, hypothèse de travail et objectifs.....	105
	Results.....	108
3	Efficacy and site-specificity of adenoviral vector integration mediated by the phage Φ C31 integrase.....	108
	Contributions à l'article.....	109
3.1	Abstract.....	110
3.2	Introduction.....	112
3.3	Materials & methods	114
3.4	Results.....	122
3.5	Discussion.....	139
3.6	Acknowledgements.....	144
3.7	Disclosure Statement	144
3.8	Supplementary figures.....	145
4	Strength and muscle specificity of a compact promoter derived from the slow troponin I gene in the context of episomal (gutless adenovirus) and integrating (lentiviral) vectors.....	147
	Contributions à l'article.....	148
4.1	Abstract.....	149
4.2	Introduction.....	151
4.3	Materials and methods.....	153
4.4	Results.....	161

4.5	Discussion.....	175
4.6	Conclusions.....	180
4.7	Acknowledgements.....	180
5	Un retour sur les articles.....	181
5.1	Intégration site-spécifique du HD à l'aide de l'intégrase du phage Φ C31..	182
5.2	Étude contextuelle du HD et du LV sur l'activité du promoteur Δ USEx3.	183
6	Discussion générale, perspectives et conclusion.....	186
6.1	Efficacité d'intégration.....	188
6.2	Spécificité de la manipulation du génome.....	189
6.3	Génotoxicité liée à l'intégrase.....	192
6.4	Caractérisation de l'intégration in vivo (perspectives).....	193
6.5	Activité du promoteur Δ USEx3 selon le contexte du vecteur.....	193
6.6	Vers une thérapie génique pour la dystrophie musculaire de Duchenne....	196
6.7	Conclusion.....	200
6.8	Références.....	201

Liste des abréviations

AAV/rAAV/drAAV : virus associé à l'adénovirus ; *Adeno-Associated Virus* ; « r » pour recombinant et « d » pour *dual*

ABD : domaine de liaison à l'actine (de la dystrophine) ; *Actin Binding Domain*.

Actin F : Actine filamenteuse

Ad : Adénovirus

ADNc ou cDNA : ADN complémentaire ; complementary DNA

ADP : *Adenovirus death protein*

ATP: Adénosine triphosphate

CAG : promoteur hybride contenant l'*enhancer* immédiat du CMV et le promoteur de l'actine β aviaire

CAR : Récepteur du virus Coxsackie et de l'adénovirus; *Coxsackie virus and Adenoviral Receptor*

CMV: promoteur immédiat précoce du Cytomégalovirus ; *immediate early CytoMegaloVirus promoter*

CR : domaine de la dystrophine, riche en cystéines; *Cysteins Rich*.

CS : cellule satellite

c-SIN : relatifs au vecteur lentiviral, auto-inactivation conditionnelle ; *conditionnal-Self Inactivating*

DAPC : complexe de protéines associées à la dystrophine ; *Dystrophin-Associated Protein Complex*.

DGC : complexe dystrophine-dystroglycane ; *Dystrophin-Dystroglycan Complex*.

DMD : dystrophie musculaire de Duchenne

DSB : brisure double-brin à l'ADN ; *DNA Double-Strand Breaks*

EBNA : antigène nucléaire du virus Epstein-Barr ; *Epstein-Barr Nuclear Antigen*

FDA : *Food and Drug Administration*

FIX : facteur sanguin de coagulation IX

GFP : protéine fluorescente verte ; *Green Fluorescent Protein*

HD : vecteur adénoviral de troisième génération, *Helper-Dependent adenoviral vector*

HPRT : *Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase*

IN : relatif aux lentivirus, intégrase

iPSc : cellules souches pluripotentes induites, *induced Pluripotent Stem cells*

ITR : relatif aux AAV et adénovirus, répétition terminale inverse, *Inverted Terminal Repeat*

LTR : relatif au lentivirus, longue répétition terminale ; *Long Terminal Repeat*

LV : vecteur lentiviral ; *Lentiviral Vector*

MCK : promoteur de la créatine kinase musculaire ; *Muscle Creatin Kinase promoter*

MEF : facteur potentialisateur de myocytes ; *Myocyte Enhancer Factor*

MLP : relatif à l'adénovirus, *Major Late Promoter*

MLV : virus de la leucémie murine ; *Murine Leukemia virus*

MMCT : transfert de chromosome par microcellule ; *Microcell-Mediated-Chromosome-Transfert*

MOI : nombre de particules virales par cellule; *Multiplicity Of Infection*

MRF : facteurs de régulation de la myogenèse, *Myogenesis Regulating Factors*

MSC : cellules souches mésenchymateuses ; *Mesenchymial Stem Cell*

NHEJ : recombinaison par ligature d'extrémités non homologues; *Non-Homologous End Jointing recombination*

NLS : signal de localisation nucléaire ; *Nuclear Localization Signal*

nNOS : oxyde nitrique synthétase neuronale, *neuronal Nitric Oxyde Synthase*

NO : oxyde nitrique ; *Nitric Oxide*

PBS : relatif au lentivirus, site de liaison à l'ARNt (amorçe) de la lysine ; *Primer Binding Site*

PCR : réaction de polymérisation en chaîne ; *Polymerase Chain Reaction*

PGAd : adénovirus de 1^{ère} génération

PIC : relatif au lentivirus, complexe de préintégration ; *PreIntegration Complex*.

PPT et cPPT : relatif au lentivirus, suite de plusieurs purines centrale ou pas ; *PolyPurine Tract or central PolyPurine Tract*

PR : relatif au lentivirus, protéase

RBE : élément de liaison à Rev, *Rev Binding Elements*

RCA: adénovirus compétent pour la réplication ; *Replication Competent Adenovirus*

RH : recombinaison homologue

RRE : élément de réponse à rev, *Rev Response Element*

RSV : promoteur viral du sarcome de Rous ; *Rous Sarcoma Virus promoter*

RT : relatif au lentivirus, transcriptase inverse ; *Reverse Transcriptase*

RV : vecteur rétroviral ; *Retroviral Vector*

S/MAR : Région d'attachement à la matrice nucléaire; *Scaffold/Matrix Attachment Region*

SCID : immunodéficience combinée sévère; *Severe Combined ImmunoDeficiency*

SURE : *Slow Upstream Regulatory Element*

SV40 : promoteur du virus simien 40 ; *Simian virus 40 promoter*

TA : *tibialis anterior*

TALEN : *Transcription activator-like effectors nucleases*

TET : promoteur inductible à la tétracyclique (ou doxycycline)

TLR : récepteur similaire au type Toll ; *Toll-like Receptor*

TnIS : troponine I lente ; *Troponin I Slow*

TU : unité de transduction, mesure de l'infectivité du vecteur viral ; *Transduction Unit*

UCOE : éléments ubiquitaires d'ouverture de la chromatine ; *Ubiquitous Chromatin Opening Elements*

USE : relatif au promoteur de la troponine I lente, *Upstream Slow Element*

VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine 1

VSVg : protéine g du virus vésiculaire de la stomatite ; *Vesicular Stomatitis Virus g protein*

WPRE : élément régulateur posttranscriptionnel du virus woodchuck de l'hépatite ; *Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element*

ZFN : nucléase à doigts de zinc ; *Zinc Finger Nucleases*

ΦC31-Int : intégrase du phage ΦC31

Ψ : signal d'encapsidation viral

Listes des figures

Figure 1-1. Organisation d'un muscle squelettique depuis le niveau macroscopique jusqu'au niveau microscopique.....	2
Figure 1-2. Les partenaires de la dystrophine au niveau du sarcolème.....	10
Figure 1-3. Les deux approches thérapeutiques et les difficultés liées à la thérapie génique pour la DMD.....	19
Figure 1-4. Structure du génome de l'AAV.	27
Figure 1-5. Organisation du proADN viral pour le lentivirus et les vecteurs 3 ^e génération. ..	35
Figure 1-6. Schéma d'un vecteur lentiviral.	36
Figure 1-7. Schéma de l'adénovirus ou du HD.	52
Figure 1-8. Schéma des génomes de l'adénovirus et de ses vecteurs dérivés.	54
Figure 1-9. Intégration d'un plasmide par l'intégrase du phage Φ C31.	86
Figure 3-1. Illustrations of HD and the circular form of HD.....	124
Figure 3-2. Characterization by Southern blot and basal integration of HD.	126
Figure 3-3. Integration efficacy of circular and linear HD in HeLa cells.	131
Figure 3-4. Integration of HD-GFPattB in C2C12 myoblasts.	133
Figure 3-5. Effects of Φ C31-int expression on the formation of double-strand breaks.	135
Figure 3-6. Sequence of pseudo attP sites used by HD-GFPattB for integration.	137
Supplementary Figure 3-7. Presence of Φ C31-Int and Cre sequences in HD detected by Southern blot.....	145

Supplementary Figure 3-8. Transduction of HeLa cells with HD-Int does not reduce cell viability.	146
Figure 4-1. Structure of Δ USEx3 and viral vectors.	162
Figure 4-2. β -gal expression after gene transfer with HD-CAGLacZ and HD- Δ x3LacZ in cell culture.	164
Figure 4-3. β -gal expression after gene transfer with HD-CAGLacZ and HD- Δ x3LacZ in mdx mouse muscle.	166
Figure 4-4. β -gal expression after gene transfer with HD-CAGLacZ and HD- Δ x3LacZ in nonmuscle tissues.	166
Figure 4-5. GFP expression after gene transfer with LV-CMVGFP and LV- Δ x3GFP in cell culture.	168
Figure 4-6. GFP expression after gene transfer with LV-CMVGFP and LV- Δ x3GFP in cultures of myotubes.	169
Figure 4-7. The activity of Δ USEx3 is more stable than CMV in the context of LV in muscle cell culture.	171
Figure 4-8. Activity of Δ USEx3 and SPc Δ 5-12 in the context of LV in muscle cell culture.	173
Figure 4-9. Activity of muscle-specific promoters after intramuscular injection of mdx mice with LV.	175
Figure 6-1. Optimisation du vecteur adénoviral pour la thérapie génique de la DMD.	199

Listes des tables

Table 1-I. Efficacité de l'intégrase observée en culture cellulaire.	88
Table 3-I. Specificity of integration.	136
Table 3-II. Characterization by PCR of the structure of HD after integration mediated by Φ C31-Int.	139
Table 6-I. Comparaison des outils moléculaires les plus prometteurs pour la thérapie génique.	187

Remerciements

La réalisation de cet ouvrage n'aurait jamais été possible sans le support exemplaire et indéfectible de mes deux co-directeurs de thèse, Bernard Massie et Rénaud Gilbert. C'est pour moi un honneur d'avoir eu deux superviseurs qui ont cru autant en moi. Ils ont mis en place un environnement idéal pour faire de la recherche que ce soit au niveau de leur expertise, du personnel ou du matériel. Je n'ai jamais rien manqué pour effectuer mes travaux. Sans oublier que j'ai eu la chance d'assister à un grand nombre de congrès, grâce à eux, dont les plus importants dans mon domaine de recherche en Amérique du Nord et en Europe.

Je tiens à remercier spécialement Rénaud qui a toujours été là pour répondre à mes questions, discuter (ou s'obstiner) et critiquer positivement mes travaux, et aussi... pour me faire réécrire plusieurs fois mes résumés. Même s'il avait souvent raison, ces échanges ont été pour moi très formateurs, car je crois avoir forgé un bon esprit scientifique grâce à cela. Je lui dois une part importante de ma formation doctorale. Par conséquent, je promets de faire part de la même générosité si j'ai aussi des étudiants un jour.

L'environnement agréable dans lequel j'ai vécu, lors de mes études, est aussi attribuable aux gens extraordinaires que j'ai côtoyés dans le laboratoire ou encore, dans l'institut de recherche. Bien que ces gens fassent un travail exceptionnel, ils savent aussi profiter de la vie en dehors du travail. J'ai passé d'agréables moments avec eux dans le laboratoire et en dehors.

Je tiens à remercier ma famille proche : mes parents (et le compagnon de vie de ma mère) et ma petite sœur pour leurs encouragements. Ils m'ont redonné confiance dans les moments plus difficiles. Je tiens également à remercier tous les membres de ma famille au grand complet pour l'intérêt qu'ils portent à ce que je fais et leurs encouragements.

Avant-propos

Les avancées en recherche des vingt-cinq dernières années laissent penser que bientôt, la thérapie génique sera envisagée comme un outil de première ligne pour des maladies génétiques héréditaires encore incurables. La thérapie génique implique l'utilisation d'un vecteur (les plus efficaces sont d'origine virale), pour livrer du matériel génétique dans les cellules du corps, dans le but de mitiger une pathologie. L'engouement a repris, ces dernières années en recherche, grâce aux succès obtenus lors d'essais cliniques pour plusieurs maladies telles qu'une dystrophie musculaire de la ceinture de type II (2), l'amaurose congénitale de Leber (une maladie oculaire) (3, 4, 5, 6), l'immunodéficience combinée sévère lié à l'adénosine déaminase (7, 8), l'adrénoleucodystrophie lié à l'X (9) et la maladie de Parkinson (10). D'autres applications sont actuellement examinées pour le traitement de cancers, de maladies infectieuses, l'élaboration de vaccins, etc.

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique, pour l'instant incurable, caractérisée par une dégénération progressive des muscles squelettiques et du cœur. Des mutations, dans le gène codant pour la dystrophine, sont responsables de l'absence de la protéine fonctionnelle au niveau des muscles. Des essais cliniques réalisés chez des patients DMD, ont examiné deux stratégies différentes afin de rétablir l'expression de la dystrophine. Des oligonucléotides rétablissent l'expression de la dystrophine dans le muscle des patients en permettant de sauter un exon muté du gène dystrophine (11, 12). Un autre essai clinique, réalisé avec un vecteur viral, n'a malheureusement pas réussi à exprimer suffisamment de protéine thérapeutique (une version tronquée de la dystrophine) pour compenser pour les mutations du gène de la dystrophine (13, 14). Bien que le but de cette étude n'ait pas été atteint, elle a soulevé des points importants à considérer pour les essais futurs.

L'un des vecteurs, avec le plus de potentiel pour la thérapie génique pour la DMD, est le vecteur adénoviral de troisième génération. Dans cet ouvrage, je vous présente mes travaux de recherche sur l'optimisation du vecteur adénoviral. J'ai développé un nouveau vecteur doté de

la capacité de modifier génétiquement des cellules musculaires de façon permanente et de façon sécuritaire à partir de l'intégrase du phage Φ C31 (*Chapitre 3*). Ce vecteur adénoviral intégratif a beaucoup de potentiel pour la thérapie génique, car contrairement aux autres vecteurs viraux actuellement étudiés, il peut contenir la séquence codante complète pour la dystrophine, en plus des avantages mentionnés plus haut. De plus, sa capacité d'intégration permet d'exploiter une approche par thérapie cellulaire. Cette dernière consiste à traiter des cellules provenant du patient et à les modifier génétiquement pour qu'elles expriment une version corrigée du gène de la dystrophine. Des myoblastes ou d'autres cellules myogéniques, traitées par le vecteur, pourraient être alors greffées chez le même patient et rétablir l'expression de la dystrophine dans les muscles.

Les promoteurs spécifiques aux tissus sont de plus en plus employés dans le domaine de la thérapie génique puisque ceux-ci sont plus stables pour l'expression génique par rapport aux promoteurs viraux et ubiquitaires. L'expression tissu-spécifique permet de réduire la réponse immunitaire, ce qui réduit la toxicité induite par une expression incontrôlée du transgène. Un deuxième volet de ma thèse est l'étude de la régulation d'un promoteur musculospécifique (*Chapitre 4*) très prometteur pour la thérapie génique. Bien connaître comment se comporte le promoteur, particulièrement dans un vecteur viral, est une étape nécessaire avant son utilisation en thérapie génique. Le but étant de produire efficacement des protéines thérapeutiques telles que la dystrophine dans les muscles. La combinaison, entre un vecteur adénoviral intégratif et un promoteur musculospécifique, sera certainement très avantageuse pour la thérapie génique.

J'espère que lorsque vous lirez cette thèse, vous partagerez mon intérêt pour la thérapie génique. Je souhaite également vous convaincre que mes travaux sont importants pour le développement de vecteurs plus efficaces encore que ceux actuels, pour la thérapie génique, dans le cadre de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Chapitre 1

1 Introduction

1.1 *Le muscle squelettique*

Son anatomie depuis le niveau macroscopique jusqu'au niveau moléculaire est présentée à la *Figure 1-1*. Chaque muscle est protégé par une pellicule, nommé *fascia*, constitué de tissu conjonctif. Des adipocytes peuvent s'y greffer leur fournissant de l'énergie sous forme de triglycérides. Sous la *fascia*, se trouve le muscle entouré de son tissu conjonctif, l'épimysium qui est constitué de plusieurs faisceaux. Des vaisseaux sanguins entrent et sortent des muscles suivant le tracé des faisceaux pour les alimenter en nutriments ou les débarrasser des catabolites. Le périmysium entoure chaque faisceau qui regroupe des dizaines de fibres. Chaque fibre est une cellule multinucléée avec une centaine de noyaux en moyenne. Une fibre musculaire peut faire quelques centaines de millimètres en longueur (tout le muscle) et de 10 à 100 μm en diamètre. La fibre est entourée par une gaine de tissu conjonctif appelé endomysium qui regroupe les fibres ensemble et les solidifie entre elles. Directement en contact avec les fibres, se trouve une fine lame basale composée de la laminine 5 et du collagène IV. Aux extrémités de chaque fibre, on retrouve des jonctions adhérentes impliquant une dizaine de protéines, incluant la vinculine, la taline, la caténine et la N-cadhérine permettant une liaison forte du cytosquelette à la fibre suivante. Sur la surface latérale des fibres, on retrouve une série d'attaches, les costamères, connectés à la fois au cytosquelette, à la membrane et à la lame basale (15). La présence d'autant de points de contact avec la lame basale pourrait permettre le transfert de l'énergie contractile de la fibre au faisceau.

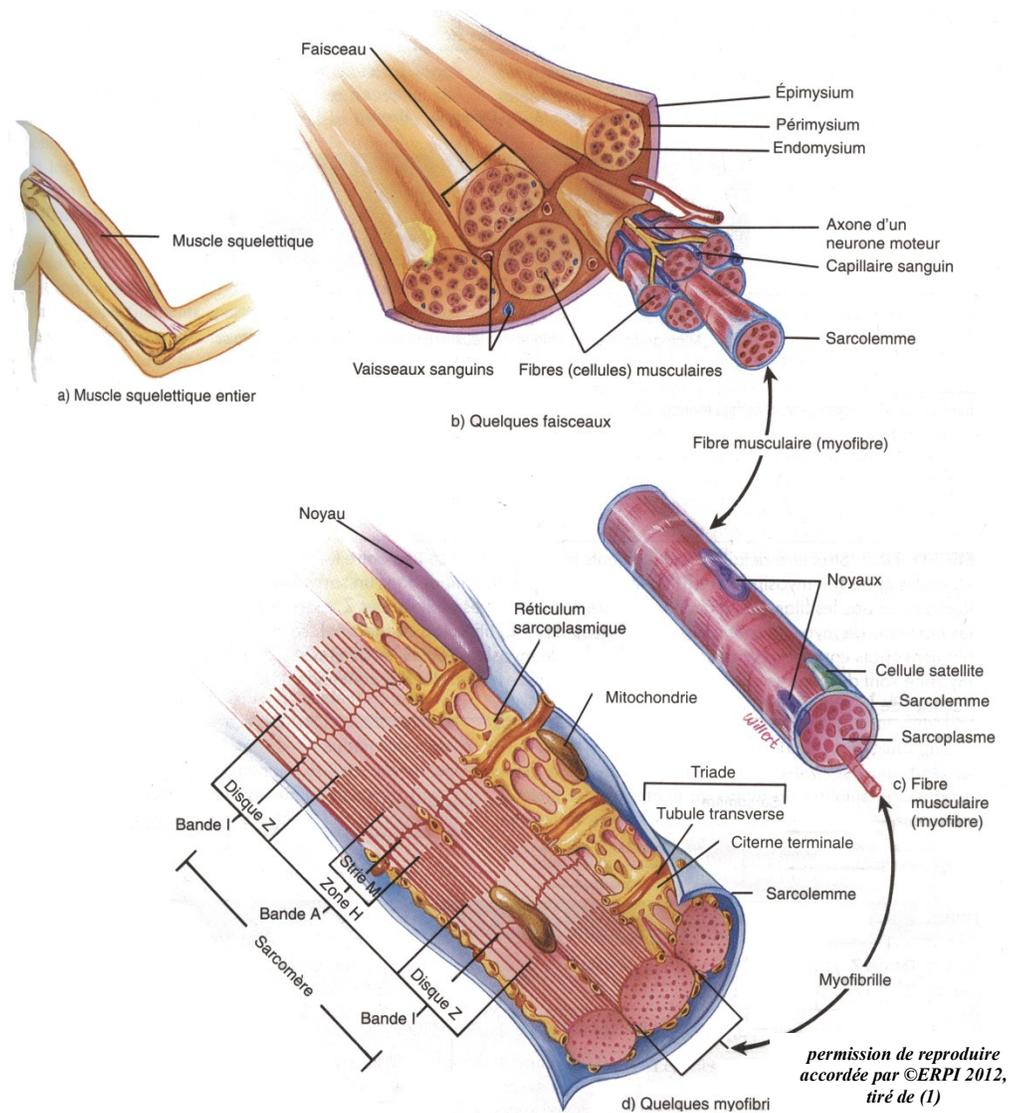


Figure 1-1. Organisation d'un muscle squelettique depuis le niveau macroscopique jusqu'au niveau microscopique.

Le muscle squelettique est un organe bien protégé par du tissu conjonctif. L'épimysium et le périmysium entourent un paquet de faisceaux de fibres. Chaque faisceau est entouré par l'endomysium, un autre tissu conjonctif. Une vascularisation importante est retrouvée à l'intérieur et à l'extérieur des faisceaux. Les fibres sont innervées chacune par un seul neurone moteur. Une lame basale, la véritable niche des cellules satellites, entoure chaque fibre (non représentée). Notez que les noyaux sont à l'intérieur des fibres et que les cellules satellites sont à l'extérieur. Le sarcolemme est la membrane plasmique qui entoure les fibres. Un sarcomère est également représenté avec ses différentes stries et bandes.

La lame basale sert de guide pour que la connexion se fasse entre le motoneurone et la fibre musculaire. Ce site d'échanges de signaux chimiques s'appelle une jonction neuromusculaire. La lame basale supporte une matrice extracellulaire, où plusieurs protéines typiques du tissu conjonctif (voir plus haut) sont enchevêtrées. La laminine interagit avec la membrane des fibres via un complexe de glycoprotéines (16). La membrane des fibres, aussi appelée sarcolème, est juste sous cette lame basale et la matrice extracellulaire. Gravitant autour de la membrane, se trouvent les cellules satellites musculaires (voir la section **1.3.1**) qui assurent la régénération du muscle. Les noyaux, les mitochondries, les réticulums sarcoplasmiques et d'autres organelles se situent à la périphérie membranaire des fibres, dans l'espace appelé sarcoplasme, tandis que les myofibrilles sont au centre. En longitudinale, les myofibrilles sont positionnés de façon parallèle dans toutes les fibres, ce qui donne une apparence striée aux muscles (15).

1.1.1 Le sarcomère, l'unité fonctionnelle du muscle squelettique

Une illustration du sarcomère est présentée à la *Figure 1*. Des stries et différentes bandes peuvent être visualisées au microscope électronique à cause de leur densité respective. Les bandes I et H, sont des régions claires qui peuvent se contracter. Elles sont renforcées par des contacts avec les protéines de jonctions (strie M) et les costamères (disque Z) (15). Puisque les myofibrilles sont cordées parallèlement et alignées, elles se contractent, en concert, maximisant la force de contraction.

Des filaments épais, constitués d'environ 350 molécules de myosine enchâssées, sont positionnés au niveau de la bande A. S'élançant du disque Z, des filaments minces d'actine filamenteuse (actine-F) servent de points d'appui aux têtes de myosine. On retrouve également des élastines comprenant la géante nébuline (600-900 kDa) qui stabilise principalement les filaments minces. Une plus grosse protéine encore, la plus grande connue, la titine ($\leq 4,2$

MDa), consolide les deux types de filaments au sarcomère pendant le repos et lors des contractions (pour revues, voir (17, 18)). La présence et/ou la fonction de plusieurs autres résidants ne sont pas encore connues.

1.1.2 Les types de fibres musculaires

Pour un marathonien ou un sprinteur, les deux ont besoin de muscles, mais les fibres sollicitées sont différentes. La différenciation des fibres s'effectue lors du développement embryonnaire, mais aussi plus tard. Plusieurs facteurs de croissance, incluant l'hormone de croissance IGF-1, la myogénine, la myostatine, la testostérone et le cortisol peuvent réguler la prolifération, la différenciation, la transcription et la croissance. Les fibres musculaires sont classifiées en différents types principalement en se basant sur l'isoforme de la chaîne lourde de la myosine exprimée. Celles de type I sont lentes à se contracter. L'isoforme de la chaîne lourde exprimé dans ces fibres prend plus de temps pour hydrolyser l'ATP que d'autres isoformes présents dans les fibres rapides. Bien que cet isoforme soit exprimé majoritairement dans ce type de fibre, il n'y est pas exclusivement présent (19).

D'autres protéines, comme la troponine I lente (*TnI_{slow}*), sont aussi spécifiquement exprimées dans les fibres lentes (voir la section **1.8.3**). Ces fibres sont également riches en mitochondries et en myoglobine leur donnant un aspect rougeâtre. Elles sont particulièrement efficaces en aérobie. La myoglobine, un transporteur musculaire du dioxygène, fournit une réserve de dioxygène pour la respiration (pour revue, (20)). Les fibres lentes permettent un effort sur une longue période de temps grâce à la combustion hautement énergétique des triglycérides. Les muscles des marathonien sont riches en fibres lentes. À l'exception près des fibres IIa qui s'apparentent plus aux fibres de type I, les fibres de type II (incluant aussi, b et x) se contractent plus rapidement, se fatiguent plus rapidement et consomment plus d'ATP que les types I. Le glucose sanguin, issue du glycogène hépatique ou musculaire, est la principale

source d'énergie anaérobie pour fournir rapidement de l'énergie aux muscles, lors d'un sprint, par exemple (21).

1.1.3 La régénération musculaire

Suite à l'effort, des dommages aux fibres musculaires surviennent, détruisant ainsi l'intégrité des fibres. Le processus conduisant à la réparation est étonnamment complexe et encore mystérieux. À l'échelle de la fibre, les brisures de la membrane et du réticulum sarcoplasmique augmentent le flux d'ions calcium intracellulaire. Dans les fibres endommagées, il y a une forte diminution de la protéine dystrophine au sarcolemme (décrite plus loin), mais aussi une baisse de plusieurs protéines associées (22). Les dommages induits aux muscles par l'exercice stimulent l'activité de protéases, activés par le calcium, dont certaines peuvent dégrader les myofibrilles endommagés (23). Au moins 6 heures après l'exercice chez le rat, l'activation de la caspase 3 et les protéines proapoptotiques (Bax et Bcl-2) et des noyaux apoptotiques (avec ADN fragmenté) sont détectés dans le muscle (22).

Dans la première heure suivant l'exercice, un groupe de phagocytes, les neutrophiles, sont déjà à l'oeuvre dans le muscle (24). Ils aident les protéases cellulaires avec la destruction des débris en relâchant des superoxydes produisant des radicaux libres en grande quantité. On ne comprend pas tout sur l'utilité de ces radicaux libres qui peuvent aussi s'attaquer indistinctement aux fibres saines (pour revue, (25)). De plus, il n'est pas clair si les dommages collatéraux pourraient amplifier la réponse inflammatoire.

Vient ensuite le recrutement progressif de macrophages, quelques heures après (26). Les macrophages, aidés par les neutrophiles, éliminent des cellules mortes et débris cellulaires (27). Des cytokines proinflammatoires sont produites dans l'environnement nécrotique (28) et certaines sont transportées dans le sang jusqu'au moins deux jours après l'exercice (29). D'autres invasions successives de macrophages participent à la régénération, à la croissance

des fibres et à la réparation des membranes (30). Parmi ces macrophages, certains aident à régénérer le muscle via l'expression de facteurs de croissance, comme l'hormone de croissance IGF-1. Ils stimulent possiblement la prolifération des cellules myogéniques ou satellites après dommages musculaires (31).

1.1.4 Les cellules satellites musculaires

Les cellules satellites (CS) ont été découvertes en 1961 (32) chez la grenouille par microscopie. L'origine de ces cellules n'est pas complètement élucidée, mais elles commencent à se spécialiser dès les premiers stades du développement embryonnaire (33). Les cellules vont rejoindre le myotome des somites qui se différencie en plusieurs feuilletts. Puis du dermomyotome, les futures CS migrent vers la position des muscles des membres (34) (pour revue, (35)). Des morphogènes guident la migration des CS selon un gradient et le maintien du caractère des cellules souches musculaires durant l'embryogenèse (33, 36) (pour revue, (37)).

Dans le muscle mature, les CS restent quiescentes en périphérie des fibres sous la lame basale (*Figure 1-1*). Des facteurs extrinsèques aux CS régulent leur activité (pour revue, (38)). Le facteur de croissance hépatique HGF (*Hepathic Growth Factor* (39)) et l'activation de la voie des Wnts jouent aussi un rôle dans la sortie de quiescence des CS (40). L'activation de la voie Notch et des Wnts augmente la prolifération des CS (40, 41). Des facteurs de croissance, comme l'hormone de croissance IGF-1 (42) et l'hormone de croissance FGF (43, 44), activent aussi la prolifération des cellules. Des souris âgées répondent moins bien aux stimuli extrinsèques, ayant pour conséquences une perte d'activation et de prolifération des CS (45). L'activité de certaines voies signalétiques, comme la voie canonique des Wnts, est plus importante dans les CS des souris âgées que celles des jeunes (46).

Un grand nombre d'études ont permis de trouver des marqueurs spécifiques pour les CS (regroupés dans (38)). Par contre, un certain niveau d'hétérogénéité entre les populations de CS a été constaté. Cinq bons marqueurs, des facteurs de régulation de la myogenèse (MRF), sont indiqués pour suivre ces populations: Pax7, Myf5, MyoD, Myogénine et Pax3. Ils jouent tous un rôle dans l'autorenouveau et dans le programme de différenciation des CS dans le muscle mature. Le facteur de transcription Pax7 caractérise possiblement le mieux la CS, car il est essentiel dans le muscle adulte pour le maintien et l'autorenouveau des CS (47, 48). Trois modèles, impliquant les MRF, expliquent ces mécanismes et le cycle de vie de la CS, permettant la réparation des muscles pendant toute la vie de l'organisme (pour revues, (49, 50)).

En plus des cellules satellites, il a été montré que d'autres types cellulaires (comme les cellules souches du mésenchyme, les péricytes, les mésangioblastes et les cellules endothéliales) peuvent fusionner aux muscles. Elles sont étudiées dans le cadre de la thérapie cellulaire pour la DMD. À cause de leur capacité à former du tissu musculaire, elles sont appelées « cellules myogéniques ». Ce groupe inclut aussi les CS, engagées à la division active, alors appelées myoblastes. Le sujet des cellules myogéniques sera survolé brièvement dans la section **1.3**.

1.2 La dystrophine et la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD)

1.2.1 Le gène de la DMD

La découverte du gène de la DMD fut une véritable épopée scientifique pour plusieurs équipes de chercheurs (51). Cette histoire est racontée, avec passion par Louis Kunkel, l'un des acteurs principaux de cette avancée scientifique (52). Sur le petit bras p21.2 du chromosome X, se trouve le gène causant la DMD qui a été identifié par clonage positionnel. Avec ses 2,4 mégabases, le gène de la DMD est le plus long connu. La transcription du gène prend environ 16 h (53). Ensembles, les 78 exons (et parfois un 79^e) codent pour un ARNm de 14 kb (54)

comprenant une longue queue non-traduite (3'UTR, ~2 400 - 2 700 pb) chez plusieurs espèces, incluant l'humain. Certaines portions sont hautement conservées et pourraient être le site de mutations entraînant des conséquences pathologiques (55).

La protéine traduite, découlant de l'ARNm, est appelée dystrophine. Avec la longueur du messenger, il n'est pas surprenant que l'isoforme musculaire de la dystrophine fasse la taille gigantesque de 427 kDa ou 3685 acides aminés (56). Une série d'isoformes histospécifiques existe, grâce à l'activation de plusieurs promoteurs internes, à l'épissage alternatif et l'utilisation de plus d'un signal de polyadénylation: Dp427m, Dp427l, Dp427c, Dp427p, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp40. L'isoforme musculaire Dp427m est prédominant dans les muscles squelettiques et le cœur (57) (pour revues, (58, 59)).

Il existe un gène paralogue à la dystrophine codant pour l'utrophine. Celle-ci est (400-kDa et 3432 acides aminés, chez l'homme) présente dans le muscle, mais en plus petite quantité (10 fois moins abondante). Le domaine N- et C-Terminal ont ~78 % de similarité avec la dystrophine et 60 % pour toute la protéine. La surexpression de l'utrophine peut compenser la déficience en dystrophine chez la souris *mdx* (60, 61).

1.2.2 L'épidémiologie de la maladie

Des mutations dans le gène de la dystrophine sont à la source de la DMD. La maladie liée, au chromosome X, présente un caractère récessif, ciblant principalement les hommes. Avec une fréquence d'environ 1 garçon sur 3500 qui naît avec la maladie (62), la DMD est la plus commune des dystrophies musculaires. La dystrophie musculaire de Becker est une forme moins sévère de la DMD, mais elle dérive également de mutations dans le gène de la dystrophine.

Environ le tiers des cas de DMD provient de néomutations spontanées (63), alors que le type des mutations varie selon le sexe des gamètes (64). Le reste des cas, sont historiquement transmis par le patrimoine génétique familial. Dans une cohorte de 1111 patients atteints de la DMD, de la dystrophie musculaire de Becker et d'une dystrophie musculaire intermédiaire, les mutations dans le gène de la dystrophine ont été caractérisées. 42,9 % des mutations retrouvées étaient des délétions, 26,5 % mutations non-sens, 11,4 % des délétions et insertions conservant le cadre de lecture, 11,0 % des duplications d'exons et 8,2 % d'autres mutations (65). Connaître la nature de ces mutations est importante, car au cours des dernières années, des thérapies ciblées (sautage d'exon [voir section 1.4.4.1.4] et réparation de l'ADN avec oligonucléotides) efficaces contre seulement certains types de mutations, ont vu le jour (pour revue des thérapies, (66)).

1.2.3 La structure protéique de la dystrophine

Pour bien comprendre son rôle dans le muscle, il faut à la fois connaître sa localisation, la nature de ses domaines et ses partenaires d'interaction. Dans la fibre musculaire, la localisation de la dystrophine est au niveau du sarcolème: ce qui inclut la membrane plasmique et les protéines encadrées (67). Elle relie le cytosquelette de la fibre à un complexe de glycoprotéines membranaires (sarcoglycanes [α , β , γ , δ , ϵ et ζ] et dystroglycanes [α et β]) servant de point d'ancrage membranaire (pour revue, (60)). Cet ensemble de protéines est, à son tour, attaché à la matrice extracellulaire (lame basale) (voir *Figure 1-2*). En forme de bâtonnet, la dystrophine contient quatre domaines majeurs: le N-terminal, le domaine en bâtonnet, le domaine riche en cystéine (CR) et le domaine C-Terminal (56).

Du côté N-Terminal, une paire de modules en tandem (CH1 et CH2, domaines de liaison au Zn^{2+} riches en cystéines et histidines) forme le sous-domaine ABD1 (*actin binding domain 1*,

(68)). ABD1 lie un isoforme γ cytoplasmique de l'actine F (F pour filamenteuse, (69)). Son expression dans une fibre musculaire est localisée aux disques Z. Plus spécifiquement, l'actine F se situe aux costamères (70, 71) : les structures cytosquelettiques qui relient physiquement les sarcomères (regroupement de myofibrilles) au sarcolème. Puisque la dystrophine lie l'actine F, il est possible que celle-ci s'enrichisse aussi au disque Z, mais cela n'a jamais été démontré. Un deuxième sous-domaine (ABD2), moins étudié et interne à la protéine, permet aussi la liaison à l'actine-F cytoplasmique. L'ABD2 stabilise la polymérisation de l'actine F avec l'aide de l'ABD1. L'un ou l'autre des sous-domaines seuls ne sont pas suffisants pour obtenir cet effet. Ils agissent ensembles pour stabiliser le filament (72).

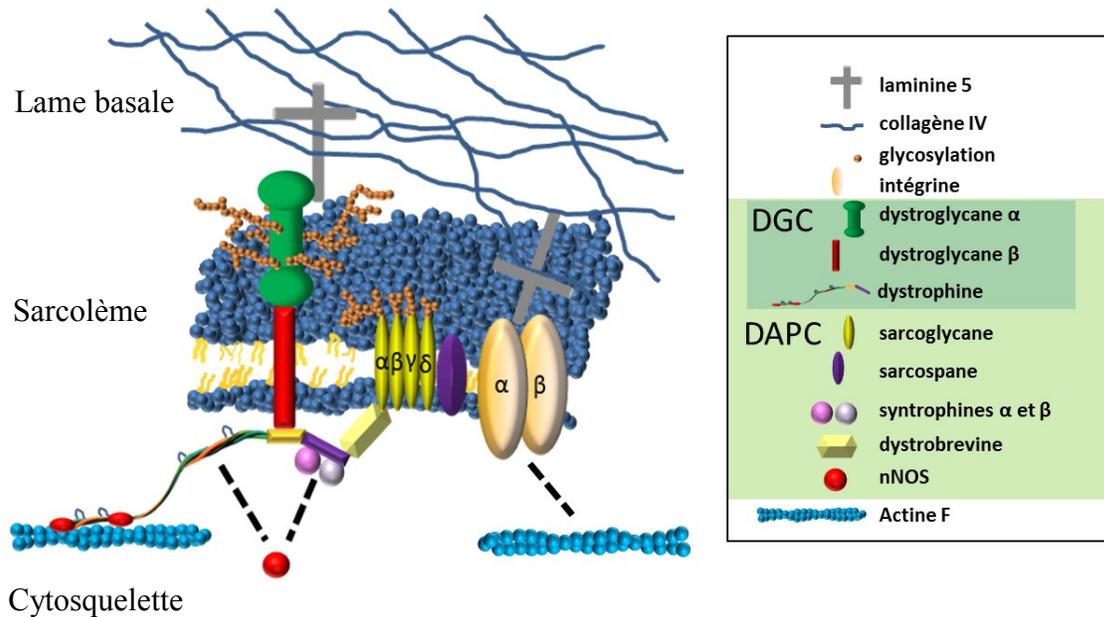


Figure 1-2. Les partenaires de la dystrophine au niveau du sarcolème

La dystrophine fait le pont à la lame basale (via le complexe dystrophine-dystroglycane, DGC) et le cytosquelette par la liaison de l'actine F (via deux sites de liaisons à l'actine placés en N-Terminale). Le domaine CR lie le DGC. Le domaine C-Terminal favorise l'interaction avec les partenaires du complexe de protéines associées à la dystrophine (DAPC, *Dystrophin-associated protein complex*), dont les syntrophines, la dystrobrevine α et nNOS. Les intégrines, comme la dystrophine, sont aussi connectées à lame basale et au cytosquelette via un complexe de protéines spécifiques (non-représenté). Les lignes pointillées indiquent des interactions directes ou indirectes entre protéines. Plusieurs protéines n'ont pas été illustrées pour des fins de clarté.

S'en suit la portion la plus longue de la protéine, le domaine en bâtonnet, avec ses vingt-quatre répétitions homologues à la β -spectrine ou α -actinine. Certaines répétitions sont intercalées par quatre domaines en épingle susceptibles de conférer la flexibilité à la dystrophine (73).

La partie en C-Terminale de la dystrophine est principalement responsable du lien avec le sarcolème. La troisième région CR, riche en cystéines, se subdivise en plusieurs modules ou motifs: deux mains EF (*hand-like*, (56)) ; un WW, avec deux tryptophanes conservés (74, 75) et un ZZ, avec deux domaines à doigts de zinc (76). Le CR (les quatre motifs précédents) et la première moitié de l'extrémité C-Terminale (le quatrième domaine) attachent la dystrophine au β -dystroglycane, le point d'ancrage au sarcolème (77, 78, 79). Le β -dystroglycane, un membre du DGC (complexe dystrophine-dystroglycane ou en anglais, *dystrophin-dystroglycan complex*), joue un rôle crucial dans l'organisation du complexe de protéines associées à la dystrophine (DAPC, complexe de protéines associées à la dystrophine, ou en anglais, *Dystrophin-Associated Protein Complex*) et la localisation de la dystrophine au sarcolème. L'ablation du β -dystroglycane désorganise les protéines du sarcoglycane et efface la présence de la dystrophine au sarcolème, entraînant une dystrophie musculaire chez les souris (80).

Le lien direct entre le domaine C-Terminal de la dystrophine et la dystrobrevine- α a été démontré dans les cellules musculaires. D'autres partenaires tels que la syntrophine- α peuvent aussi s'associer. Cette dernière chapeaute une série d'interactions protéiques, impliquée dans la signalisation cellulaire (section **1.2.5**) et l'intégrité musculaire (pour revues, (81, 82, 83)).

1.2.4 La fonction mécanique et structurale de la dystrophine

Son rôle consisterait à diriger la force mécanique d'une contraction musculaire vers le cytosquelette (84) et limiter la pression sur la membrane qui cède facilement en absence de dystrophine (85). Pour relier, le DGC (le point d'ancrage de la dystrophine) et la matrice extracellulaire, il a été rapporté que le dystroglycane α contient un site de liaison à la laminine de la matrice extracellulaire. L'interaction assurerait le pont entre le complexe et la membrane basale musculaire (86). D'autres partenaires fortement associés à la matrice nucléaire et au DGC existent (87), probablement pour renforcer le contact, mais aussi pour participer à la signalisation (16, 88, 89).

La tension générée lors d'une contraction d'une fibre se propage au travers des sarcomères. Au niveau des disques Z, l'énergie est transmise aux costamères via l'actine F et passe par la dystrophine qui est flexible lorsqu'étirée, grâce à ses domaines en épingle et sa longueur. Par ABD1, ABD2 et ses répétitions basiques (homologue à la spectrine- β), elle pourrait glisser sur le filament d'actine (60). La dystrophine, absorbant beaucoup de tension lors d'une contraction musculaire, redirigerait celle-ci ainsi vers le cytosquelette (84), ce qui limiterait la pression sur la membrane qui devient très fragile en son absence (85). Via son domaine C-Terminal, la dystrophine relie le complexe de glycoprotéines et lui transfère l'énergie restante. À son tour, l'énergie est donnée à la membrane extracellulaire qui bouge suite aux contractions. Ce modèle du rôle mécanique de la dystrophine est appuyé par un nombre considérable d'évidences. La fragilité du sarcolème, des faiblesses musculaires et la nécrose sont toutes des conséquences mécaniques liées à l'absence de dystrophine chez l'humain et chez les souris (60).

1.2.5 Le rôle de la dystrophine dans la signalisation cellulaire

Pour comprendre la fonction de la dystrophine, dans la signalisation cellulaire, il faut s'attarder au DAPC (*Figure 1-2*). La dystrophine lie les syntrophines qui sont des protéines d'échafaudage importantes pour la signalisation. Elles participeraient à l'assemblage d'un complexe signalétique au sarcolème comportant plusieurs protéines comme l'oxyde nitrique synthétase (nNOS, *neuronal Nitric Oxide Synthase*, (90)), la kinase 3 activée par le stress (*stress activated kinase-3*), Grb2 (*Growth factor receptor-bound protein 2*), la calmoduline et d'autres (pour revues, (81, 91)). Parmi ces partenaires, nNOS est fortement exprimée dans les muscles et probablement le plus étudié. L'enzyme catabolise l'arginine-L et produit l'oxyde nitrique (*Nitric Oxide*, NO). La relâche locale du NO, dans les muscles en activité, augmente le flux sanguin (Thomas et al. 1998). Dans plusieurs dystrophies, l'expression de nNOS est diminuée, résultant en une perte de vasodilatation (pour revues, (92, 93)) pouvant potentiellement créer une pénurie en nutriments et nuire à l'élimination des déchets métaboliques. Chez des souris déficientes en dystrophine, la surexpression de nNOS améliore la régénération musculaire (94), ce qui offre une piste thérapeutique intéressante pour la DMD.

1.2.6 La progression de la maladie

La DMD entraîne la dégénérescence progressive des muscles chez le patient. Les premiers symptômes sont ressentis autour de l'âge de trois ans et sont légers. Les mollets hypertrophiés et des faiblesses musculaires occasionnelles sont caractéristiques de la maladie. Somme toute, l'appareil musculaire du patient est fonctionnel dans son ensemble (pour revue, (95)). Certains groupes de patients, les plus sévèrement atteints, peuvent avoir des retards cognitifs (96).

Ce n'est qu'au fil du temps que la condition musculaire du patient dégénère. À l'adolescence, les patients commencent à perdre leur mobilité et leur autonomie. Leurs muscles s'affaiblissent et ils nécessitent un fauteuil roulant pour leurs déplacements. La composition du diaphragme est graduellement remplacée par du tissu fibreux, ce qui entraîne des troubles sévères de respiration, menant jusqu'à l'insuffisance respiratoire. L'intubation et la ventilation des patients prolongent la durée de leur vie jusque dans la trentaine. La dystrophie cardiaque est généralement en place vers trente ans et aggrave la situation pour un grand nombre de patients (pour revue, (97)). Les raisons de l'évolution de la maladie, de la bonne santé initiale à la détérioration du tissu musculaire, sont examinées par plusieurs chercheurs. Pour expliquer la dégénérescence musculaire, une hypothèse en vogue, propose que la déplétion des cellules souches myogéniques au fil du temps réduise progressivement la capacité régénératrice des muscles chez les patients (voir la section 1.2.6.2). Des modèles animaux ont été développés pour étudier ce phénomène, mais aussi dans le but de trouver des traitements pour cette maladie orpheline.

1.2.6.1 Les modèles murins de la DMD

Le modèle le plus étudié est la souris *mdx* issue du pedigree C57BL/10, initialement obtenu à partir d'une mutation non-sens spontanée dans l'exon 23 de la dystrophine (98, 99). Les analyses histologiques d'une série de muscles (couramment étudiés), incluant le *tibialis anterior* (TA), le *gastronecmus* et le *soleus* sont normaux jusqu'à 12 jours d'âge. L'activité enzymatique de la créatine kinase dans le sérum est normale à 20 jours et augmente avec l'âge de la souris pour diminuer ensuite durant la vieillesse (> 200 jours) (100), reproduisant les effets de la pathologie humaine. À 22 jours, des lésions musculaires compromettent l'intégrité sarcoplasmique et des cellules immunitaires envahissent l'espace nécrosé. L'inclusion de tissus conjonctifs et la perte musculaire, particulièrement dans le diaphragme, sont sévères et progressives (101), mais sans contrainte majeure au niveau respiratoire à l'âge adulte (102). Des noyaux centraux sont aperçus dans les fibres. Les dommages s'aggravent, par la suite,

menant à des fibres calcifiées en 40 jours (100). Chez ces souris, on note aussi la présence de fibres *révertantes*, où l'ARNm de la dystrophine aurait retrouvé le bon cadre de lecture. Dans ces fibres on peut noter le retour de la dystrophine localisée au sarcolème. La présence et la stabilité de ces fibres, en absence de correction génique, suggèrent qu'il y a une sélection positive (103).

Il faut toutefois noter des distinctions entre le modèle *mdx* et la pathologie humaine. Leur mobilité n'est pas compromise et leur espérance de vie est seulement réduite de 20 % (Chamberlain et al. 2007). Même après plus de 300 jours, la nécrose musculaire et la régénération musculaire sont encore actives, signe que la pathologie n'est pas aussi sévère que chez l'humain (100). En général dans les muscles murins, on retrouve peu de tissus adipeux et fibreux contrastant avec la DMD (100, 104, 105).

Pour intensifier la pathologie, des souris *mdx* ont été accouplées avec des souris KO pour l'utrophine générant un modèle double KO (106). Celles-ci ont un retard de croissance et une silhouette différente des souris normales et *mdx*. À l'âge de 4 à 6 semaines, les double KO présentent des troubles de respiration et de comportements. La pathologie montre des signes de progression tels que des faiblesses musculaires, une courbature prononcée de la colonne vertébrale et des problèmes articulaires. Malgré une diète enrichie, toutes les souris double KO ont succombé à l'intérieur de 20 semaines, ce qui est significativement plus bas que les souris *mdx*. La compensation amenée par l'utrophine limite l'ampleur de la pathologie chez la souris *mdx*.

1.2.6.2 Le modèle de la déplétion des cellules souches

Les modèles animaux doivent reproduire le plus fidèlement possible la pathologie humaine. Chez le dernier mutant double KO, l'élimination du gène utrophine ne reflète pas l'environnement génétique chez les patients DMD. Malgré l'atteinte sévère des muscles squelettiques, les patients expriment toujours l'utrophine. Il n'est pas clair combien compense l'utrophine pour la dystrophine chez l'humain. Une autre piste, celle de la régénération musculaire, pourrait expliquer la différence de sévérité pathologique entre les deux organismes. Une étude (107) montre que les patients atteints de la DMD ont des télomères quatorze fois plus petits que les individus en santé. Fait intéressant, l'humain a des télomères plus courts que la souris, suggérant que la déplétion des cellules myogéniques est accélérée chez l'homme (108). Basée sur ces évidences, une équipe (109) a croisé des souris *mdx* avec des souris déficientes en télomérase pour obtenir une lignée de souris double KO *mdx/mTR*. Brièvement, la télomérase est une enzyme qui ajoute des répétitions à la fin des chromosomes pour contrer le raccourcissement des télomères lors de la réplication de l'ADN. La télomérase est principalement exprimée dans les cellules primitives, incluant les CS. Elles ont la capacité de se diviser pour régénérer les muscles. Le contexte de la maladie fait en sorte qu'elles sont constamment stimulées à se diviser, d'où l'influence de la télomérase sur la persistance de ces cellules.

Deux générations de souris *mdx/mTR* ont été nécessaires pour raccourcir suffisamment les répétitions terminales dans les gamètes, afin d'observer un phénotype sévère concordant : avec un niveau sérique élevé de créatine kinase, un épuisement rapide à l'effort, une perte de l'intégrité du sarcolème, un grand nombre de fibres positives aux noyaux centraux et finalement, la perte de puissance et de force musculaire. Histologiquement, en plus de la perte de l'intégrité musculaire, le diaphragme et le *gastronecmus* se transforment en tissus fibreux à 8 semaines et contiennent des dépôts de calcium. Sans oublier que les CS présentent un défaut de prolifération *in vivo*. À 76 semaines, le diaphragme est sévèrement atrophié, suggérant que

l'insuffisance respiratoire est la cause du décès prématuré des souris à 48 semaines, l'âge à lequel les souris ont commencé à succomber à leur état précaire.

Cette étude élégante apporte des arguments solides qui démontrent que la longueur des télomères peut influencer la dégénération des muscles dystrophiques. Le rôle des CS et leur épuisement semblent jouer un rôle important dans la progression de la DMD.

1.2.6.3 *Les gros animaux*

Le chien dystrophique *golden retriever* présente beaucoup de caractéristiques de la DMD humaine, incluant un haut niveau de créatine kinase, une atrophie musculaire et des contractions sporadiques. Les muscles renferment la présence de nécrose et de régénération, la formation de dépôt de calcium et de tissu conjonctif musculaire devenant fibreux. Bien que la cardiomyopathie soit souvent la source de leur décès, le diaphragme est aussi sévèrement atteint (pour revue, (110)). Maintenir les colonies de chiens dystrophiques est dispendieux et dispenser des soins éthiquement justifiés aux chiens malades l'est aussi. C'est pourquoi peu d'équipes de recherche utilisent ce modèle. Une autre race de chien, le beagle dystrophique est plus petit et présente une dystrophie plus légère facilitant son élevage. Il présente une cardiomyopathie tout comme le *golden retriever* et l'humain, ce qui en fait un modèle d'étude intéressant (111). D'autres modèles existent, comme le chien japonais Spitz (112), le félin (113), le poisson zèbre (114), mais peu de recherche a été faite sur ces modèles jusqu'à présent.

1.3 La thérapie cellulaire à partir de cellules myogéniques

1.3.1 Les cellules satellites et myoblastes

Les CS et les myoblastes, dérivés de celles-ci, jouent un grand rôle dans la régénération musculaire. Une meilleure compréhension de ces cellules a permis de contourner plusieurs embûches quant à leur utilisation pour la thérapie cellulaire. La *Figure 1-3* illustre cette approche thérapeutique. Des cellules myogéniques ou cellules souches sont d'abord prélevées chez le patient ou chez un donneur. Elles sont alors amplifiées *ex vivo*. Elles peuvent être aussi traitées (modifiées génétiquement pour les cellules malades du patient, voir **1.4.4**). Les cellules sont finalement (ré-)injectées chez le patient pour qu'elles fusionnent aux muscles (ou régénèrent les CS) afin de rétablir l'expression de la dystrophine.

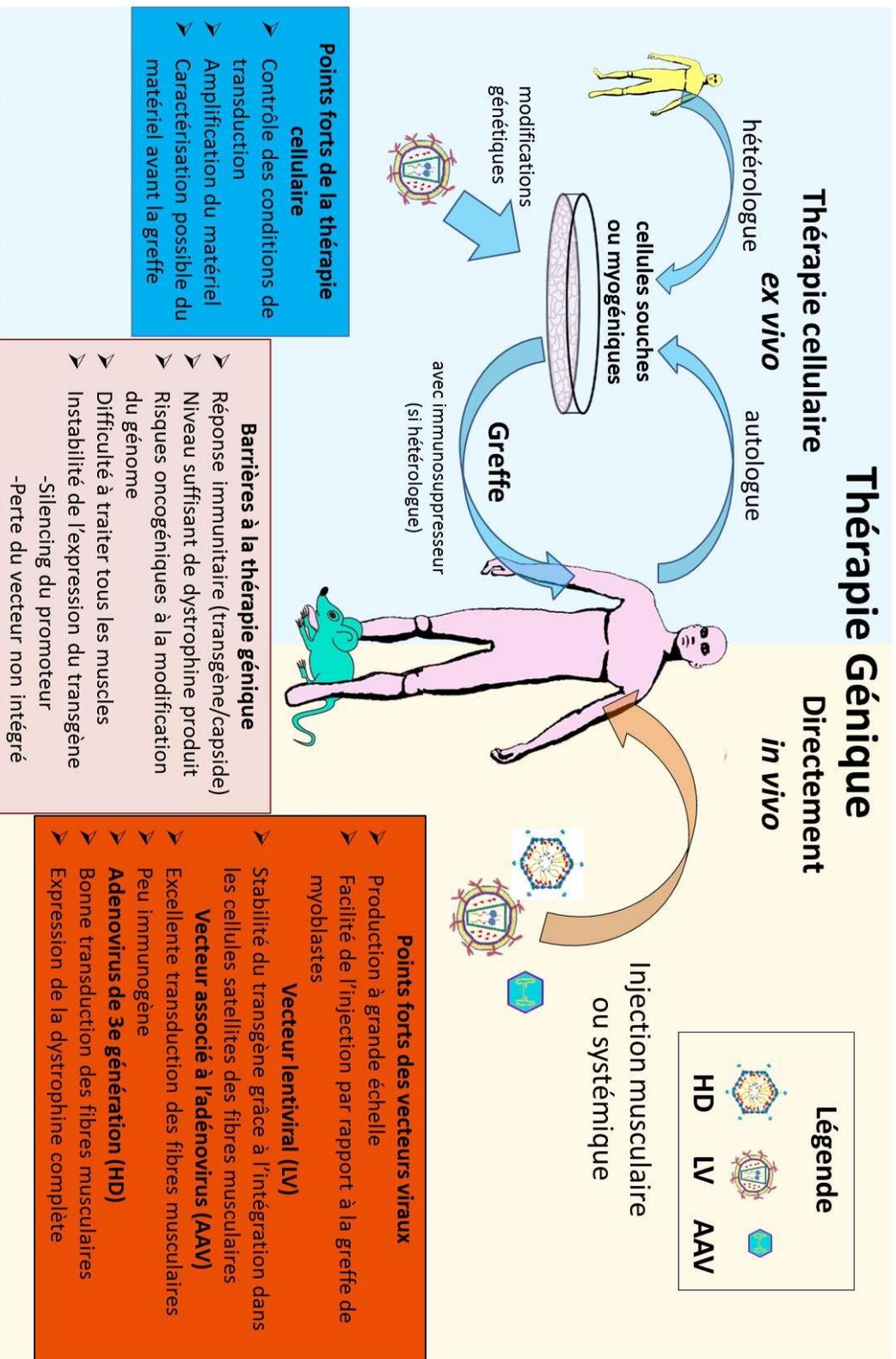


Figure 1-3. Les deux approches thérapeutiques et les difficultés liées à la thérapie génique pour la DMD

Le nombre de CS est faible chez l'homme adulte (115, 116) rendant plus difficile la collecte pour une greffe future. Une vieille étude, chez la souris et le rat, estimait que ~30 à 35 % des noyaux retrouvés dans les fibres, à la naissance, était des CS. Ce pourcentage déclinant à moins de 5 % chez les animaux adultes (117). Chez les patients DMD, ce nombre devrait être encore plus faible avec l'épuisement des CS causé par la régénération continue des muscles. Pour surmonter cette difficulté, le nombre de CS commises à la division active (pour revues, (49, 50)) ou les myoblastes peuvent être amplifiés en culture cellulaire, mais un nombre limité de fois (118).

L'administration des myoblastes *in vivo*, via la route systémique, est inefficace puisqu'ils ne traversent pas l'endothélium des vaisseaux sanguins (119). Cette barrière physique les empêche d'atteindre les muscles. L'injection intramusculaire est préférable, mais elle nécessite l'injection de tous les muscles, car la migration des myoblastes est relativement limitée dans le contexte d'une greffe chez la souris *mdx* (120). D'autres tissus conjonctifs, le périmysium et l'endomysium, limitent la dissémination et la capacité migratoire des myoblastes à l'intérieur des muscles possiblement à cause que les myoblastes n'expriment pas suffisamment d'enzymes modulant la matrice extracellulaire (121, 122).

Dans des muscles de singes, préalablement endommagés à l'aide d'une aiguille, des myoblastes injectés pouvaient migrer jusqu'à 1 cm et semblaient fusionner principalement avec les fibres endommagées (123). Dans cette expérience, il faut noter que les tissus conjonctifs ont été sévèrement perforés et que la solution cellulaire s'échappait régulièrement du site d'injection, fournissant des explications possibles à la mobilité observée des myoblastes dans le muscle. La capacité des myoblastes à migrer reste toutefois un sujet débattu, car les conditions expérimentales entre les études varient énormément.

Des myoblastes, amplifiés *ex vivo*, ont été sujet à une allogreffe (avec donneur) chez de jeunes patients DMD. Cet essai clinique de phase I sur 8 patients a permis d'évaluer l'innocuité du traitement cellulaire sur de petites portions de muscles. Sous immunosuppression, l'injection intramusculaire d'environ 30×10^6 myoblastes, par site, a été effectuée à plusieurs reprises dans une région de 0,25 à 1 cm³ du muscle des patients. Les biopsies montrent 3,5 à 26 % des fibres positives à la dystrophine et ce, quatre semaines postinjection (124). Le groupe a poussé plus loin le protocole d'injection. Chez un patient, l'injection à haute densité de myoblastes (100 à 200 injections par cm²) rétablit l'expression de la dystrophine dans la zone injectée jusqu'à dix-huit mois. Sur 21,5 cm² du biceps *brachii*, les injections multiples ont permis d'améliorer la force du muscle jusqu'à 100 %. Ceci démontre le potentiel thérapeutique de la méthode et son application à plus grande échelle (125).

Plusieurs études démontrent que la culture des CS *in vitro* réduit de plusieurs fois l'efficacité d'une greffe ((126), pour revue, (38)). Des études précliniques récentes, à partir de CS isolées sans passer par des étapes d'amplification, ont donné des résultats encourageants. Parmi ces études, on peut inclure différentes populations de CS. Une population rare et quiescente de CS (~1 % des cellules, ~50 x 10⁴ CS / g de muscle) est dotée d'une capacité de fusion atteignant jusqu'à 94 % lorsqu'injectée dans le muscle (~20 x 10⁴ CS). En plus de restaurer la force contractile du muscle *mdx*, ces CS ont repeuplé leur niche en périphérie des fibres musculaires (127). Une autre étude montre qu'aussi peu que 2 x 10⁴ CS (une population isolée avec d'autres marqueurs) rétablit l'expression de la dystrophine dans plus de 600 fibres chez la souris (126). D'autres études, tout aussi intéressantes, démontrent les aptitudes spectaculaires qu'ont les CS à régénérer les muscles et ce en très faible nombre (128, 129). Dans une étude originale, Collins *et al.* ont greffé une fibre entière à des muscles de souris *mdx* et immunodéprimées. Celle-ci, trois semaines après la greffe, a généré plus d'une centaine de fibres comportant leurs propres CS (130). Les résultats suggèrent que les CS, isolées avec leur niche, gardent leur formidable capacité à régénérer le muscle. Étant donné le pouvoir de régénération qu'a une fibre, il ne serait pas étonnant de voir ce type d'approche employé à plus grande échelle dans les années à venir.

1.3.2 Les autres cellules myogéniques

L'identification de nouvelles cellules dotées de pouvoir myogénique suscite beaucoup d'intérêt en recherche. Face aux difficultés rencontrées avec les CS et les myoblastes, plusieurs chercheurs ont entamé la recherche d'un type de cellule aux caractéristiques idéales : 1) présent chez l'homme et pas seulement dans les modèles animaux, 2) avec un potentiel myogénique, 3) doté de capacité migratoire dirigée vers le muscle endommagé et à l'intérieur de celui-ci 4) facile à isoler et à amplifier selon des standards cliniques et 5) utilisable dans un contexte de greffe autologue (131).

1.3.2.1 *Le transfert de moelle osseuse et cellules souches du mésenchyme*

Des essais de greffe de moelle osseuse ont été tentés chez l'homme avec des résultats en deçà des attentes, avec environ 0,5 à 0,9 % des noyaux des fibres provenant du donneur. Malheureusement, aucun effet thérapeutique n'a été constaté (132). Chez le chien, l'infusion d'une population enrichie en cellules souches hématopoïétiques n'a donné qu'un très faible nombre de fibres positives à la dystrophine et ce, en présence d'immunosuppression (133). Ce type d'approche donne des résultats intéressants seulement chez le modèle murin. Chez les souris *mdx* immunodéprimées, le transfert de moelle osseuse est efficace permettant l'expression de la dystrophine dans jusqu'à 20 % des fibres et ce, 90 jours post-transplantation. Ce fort niveau de greffe a été attribué à la présence des cellules souches mésenchymateuses (MSC, *Mesenchymial Stem Cell*) présents dans la moelle osseuse (134).

La moelle osseuse adulte regroupe des cellules souches du mésenchyme. Les MSC sont progénitrices de plusieurs tissus *in vitro* incluant le muscle squelettique (135). Elles sont relativement faciles à isoler, mais rares avec une fréquence autour de 10^{-6} à 10^{-5} par cellule (136). L'amplification des MSC peut se faire *in vitro* en présence de facteurs de croissance.

Une sous-population de ces cellules a été injectée dans un muscle chez le chien dystrophique. Jusqu'à 2,0 % de fibres étaient toujours positives à la dystrophine deux mois suivant l'injection et ce, en absence d'immunosuppression (137). Un avantage certain des cellules MSCs est qu'elles peuvent traverser l'endothélium des vaisseaux. Bien que les cellules injectées peuvent se disséminer dans plusieurs organes autres que les muscles, jusqu'à 16 % des fibres musculaires contiennent des noyaux provenant des cellules infusées 4 mois postinjection (138).

1.3.2.2 *Les cellules endothéliales et myoendothéliales*

Les péricytes partagent plusieurs marqueurs spécifiques des MSC (139) et ils interagissent avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (140, 141). Ils peuvent être isolés en dissociant les tissus et triés par cytométrie de flux à l'aide de différents marqueurs membranaires. Ils présentent un avantage indéniable sur les myoblastes, car ils peuvent traverser l'endothélium des vaisseaux. Parmi les péricytes, certains expriment le marqueur de cellules souches CD133+ (initialement appelé AC133+, (142)) et peuvent restaurer l'expression de la dystrophine dans les fibres musculaires, en plus d'améliorer la fonction du muscle (143). Certaines de ces cellules expriment des marqueurs de cellules satellites et adoptent la niche des CS, suggérant qu'elles suivent le comportement des CS. Parmi les péricytes humains, on retrouve aussi une population CD133+ dans le sang et le muscle dissocié. C'est aussi le cas chez les patients DMD (144). Lorsqu'elles sont injectées chez le rat, elles améliorent la régénération suite à des dommages musculaires (145). D'autres cellules, isolées à partir de la dissociation d'un muscle, les SMALD+, expriment une déshydrogénase de l'aldéhyde. Elles constituent une population de cellules musculaires aussi dotée de capacité régénérative (146).

Les mésangioblastes sont des cellules associées aux vaisseaux sanguins, identifiées par le groupe de Giulio Cossu et isolées à partir de l'aorte dorsale chez des embryons de souris (147). Actuellement, il y a un débat sur l'origine des mésangioblastes qui pourraient provenir aussi

des MSC, comme les péricytes (131). Chez les *golden retriever* dystrophiques, l'injection intra-artérielle de mésangioblastes de type sauvage rétablit l'expression de la dystrophine chez tous les chiens en présence d'un immunosupresseur. Chez six des 7 chiens traités, la dégénération de l'état de santé a ralenti. Quatre des chiens se portaient bien après 400 jours d'âge comparativement à une espérance de vie d'environ 1 an (148). Étant donné les essais infructueux de transfert de moelle osseuse chez l'homme, on ignore comment une population enrichie de cellules souches (péricytes/mésangioblastes ou MSCs) contribuerait à la régénération musculaire chez un patient DMD.

1.3.2.3 Les cellules pluripotentes induites

Parmi les cellules qui présentent le plus d'intérêt en thérapie cellulaire, on peut compter les cellules pluripotentes induites (iPSc, *induced Pluripotent Stem cells*). Contrairement aux cellules embryonnaires, elles ne soulèvent pas toutes les questions éthiques sur l'usage d'embryons humains. En 2006, Takahashi et Yamanaka ont démontré que des cellules différenciées peuvent être déprogrammées en cellules pluripotentes en induisant l'expression d'un minimum de quatre gènes : *oct3/4*, *sox2*, *c-myc* et *klf4* (149). Ces cellules ressemblent aux cellules embryonnaires (ES): 1) elles expriment des marqueurs de cellules embryonnaires, 2) elles forment des tératomes chez les souris immunodéprimées et 3) une fois injectées dans les blastocystes, elles participent aussi à la formation de l'embryon et de tous ses tissus. Des cellules iPSc ont été différenciées *in vitro* en cellules myogéniques exprimant plusieurs marqueurs des CS. Elles sont capables de se greffer (jusqu'à ~1 % des cellules myogéniques) avec les fibres musculaires endommagées chez les souris *mdx*. La greffe permet de rétablir l'expression de la dystrophine dans un petit nombre de fibres durant au moins 6 mois, suggérant une application de ces cellules pour la thérapie cellulaire (150). Étant donné la découverte récente des iPSc et le manque d'études fonctionnelles, on ignore le potentiel thérapeutique de ces cellules dans les muscles.

1.3.3 Le talon d'Achille de la thérapie cellulaire : l'immunosuppression

L'accumulation de résultats encourageants de différentes études démontre que la thérapie cellulaire fonctionne dans les modèles précliniques et aussi chez l'homme. Les cellules présentées plus haut possèdent chacune des caractéristiques intéressantes qui pourraient servir pour la thérapie cellulaire. D'un autre côté, la thérapie cellulaire est limitée par le fait que la mutation du gène de la dystrophine affecte l'ensemble des cellules musculaires. Pour que la greffe apporte un bénéfice durable au patient, elle doit être allogénique afin de rétablir l'expression de la dystrophine. Dans une étude clinique chez de jeunes garçons DMD, la greffe de myoblastes est très peu efficace en absence d'immunosuppression. Cette étude suggère fortement que pour atteindre des niveaux thérapeutiques de la dystrophine à long terme, la thérapie cellulaire ne peut pas se faire en absence d'immunosuppression (151). D'un autre côté, l'usage d'agents immunosuppresseurs a beaucoup d'effets secondaires (152) et on ignore ces effets à long terme chez les patients DMD.

1.3.4 L'ingénierie génétique des cellules myogéniques

Pour contourner les problèmes liés aux greffes allogéniques, une solution serait de modifier génétiquement les propres cellules du patient. Suivant l'injection, les cellules myogéniques peuvent se diviser activement et réparer les muscles. Il est logique de penser qu'une correction temporaire du gène de la dystrophine serait insuffisante pour avoir un effet durable sur la condition d'un patient. Dans la section 1.5, plusieurs méthodes sont décrites pour stabiliser l'expression d'un transgène et elles pourraient être appliquées pour la dystrophine. L'intégration d'une cassette d'expression dans le génome est une astuce courante permettant l'expression stable d'un transgène. Cette approche est très prometteuse dans le cadre de la thérapie cellulaire pour au moins deux raisons : pour obtenir l'expression à long terme d'un transgène (comme la dystrophine) et la possibilité d'effectuer des greffes autologues sans avoir recours à l'immunosuppression.

1.4 La livraison de transgènes par les vecteurs viraux

Bien qu'il existe des méthodes non virales de plus en plus efficaces et sécuritaires pour livrer des transgènes dans le muscle, les méthodes virales les surpassent généralement en efficacité. Les nouvelles générations de vecteurs viraux sont très sécuritaires et méritent une attention particulière dans les prochaines pages de ce texte. La *figure 1-2* illustre l'approche directe, où des vecteurs viraux sont injectés chez le patient souvent pour exprimer un gène thérapeutique.

1.4.1 Le virus associé à l'adénovirus et ses vecteurs viraux

1.4.1.1 *Le virus associé à l'adénovirus*

Un seul brin d'ADN monocaténaire d'environ 4,7 kb constitue le génome de l'AAV. Celui-ci est enfermé dans une capsidie icosaédrique (20 triangles) d'environ 20 à 25 nm. De la famille des Parvovirinae et du genre des *Dependovirus*, l'AAV est non répliatif et non pathogénique. Seulement trois protéines (VP1, VP2 et VP3) forment la capsidie et leur enchevêtrement est complexe (153, 154). Plus d'une douzaine de sérotypes utilisés en recherche sont issus d'origine humaine ou de primates non humains (155, 156, 157).

Le mieux connu est le sérotype 2 (158). Les protéoglycanes à sulfate d'héparane de la matrice extracellulaire peuvent capturer l'AAV de sérotype 2 (159). Prise dans les mailles d'un filet, la capsidie se retrouve rapprochée de la membrane cellulaire de sorte qu'elle puisse interagir avec des corécepteurs cellulaires, incluant les intégrines qui conduisent à son entrée dans la cellule (160). L'AAV infecte les cellules en divisions actives, mais aussi celles quiescentes, en pouvant entrer dans le noyau, possiblement via un mécanisme similaire à l'adénovirus (161). En plus des deux extrémités inverses répétées et un signal d'encapsidation en 5', seulement

deux gènes sont encodés par le génome viral : *rep* et *cap*, régulés par les promoteurs p5 et p19 et p40. Un schéma de la structure du génome est présenté à la *Figure 1-4*. Malgré la simplicité génomique apparente, l'épissage des transcrits est complexe donnant une gamme variée de protéines. La régulation de la transcription se fait principalement par rep qui agit comme un répresseur ou activateur par sa liaison à une séquence RBE sur l'ITR (162). C'est également rep qui assure l'empaquetage de l'ADN viral dans la capsid. Cette protéine multifonctionnelle intègre de façon site-spécifique le génome viral dans le site AAVS1 situé sur le chromosome cellulaire 19 (163). Le virus se tapit dans le génome dans l'attente d'un stimulus et d'un covirus pour se répliquer. Le virus se réplique très mal seul, mais très bien avec un virus auxiliaire, comme l'adénovirus ou le virus de l'herpès (164).

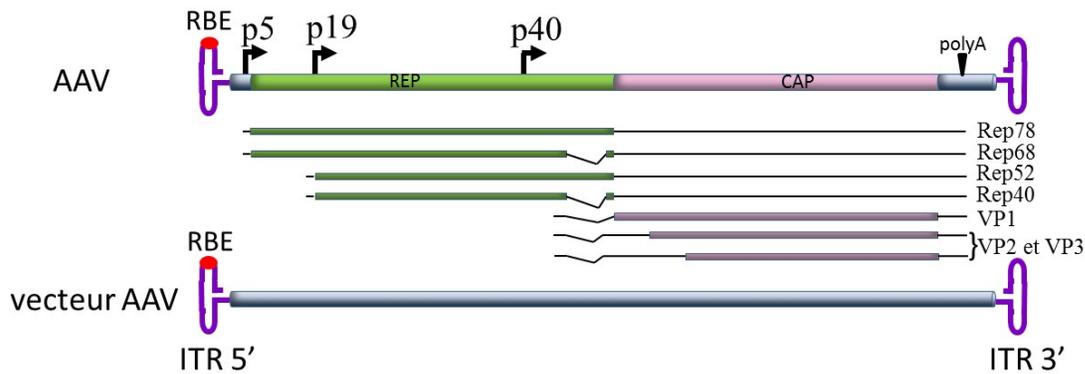


Figure 1-4. Structure du génome de l'AAV

Le génome de l'AAV d'ADN simple brin ne contient que deux gènes *rep* et *cap*. Trois promoteurs (p5, p19 et p40) assurent l'expression des différents produits géniques. Les ARNm sont épissés (lignes brisées) alternativement donnant les 4 isoformes de rep et les isoformes de VP1, VP2 et VP3. Les séquences codantes sont illustrées avec la même couleur que les gènes respectifs. Les ARNm illustrés pour VP-2 et VP-3 sont en réalité le même ARNm sauf que le codon initiateur pour traduire la protéine est différent (mais en phase). RBE : élément de liaison de Rep 78/68 (*Rep binding element*). ITR 5' et 3' : répétitions terminales inverses en forme d'épingle (*Inverted Terminal Repeat*, ITR).

1.4.1.2 *Les vecteurs viraux issus de l'AAV*

La thérapie génique à partir du vecteur du virus associé à l'adénovirus (rAAV, *recombinant adeno-associated virus*) regroupe au total 92 ou 4,9 % des essais cliniques jusqu'en 2012 (165). Les gènes viraux sont supprimés du rAAV, incluant le gène *rep*. Ayant perdu sa capacité de s'intégrer, le rAAV demeure sous forme épisomale dans le noyau des cellules infectées. Des évidences suggèrent que les monomères viraux forment de façon prédominante des concatémères linéaires et aussi, des formes circulaires. Les évidences montrant que l'ADN demeure sous forme épisomale ne semble pas nuire à sa persistance, du moins, dans les cellules quiescentes *in vivo* (166).

Dans une lignée cellulaire permissive, la production du rAAV se fait généralement par une double transfection plus un virus auxiliaire ou une triple transfection, incluant un plasmide contenant les gènes du virus auxiliaire (167). La toxicité de *rep* (168, 169) complique le développement de lignées productrices. Aucune de celles-ci ne dépasse les rendements produits par transfection. À l'échelle manufacturière, il est routinier d'avoir des productions entre $10^{12} - 10^{13}$ de particules virales purifiées par milliard de cellules transfectées et des concentrations de l'ordre de 10^{13} particules virales par mL (170, 171, 172). La capsid du rAAV est assez stable pour permettre sa purification par ultracentrifugation.

1.4.1.3 *La réponse immunitaire*

Chez la souris, le vecteur est bien toléré à long terme et n'entraîne pas, sinon très peu de réponse immunitaire (pour revues, (173, 174). Par contre chez de plus gros animaux, comme le chien dystrophique, l'immunosuppression transitoire est requise au moment de l'injection afin d'éviter une réponse trop forte contre la capsid. L'immunosuppression augmente la persistance de l'expression du transgène (175, 176). Chez l'homme, plusieurs évidences

suggèrent que l'administration du rAAV2 cause de l'inflammation et une réponse cytotoxique, possiblement à cause de la présence d'antigènes reconnus sur la capside de l'AAV2 (177). Le choix d'un autre sérotype (pour revue, (178)), la mutation des épitopes sur la capside (14), l'administration d'immunosuppresseurs ou d'immunomodulateurs (179, 180, 181, 182) et la diminution des doses du rAAV sont tous envisageables pour échapper au système immunitaire. Une autre cause de l'immunogénicité réside probablement dans l'extrémité inverse répétée 5' du rAAV. Possédant une activité *enhancer*, les extrémités peuvent à elles seules conduire à l'expression de polypeptides immunogéniques issus d'un mauvais cadre de lecture. La reconnaissance de ces antigènes pourrait susciter une réponse immunitaire (183) (pour revue, (184)). Il ne serait pas surprenant que les prochaines générations de vecteur AAV soient dépourvues de l'effet de ces *enhancers*.

1.4.1.4 *La thérapie génique contre la DMD*

Plusieurs sérotypes (1, 2, 5, 6, 8, 9) possèdent du tropisme pour les tissus musculaires (176, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191) (pour revue, (157)). L'injection systémique du rAAV permet de transduire l'ensemble des muscles avec une efficacité impressionnante. En une seule administration intraveineuse, il est possible de transduire quasiment tout le coeur (192) ou une bonne partie des muscles squelettiques (193, 194). Toutefois dans les gros animaux, l'introduction d'un gène avec le rAAV est moins efficace, car la barrière immunologique oppose plus de résistance (181).

L'ADNc de la dystrophine (~12 kb) est trop long pour être transporté dans le rAAV. Chez les patients Becker, la dystrophine exprimée dans les muscles est plus courte, car le domaine en bâtonnet est tronqué. La dystrophine est partiellement fonctionnelle, ce qui explique pourquoi leurs symptômes sont légers comparativement aux patients DMD. Le rAAV ne peut transporter que des portions tronquées de la dystrophine et il n'est pas, non plus, assez grand

pour la dystrophine de Becker (environ 6 kb). Certains domaines importants doivent être présents dans la protéine pour assurer les fonctions de base. Le domaine N-terminale et le domaine riche en cystéine sont conservés permettant la liaison à l'actine F (195) et l'attachement au dystroglycane β (196) respectivement. Le domaine en bâtonnet, conférant probablement la flexibilité et la longue portée de liaison à la dystrophine (197), est largement éliminé, de même que des portions en C-Terminale impliquées dans la liaison avec plusieurs partenaires du DAPC. Le choix d'un promoteur assez court est donc crucial dans ce type de vecteur afin de ne pas trop amputer les séquences codantes pour la protéine (par ex: Δ USEx3, voir section 1.8.4).

Une meilleure compréhension de la fonction des motifs sur la dystrophine a permis la construction de microdystrophines de plus en plus efficaces. Des versions minimales de ces courts motifs de liaisons en C-terminal se sont avérées fonctionnelles chez la souris, comme un motif responsable de la liaison à la synthétase neuronale de l'oxyde nitrique (nNOS, (198)). L'expression des microdystrophines a permis de restaurer la localisation au sarcolème de plusieurs membres du DAPC, incluant la dystrobrevine α , la syntrophine α et le complexe dystroglycane associé à la dystrophine. L'injection du rAAV mitige la pathologie au niveau du cœur (192, 199) et dans les muscles squelettiques (194, 198, 200, 201, 202, 203). Chez le chien dystrophique, le rAAV a donné des résultats impressionnants (181, 204). Chez le macaque rhésus, le rAAV a conduit à l'expression d'une microdystrophine dans les muscles des membres (205).

Jusqu'à maintenant, un seul essai clinique a été effectué chez l'homme avec un rAAV contenant une microdystrophine (13). Un sérotype chimérique, entre le 1 et 2, appelé 2.5, a été utilisé dans l'étude clinique. Les essais précédents démontraient un bon tropisme pour le muscle et peu de reconnaissance immunogénique de la capsid. L'expression de la microdystrophine était sous le contrôle du très fort promoteur ubiquitaire CMV. Des biopsies chez quatre patients à 42 jours et chez deux patients à 90 jours ont montrées seulement 4 ou 5

fibres et 1 fibre positive à la dystrophine chez deux patients à 42 jours. Le bilan du traitement fut donc très décevant. C'était donc impossible d'évaluer les effets thérapeutiques de la microdystrophine chez l'homme (pour revue, (206)). Quatre des six patients ont développé des anticorps contre la dystrophine. Les auteurs suggèrent que l'expression de la microdystrophine (étrangère à l'organisme) a suscité une réponse immunitaire contre certains épitopes précis présents sur la dystrophine. De très rares fibres positives à la dystrophine peuvent être retrouvées dans le muscle d'un patient DMD (207, 208). Ces fibres positives, à la dystrophine, proviennent d'un rétablissement du cadre de lecture de la protéine. Il n'y a aucune publication sur le sort de ces rares fibres chez le patient et on ne sait pas si elles pourraient influencer la réponse immunitaire lors du traitement (13).

D'autres possibilités pourraient expliquer l'échec du traitement comme la présence d'anticorps neutralisant contre le rAAV2.5. Même muté pour le rendre moins immunogène, ce sérotype chimérique réagit avec les anticorps pré-existants du patient (14). Un essai *in vitro* avec des monocytes périphérique du sang montre qu'ils réagissent avec certains peptides de la capsid. Ces résultats démontrent que le rAAV2.5 suscite une réponse innée et pourrait expliquer l'inefficacité du traitement (13).

Il faut ajouter que le promoteur choisi (CMV) n'était pas idéal, car il est fort dans plusieurs types cellulaires, incluant des cellules présentatrices d'antigènes (209, 210). Un autre essai clinique avec un promoteur muscle spécifique tMCK (voir la section **1.8.2**), régulant l'expression du sarcoglycane α , montre un bon niveau de transduction chez 2 des 3 patients atteints de la déficience en cette protéine et ce, pendant au moins six mois (2).

1.4.1.5 Une stratégie pour outrepasser la limite de taille

La stratégie vise à augmenter la capacité de transport en utilisant deux rAAV (drAAV, *dual recombinant AAV*) : chacun contenant une portion de la séquence codant la dystrophine pour atteindre au total de 6 à 8 kb. Par un mécanisme de recombinaison *trans*, entre deux génomes de rAAV, il y a fusion du matériel génétique (211, 212). La recombinaison des extrémités répétitives inverses de l'AAV dans la cellule permet cette fusion. Les deux séquences se retrouvent, ensuite, bout-à-bout permettant l'expression d'une protéine plus longue. Cette approche est viable puisque l'efficacité du transfert génique est impressionnante avec l'AAV dans les muscles. Le drAAV a été utilisée pour livrer plusieurs transgènes dépassant la taille d'un seul AAV et ce, de façon efficace *in vitro* et *in vivo*, dans les muscles (213, 214, 215). Les drAAV contenant une dystrophine tronquée (incluant un site de liaison à nNOS en C-Terminal) ont été injectés chez la souris *mdx*. Comme attendus, les drAAV restaurent la présence de nNOS au sarcolème (198). Il faut se rappeler que l'interaction entre la dystrophine et nNOS joue certainement un rôle dans la pathologie (voir la section précédente **1.2.5**, (216)). L'administration systémique d'un drAAV6, dans le muscle de souris *mdx*, permet d'exprimer une minidystrophine (plus longue que la microdystrophine), structurellement très efficace (Δ H2-R19), dans plus de 40 % des fibres (217). Le traitement restaure la présence de plusieurs protéines à la membrane et améliore les paramètres physiologiques, tels que l'inflammation, la résistance des muscles aux dommages, la force musculaire et la masse des souris (218).

1.4.2 Le lentivirus

La grande famille des retroviridae (ou rétrovirus) compte 7 genres, incluant le lentivirus et le rétrovirus γ , tous les deux utilisés comme vecteurs de thérapie génique. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH de sérotypes 1 et 2) est un lentivirus pathogénique chez l'homme. Il a entraîné le syndrome de l'immunodéficience acquise chez près de 34 million de sidéens à travers le monde en 2011 (219). L'humain n'est pas le seul organisme susceptible à l'infection du lentivirus, car il existe des souches chez les félins, les bovins, les équidés, les caprins et les primates. À ce jour, les vecteurs lentiviraux, développés pour la thérapie génique, sont principalement dérivés du VIH-1.

1.4.2.1 La structure du lentivirus et organisation du génome

Le virion mature du VIH-1 fait entre 100-150 nm de diamètre. À l'intérieur de son enveloppe, se trouve une capsidite plus petite d'environ 50-60 nm de diamètre et de morphologie conique (pour revues, (220, 221, 222)). Un génome diploïde, constitué de deux segments d'ARN simple brin de ~9200 nucléotides (220), repose au cœur de la capsidite. Les lentivirus possèdent les trois gènes de base (aussi présents chez les autres rétrovirus) qui sont essentiels à la réplication du virus: *gag* (structure), *pol* (transcriptase inverse) et *env* (enveloppe). La *Figure 1-5* illustre l'organisation génomique du lentivirus et la *Figure 1-6* représente un virion. Le gène *gag* encode un précurseur protéique de 55 kDa qui est clivé en quatre polypeptides : constituant la matrice (MA), la capsidite (CA), la nucléocapsidite (NC, p7). L'ARNm de *gag* produit également un précurseur *gag-pol* de 160 kDa qui partage la portion N-Terminale sur 433 aa. Il arrive que le codon *stop* de *gag* cause un déplacement d'une base du ribosome (cadre de lecture -1) et qu'il continue sa lecture de l'ARN sur 1003 aa (encodé par le gène *pol*) (223). L'autocatalyse du précurseur génère 3 nouvelles protéines : la protéase (PR), la transcriptase inverse (RT, *reverse transcriptase*) et l'intégrase (IN). Le produit du gène *env* est

aussi un précurseur de 160 kDa. Des enzymes cellulaires digèrent le polypeptide en deux glycoprotéines, gp120 et gp41, dont la dernière est ancrée dans la membrane (220, 224).

Le VIH-1 contient d'autres gènes produits par l'épissage alternatif de l'ARN viral. Ils sont *vpu*, *vif*, *vpr*, *tat*, *rev* et *nef*. Les protéines produites complexifient la régulation du cycle viral en permettant une régulation plus fine (220). Le VIH-1 encode 18 protéines identifiées et celles-ci forment au moins 435 interactions protéiques chez l'hôte (225).

D'autres séquences virales importantes agissent en *cis* pour aider la réplication du virus. Les extrémités 5' et 3' de l'ARN génomique sont garnies d'une séquence répétitive longue (LTR, *long terminal repeat*). Les deux LTR du HIV-1 sont identiques en séquence, contenant chacune les régions U5, R et U3. Les extrémités du VIH-1 forment une série de tiges-boucles établissant des sites de liaison pour diverses protéines lors de l'infection. Notamment, du côté 5' il se retrouve une séquence d'encapsidation Ψ de l'ARN viral et un site de liaison à un ARN de transfert de la lysine (PBS). Le site sert d'amorce pour initier la transcription inverse de l'ARN en ADN. On retrouve aussi deux séries de polypurines, l'une centrale (cPPT, *central polypurine tract*) et l'autre canonique en 3' (PPT), en plus d'un signal de polyadénylation dans le U3 (220).

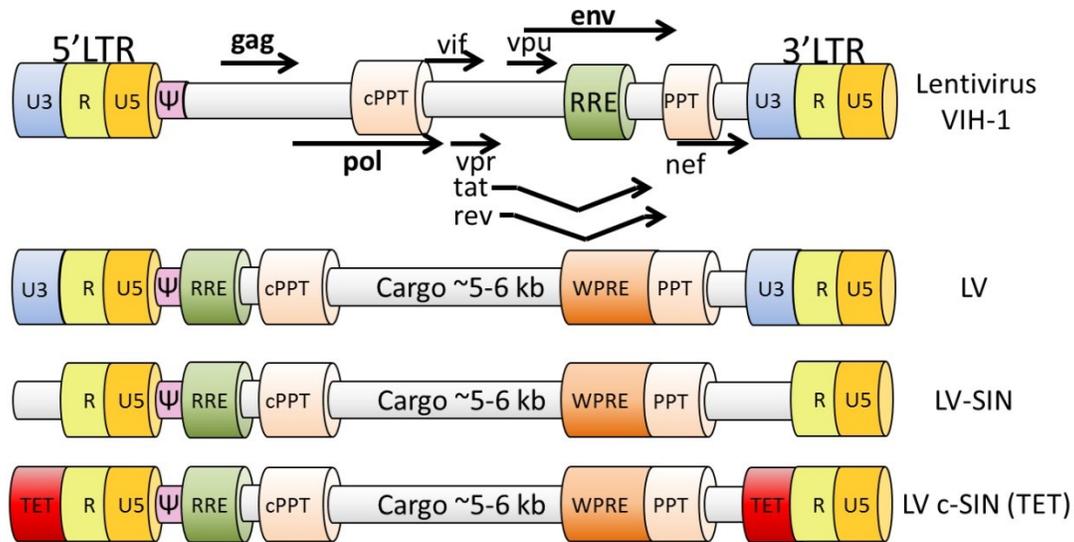


Figure 1-5. Organisation du proADN viral pour le lentivirus et les vecteurs 3^e génération.

Trois gènes principaux (en gras, *gag*, *pol* et *env*) sont essentiels à la réplication du lentivirus. *tat* et *rev* sont également nécessaires pour le lentivirus. Les autres gènes sont accessoires et dispensables pour la réplication virale. La direction des flèches représente le sens de la transcription. Les flèches sont brisées dans le cas de *tat* et *rev* pour illustrer une région enlevée du transcrite lors de l'épissage alternatif du pré-ARNm. Les vecteurs lentiviraux de 3^e génération (LV, *lentiviral vector*) sont tous évidés des gènes viraux. Pour leur production, les gènes viraux sont fournis en *trans* à l'exception du gène *env* (remplacé par VSVg) et de *tat* (en utilisant un promoteur pour initier la transcription du génome viral). Pour le LV-SIN, l'*enhancer* U3 a été retiré. Le LV c-SIN est obtenu en remplaçant la région U3 par le promoteur TET (tétracycline) inductible à la doxycycline. Ce vecteur a été utilisé pour réaliser les expériences à la **section 2.2**. La figure n'a pas été réalisée à l'échelle.

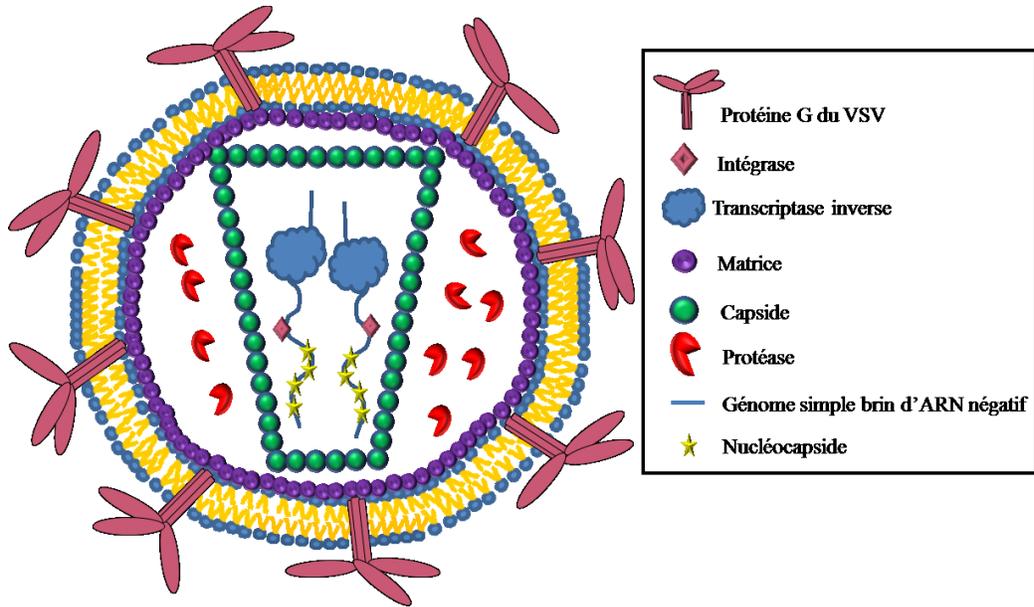


Figure 1-6. Schéma d'un vecteur lentiviral.

L'enveloppe du vecteur est constituée d'une membrane lipidique d'origine cellulaire. Plusieurs protéines à domaines transmembranaires la traverse, dont VSVg, exprimée lors de la production du vecteur. L'espace entre la membrane et la capside contient la protéase virale, utilisée par le vecteur lors de l'entrée dans la cellule. Cet espace pourrait contenir d'autres protéines cytoplasmiques. La capside, en forme de cône ou de bâtonnet, est au centre du virion. Elle protège deux copies d'ARN génomique viral à polarité négative (ne codant pas les protéines). Des protéines essentielles à rétrotranscription et à l'intégration du proADN dans le génome cellulaire sont dans la capside. Une nucléocapside protège le génome viral.

1.4.2.2 Le cycle viral du lentivirus

1.4.2.2.1 L'entrée du HIV-1

Les deux glycoprotéines (gp120 et gp41) produites par le gène *env*, sont toutes deux présentes, sous leur forme mature, dans l'enveloppe du VIH-1. La première reconnaît le récepteur CD4 à la surface de la cellule cible. Une fois attachée, un changement de conformation de gp120 conduit à sa liaison au corécepteur CCR5 et CXCR4, ainsi que sa dissociation avec gp41.

S'enclenche ensuite, un changement de conformation de gp41 vers un état « fusiogénique » qui entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire. Cette action libère la capsidie directement dans le cytoplasme (226). Ce n'est pas la seule voie d'entrée employée par le virus, car celui-ci peut également se faire endocyter (227, 228). Le microenvironnement peut influencer la susceptibilité des cellules à l'infection par des interactions avec des facteurs solubles ou insolubles (comme avec d'autres cellules, (220)). Par exemple, le traitement de lymphocytes T inactifs avec des interleukines peut les rendre susceptibles à l'infection (229). Plusieurs types de cellules de la lignée des macrophages, des cellules monocytes périphériques du sang, certaines population de cellules dendritiques, des lymphocytes CD4+ et d'autres types de cellules sont permissives au VIH-1 (220).

1.4.2.2.2 Le voyage vers le noyau, l'arrimage au pore nucléaire et la rétrotranscription de l'ARN viral

Un marquage de vpr (associée au génome viral) et le traitement des cellules avec un inhibiteur des microtubules démontrent que le coeur du virus voyage via le système microtubulaire. Le trajet vers le noyau se fait dans le sens des dynéines et prend environ 75 min. Une fois rendue, les particules virales s'agglutinent autour du noyau et restent arrimées au pore nucléaire pendant un certain temps (230). Le mécanisme de désassemblage de la capsidie reste une étape nébuleuse. Certains suggèrent que la capsidie est dissociée immédiatement après son entrée dans la cellule tandis que d'autres suggèrent qu'elle est dégradée progressivement ou encore, qu'elle n'est pas dégradée du tout avant d'atteindre le noyau (222). Cette dernière hypothèse est appuyée par une étude démontrant que la rétrotranscription a seulement lieu lorsque la capsidie est intacte et ce, indépendamment de la route d'entrée (231). La rétrotranscription prend à elle seule plusieurs heures. Elle atteint un sommet entre 8 et 12 heures post-infection (232). Cela laisse plus que le temps nécessaire pour que les particules virales s'arriment au pore nucléaire. Lors de la transcription inverse, le site PBS servirait de premier site d'initiation et la cPPT serait un second site d'initiation. Lors de la rétrotranscription, le 5'LTR est remplacé par le

3'LTR identique (pour revue, (233)). Lorsque le complexe de rétrotranscription est mature, il porte le nom de complexe de préintégration (PIC, *preintegration complex*). Le cPPT aide à l'entrée du PIC dans le noyau par un mécanisme encore inconnu. En son absence, le proADN linéaire s'accumule à la membrane nucléaire (234, 235).

1.4.2.2.3 L'importation nucléaire

Le PIC est dépourvue de la protéine CA, mais contient MA, RT, IN, NC et Vpr (220, 236, 237). Étant donné que le diamètre du pore fait 25 nm et s'ouvre jusqu'à 39 nm (238), le PIC, avec ses 56 nm, utilise les navettes nucléo-cytoplasmiques, appelées importines, de la famille des karyophérines. Leur déplétion réduit l'efficacité d'infection possiblement en freinant l'entrée du PIC dans le noyau (239, 240) (pour revue, (241)). Une séquence de localisation au noyau (NLS, *Nuclear Localization Signal*) pourrait permettre l'entrée nucléaire. Plusieurs évidences suggèrent que la protéine CA, ensemble avec la transportine cellulaire Tnp3, seraient des déterminants importants dans le trafic nucléaire du PIC (pour revue, (242)). Toutefois, d'autres protéines pourraient être impliquées (243, 244) (pour revue, (245)). Il a été démontré que l'intégrase interagit avec la nucléoporine 153 (NuP153), une protéine du pore nucléaire, indépendamment du fait que les cellules soient mitotiques ou quiescentes (246, 247), ce qui est cohérent avec l'habilité du lentivirus d'entrer aussi dans le noyau des cellules quiescentes. D'autres partenaires d'interaction ont été trouvés (248, 249, 250). Toutefois, la mutation du NLS de l'intégrase n'empêche pas complètement le PIC d'entrer dans le noyau (226, 251). La recherche sur le mécanisme d'entrée nucléaire continue.

1.4.2.2.4 L'intégration du HIV-1 dans le génome

La majorité de l'ADN proviral s'intègre dans le génome de la cellule hôte, mais plusieurs copies restent sous forme épisomique (pour revue, (252)). L'intégration est une étape essentielle pour conduire à l'expression efficace des gènes viraux (253). L'acteur de l'intégration est l'intégrase présente dans le PIC. En effet, une mutation d'un acide aminé hautement conservé abolit son activité et empêche l'intégration du VIH-1 (254, 255).

Le développement des technologies de séquençage a permis d'identifier à l'échelle génomique des milliers de sites d'intégration pour le VIH-1. Le virus s'intègre préférentiellement dans les unités de transcription de gènes actifs et à l'extérieur des régions contenant des îlots CpG généralement méthylés. Plusieurs observations, dont la récurrence de certains sites, la présence d'un site d'attachement à la matrice nucléaire à proximité du site d'insertion, l'absence d'intégration dans certaines régions et l'intégration dans les régions denses en gènes supportent l'hypothèse que l'ouverture de la chromatine favorise l'intégration (256, 257, 258, 259). Des protéines cellulaires peuvent influencer l'intégrase dans son choix de site. Un de ses partenaires importants est le facteur de transcription LEDGF/p75 (*Lens epithelium-derived growth factor*) qui modifie sa structure tétramérique (260) et qui est essentiel à son activité (261, 262). LEDGF/p75 lie fortement la chromatine et pourrait positionner l'intégrase pour l'intégration (263) (pour revue, (264)). Une déficience en LEDGF/p75 entraîne une réduction de l'intégration dans les unités actives de transcription et elle nuit grandement à l'intégration du virus, et à la réplication virale. Une corrélation positive existe entre les sites de liaison du facteur de transcription et les sites choisis par le VIH-1 pour l'intégration (258, 265). Un mécanisme d'intégration VIH-1 a été proposé sollicitant LEDGF/p75 (264).

Une fois le virus intégré, le programme de transcription virale se met en branle. Plusieurs éléments viraux jouent dans l'activation de la transcription, entre autres, la présence des LTR

avec l'*enhancer* et une séquence activatrice de la transcription dans la région U3. Une structure chromatinienne, incluant notamment des histones et des protéines associées aux nucléosomes, s'installe au niveau du proADN (266).

L'intégration du VIH-1 peut perturber l'expression génique dans l'environnement adjacent au site d'intégration (267, 268). On ignore actuellement le potentiel oncogénique du VIH-1 chez l'humain, mais des évidences (lors d'études *in vivo*) avec des vecteurs viraux dérivés du VIH-1 et rétroviraux, nous en apprennent plus sur comment ces vecteurs peuvent déréguler l'expression génique des cellules (voir les sections **1.4.3** et **1.4.4**).

1.4.2.2.5 L'expression des protéines virales et l'assemblage des particules

L'ARN polymérase II cellulaire produit l'ARN messager qui va servir à la progéniture virale. Lors de la maturation de l'ARN viral, il peut être méthylé sur son extrémité 5'. L'épissage du pré-messager génère différents produits permettant l'expression de protéines distinctes. Pour échapper à l'épissage et s'assurer de l'intégrité du génome parmi la progéniture virale, le HIV-1 utilise sa protéine rev. Celle-ci stabilise l'ARNm viral immature, en liant l'élément de réponse à rev (RRE), en plus d'aider à son export nucléaire (269, 270, 271, 272). La protéine rev n'agit pas seule, mais elle est aidée par une série de cofacteurs cellulaires (273, 274, 275, 276, 277).

L'exportation de l'ARN viral complet permet à la fois l'encapsidation du génome viral, mais aussi l'expression de gag et la fusion gag-pol. La protéine rev est donc importante pour la production virale (278). Les précurseurs gag et gag-pol sont envoyés à la membrane jouant ainsi un rôle important dans l'adressage et l'empaquetage de l'ARN viral (279). Parallèlement, les ARNm épissés servent à l'expression des protéines de l'enveloppe. Celles-ci sont sécrétées

à la membrane. C'est l'endroit où s'assemble la capsid et où se fait l'empaquetage du génome de manière concomitante. Deux copies d'un ARN de transfert de la lysine sont placées sur le site PBS, de chaque molécule d'ARN viral, dans le but d'amorcer rapidement la rétrotranscription chez le prochain hôte. La maturation finale des protéines a lieu à l'intérieur de la particule virale par PR après le bourgeonnement de la membrane. Plusieurs protéines sont présentes dans le virion, dont celles de structure, IN (une copie par génome), RT, PR et des facteurs accessoires (220).

1.4.3 Les vecteurs rétroviraux

Modifié par ingénierie moléculaire, le rétrovirus γ de la leucémie murine (MLV, *murine leukemia virus*) fut l'un des premiers vecteurs viraux (280). Les vecteurs rétroviraux classiques (RV, *retroviral vectors*), issus du MLV, ont conduit aux premiers essais cliniques autorisés en thérapie génique au début des années 1990 (281, 282, 283). Seules les séquences en *cis* du RV, les 5' et 3' LTR, le signal Ψ et le PBS, sont requis pour la production. L'espace libéré permet à des cassettes d'expression d'être transportées. Un RV transportant le gène de l'adénosine désaminase fut utilisé dans les premiers essais cliniques en thérapie génique. Des mutations dans ce gène causent une immunodéficience sévère combinée. Des cellules souches sanguines des patients ont été traitées *ex vivo* par le RV puis, infusées de façon autologue. Le succès de ces premières thérapies fut mitigé et les effets, transitoires. Au début des années 2000, des essais cliniques avec des RV ont guéri des patients. Malheureusement, ils ont aussi conduit à quelques cas regrettables de leucémies (284). L'insertion du RV à la proximité du promoteur et l'activation transcriptionnelle indirecte générée par le 3'LTR (via l'*enhancer*) ont potentiellement conduit à l'expression aberrante du proto-oncogène LMO2 dans les cellules infusées. L'expansion clonale incontrôlée liée à cette insertion pourrait expliquer les leucémies apparues (285). L'intégration d'un élément activateur de la transcription peut influencer l'expression des gènes dans l'entourage du site d'insertion. Pour cette raison, l'*enhancer* en U3 a été enlevé dans les plus récentes générations de RV c-SIN (*conditional Self*

Inactivating, (286)). D'autres modifications ont été apportées pour mieux contrôler l'expression du gène thérapeutique et réduire l'interférence génique des promoteurs internes. Jusqu'en 2012, il n'en demeure pas moins qu'au total, 19,7 % des essais cliniques ont été menés avec des RV (165).

1.4.4 Les vecteurs lentiviraux

Les vecteurs lentiviraux (LV, *lentiviral vectors*) sont de plus en plus utilisés en thérapie génique. Sa capacité d'entrer dans le noyau de cellules infectées (même lorsque la membrane nucléaire est intacte) est certainement un atout pour la thérapie génique (287) par rapport au RV qui doit attendre la rupture de la membrane nucléaire. L'utilisation du LV multiplie le nombre de cibles thérapeutiques. Les tissus différenciés ou les cellules quiescentes (non permissives aux RV) sont susceptibles à la transduction avec le LV. Ceci inclut les cellules musculaires différenciées et les cellules satellites (288).

1.4.4.1 Les nouvelles générations de LV

Plus sécuritaire en comparaison aux RV classiques, le LV cause moins d'interférence sur l'expression des gènes à proximité du site d'intégration. Ceci est dû principalement aux éléments qui diffèrent dans leur LTR (289, 290, 291). Lorsque l'expression d'un transgène est contrôlée par le LTR du LV, les éléments d'activation transcriptionnelle s'inactivent progressivement en réduisant l'expression du transgène (292). Pour réduire davantage l'activité, des LV c-SIN ont été générés (293) (pour revue, (294)). D'autres mutations dans les LTR réduisent davantage l'activation (295). L'interférence génique générée par le promoteur interne peut être restreinte si des insulateurs sont insérés de part et d'autre de la cassette d'expression. Le promoteur interne peut demeurer actif et stable plus longtemps, et augmenter son activité suite à l'usage d'insulateurs (296, 297, 298, 299, 300, 301, 302). Toutefois, ces

séquences doivent être bien positionnées dans le vecteur, car elles peuvent réduire la production de LV (303).

D'autres séquences peuvent augmenter l'expression du transgène. L'incorporation du cPPT augmente la transduction de 2 à 10 fois *in vitro* ou *in vivo* (234, 304, 305, 306). L'ajout d'un élément régulateur posttranscriptionnel du virus woodchuck de l'hépatite (WPRE, *Woodchuck Hepatitis Posttranscriptional Regulatory Element*) stabilise l'ARNm viral et augmente de 4 à 5 fois les niveaux d'expression d'un transgène (307, 308). La présence de rev et de son site d'attachement RRE (sur l'ARN viral) augmente la production du LV (309). Quant à l'ajout de séquences d'attachement à la matrice nucléaire (voir la section 1.5) dans le LV, elles ont des effets minimes sur l'expression du transgène et variables selon le type de cellule (310).

Une étude systématique de la taille d'un LV a permis de situer sa taille optimale à environ 5 ou 6 kb. L'addition de matériel supplémentaire entraîne une chute exponentielle de la production jusqu'à 1000 fois pour une insertion de plus de 18 kb (311). Pour des LV avec de larges insertions de 7,5 à 13,2 kb, il existe un protocole pour les produire (312). Environ 1,6 kb à 2,2 kb de l'espace de clonage est accaparé par des séquences essentielles pour la réplication du LV (pour revue, (313)). L'addition et la position des séquences WPRE, de RRE et des séquences décrites précédemment limitent la taille des cassettes d'expression insérées dans le vecteur. Dans le cadre de la DMD, le LV peut s'accommoder des versions tronquées de la dystrophine, appelées microdystrophines et minidystrophines. L'utilisation d'un petit promoteur permet d'économiser de l'espace au profit d'un transgène plus long ou des séquences qui aident l'expression.

1.4.4.1.1 La production du LV

Seulement les gènes *gag*, *pol* et *env* sont nécessaires à la production de LV, en plus de *rev* et de *tat*. Toutefois, *tat* n'est plus nécessaire si un promoteur (CMV ou RSV (314)) est utilisé pour initier la transcription du génome viral primaire. Le gène *env* n'est pas non plus nécessaire si une autre protéine d'enveloppe est fournie à la place (voir plus loin). Tous les autres gènes accessoires sont dispensables (315). Initialement, les LV étaient générés par la transfection de trois plasmides (316) : un plasmide encodant *gag*, *pol* et *env* (ou un gène encodant une autre enveloppe) et un plasmide pour le vecteur de transfert. Pour augmenter davantage la production, *tat* et *rev* étaient fournies également par un ou deux plasmides (317). Un bon dosage des protéines virales permet d'augmenter la production de LV d'environ 7 à 8 fois (318). Toutefois, l'expression de ces protéines pose un risque théorique (jamais observé à ce jour) (319), car elles pourraient entraîner la formation de virus capable de se répliquer, par eux-mêmes, à partir de séquences virales endogènes au génome cellulaire.

Une bonne efficacité de transfection est primordiale à cause du nombre de constructions plasmidiques employées, compliquant encore davantage la procédure pour des cellules croissant en suspension. L'ajout de suppléments, comme le sodium butyrate, connu pour améliorer l'expression protéique, permet d'augmenter jusqu'à 150 fois la production de LV (320). L'ingénierie des protéines virales, pour les rendre moins toxiques, est une piste investiguée pour aider la production (321). En aval de la production, la concentration peut générer des préparations d'au moins 10^{10} particules infectieuses / mL et se réaliser à grande échelle (322, 323).

Les protéines de l'enveloppe du LV peuvent être interchangeables afin de modifier le tropisme de la particule virale ou altérer ses propriétés physiques. La protéine g du virus vésiculaire de la stomatite (VSVg, *vesicular stomatitis virus g protein*) est couramment employée comme

protéine d'enveloppe chez les LV. Actuellement, aucun récepteur cellulaire n'a encore été identifié pour cette protéine (324, 325). VSVg confère au LV la capacité d'infecter une vaste gamme de tissus, incluant certains types de muscles (326, 327). VSVg donne une grande stabilité à la particule virale, conférant une résistance à l'ultracentrifugation et une solubilité à haute concentration $>10^9$ particules infectieuses / mL en solution (328). Un LV-VSVg a une demi-vie en solution d'environ 10 heures à 37°C, 50 heures à 20°C et 200 heures à 4°C (329). Une meilleure connaissance des propriétés physiques du LV a permis d'améliorer les formulations pour augmenter sa demi-vie et sa production (330, 331).

D'autres protéines virales d'enveloppe ont également été utilisées chez le LV : GP64 (de l'enveloppe du baculovirus) permet une plus grande concentration que VSVg (332), mais elle n'est pas très efficace pour la transduction des muscles (333); Mokola et Ebola sont capables de transduire les muscles et ses cellules satellites (288, 334, 335). Le recours à des anticorps (336, 337) ou des ligands spécifiques (338) peut être employé avec le LV pour cibler un tissu en particulier.

Afin d'éviter la plupart des problèmes reliés à la mise à grande échelle de la production de LV (pour des fins thérapeutiques), des lignées cellulaires d'empaquetage de LV ont été mises au point. Elles contiennent les séquences des protéines virales dans leur génome et certaines ont été adaptées pour proliférer sans sérum et en suspension (314). L'ADN plasmidique, servant de matrice pour le génome viral, est quant à lui transfecté dans les cellules. Cette approche limite à un seul plasmide la transfection. Pour produire un LV à grande échelle, il est possible, à partir d'une petite production, de générer une lignée cellulaire productrice. L'élaboration des lignées d'empaquetage a été laborieuse, au départ, car les protéines virales du VIH-1 (339, 340) et de VSVg (341) sont toxiques pour les cellules lorsque produites en grande quantité. La régulation de l'expression s'est donc avérée nécessaire pour garder un niveau basal très bas de ces protéines dans la cellule. Des systèmes inductibles permettent d'activer l'expression protéique seulement au moment de la production. De tels systèmes ont été construits se basant

sur différents inducteurs, tels que la tétracycline/doxycycline (314, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350), le cumate (314) et l'ecdysone (351, 352). La génération de LV à partir des lignées d'emballage donne des titres comparables à ceux obtenus par transfection (314), mais elles sont beaucoup plus pratiques et robustes comme méthode.

1.4.4.1.2 La thérapie génique *in vivo*

La surexpression de la dystrophine dans les souris *mdx* permet de corriger la pathologie au niveau histologique et physiologique, et ce, sans toxicité apparente (353). Puisque l'ADN codant complet de la dystrophine est trop grand (~12-kb) pour être inséré dans le LV, sans réduire drastiquement sa production (311), des minidystrophines, sensiblement plus courtes, peuvent y être transportées. Des microdystrophines, plus courtes encore, sont capables de mitiger la pathologie au niveau de l'histologie, de l'immunologie et de la physiologie (217).

Une étude comparative de trois protéines d'enveloppe différentes, Mokola, Ebola, du MLV, révèle des niveaux de transduction atteignant 24 %, 5 % et 47 % du muscle murin adulte, respectivement. Le marquage de sections musculaires suggère que LV-Ébola et LV-MLV transduisent efficacement les cellules satellites. Lorsque LV-Mokola, LV-Ébola et LV-MLV encodent une minidystrophine, l'expression s'étend à un grand nombre de fibres chez les souris néonatales, mais également chez les souris adultes avec LV-Ébola et LV-MLV. La minidystrophine améliore la force musculaire et réduit les dommages dans le muscle *mdx* (288).

Quant aux souris néonatales, l'efficacité de transduction est assez élevée atteignant 20 à 25 % des fibres du muscle avec le LV-VSVg. L'expression d'une protéine de fusion, entre la microdystrophine et la GFP, dure au moins deux ans dans le muscle (354). Les cellules

souches musculaires sont aussi transduites *in vivo* (354, 355). L'expression d'une microdystrophine (217) augmente la force musculaire de même que le diamètre des fibres, en plus de réduire les dommages aux fibres dans les muscles de souris *mdx* (354).

Comme alternative aux LV issus du VIH-1, des chercheurs ont développés des LV à partir du virus de l'anémie infectieuse équine. Combinés au VSVg, ils permettent à la fois de transduire la plupart des muscles murins au niveau embryonnaire (356). Le même type de LV peut aussi transduire les muscles adultes (357).

1.4.4.1.3 La thérapie cellulaire

Pour la thérapie génique de la DMD, une approche prometteuse consiste à prélever des cellules d'un patient, les traiter avec un LV *ex vivo*, puis réinjecter les cellules chez le patient. Il y a plusieurs avantages à procéder ainsi. La transduction des cellules est efficace frôlant les 100 % dans plusieurs types de cellules myogéniques (144, 355, 358, 359). Un protocole a été spécialement adapté aux LV et conçu pour la thérapie cellulaire pour la DMD (360). Un avantage potentiel de la manipulation des cellules *ex vivo* est qu'une caractérisation du *pool* est possible avant l'injection chez le patient: par exemples, le séquençage haut-débit des sites d'intégration, les niveaux d'expression génique par micropuce, l'évaluation du taux de croissance et le comportement (capacité à différencier) des cellules. Pour l'instant, les informations obtenues à partir de ces techniques ne permettent pas encore de prédire avec certitude des effets potentiellement dangereux du traitement génique. Toutefois une meilleure caractérisation du *pool* pourrait s'avérer utile, dans le futur, pour contrôler la qualité des cellules injectées chez le patient.

1.4.4.1.4 Le saut d'exons

Le saut d'exon est une stratégie employée pour rétablir l'expression de la dystrophine en court-circuitant le mécanisme d'épissage de l'ARN. Des ribonucléoprotéines, soit des protéines associées à un petit ARN nucléaire antisens, comme l'U7, régulent l'épissage dans la cellule. Le petit ARN antisens confère la spécificité de liaison de la ribonucléoprotéine à l'ARN. Sa séquence peut être remplacée par virtuellement n'importe quelle autre séquence, permettant de cibler des sites choisis, donneurs et accepteurs des exons, et d'autres séquences activant l'épissage (boîte de branchement). Un exon peut être sauté (excisé avec les introns adjacents) en masquant spécifiquement l'un de ces sites à l'aide de l'U7. Par exemple, en masquant le site accepteur d'un exon muté, la connexion à l'exon précédent est empêchée lors de l'épissage. Le site accepteur de l'exon suivant, n'étant pas masqué, fera office de connexion. La combinaison du LV et du U7 est particulièrement intéressante puisqu'elle permet l'expression soutenue de l'U7. Des myoblastes humains traités, avec un LV encodant U7, induisent le saut de l'exon 51 dans 30 % du « pool » d'ARNm de la dystrophine, redevenue dans le bon cadre de lecture. Toutefois, les résultats ont été un peu décevants chez les souris, où peu de fibres étaient positives à la dystrophine 10 semaines après la transplantation de myoblastes (358).

Des cellules CD133+, au potentiel myogénique, ont été isolées du sang (voir la section **1.3.2.2**) et des muscles de patients atteints de la DMD, puis traitées avec un LV encodant U7. La transplantation des cellules CD133+, directement dans les muscles ou par voie artérielle chez des souris *mdx*-immunodéficientes, aide à la régénération musculaire, améliore l'histologie et la force musculaire. Entre 1,6 à 4,4 % de l'aire des muscles étudiés étaient positifs à la dystrophine via l'injection intra-artérielle (144). Ces résultats démontrent la faisabilité d'une telle approche pour traiter la DMD.

1.4.4.1.5 L'expression d'une microdystrophine

Le LV peut livrer une version tronquée de la dystrophine dans des cellules myogéniques. Celles-ci peuvent être amplifiées et être transplantées par la suite (*Figure 1-3*). Dans ces cellules, l'expression d'une microdystrophine, régulée par le fort promoteur CMV, montre des signes de toxicités suggérant que son expression doit être contrôlée avant la différenciation en tissu musculaire (358). Ces données concordent avec les observations faites, suite au transfert de la dystrophine complète dans les myoblastes, avec des plasmides (361). Pour contourner ce problème, un promoteur muscle spécifique de la créatine kinase musculaire a été utilisé réduisant ainsi la toxicité. Les myoblastes, traités par le LV, ont ensuite été transplantés dans le *tibialis anterior* (TA) de souris immunodéficientes. Jusqu'à 45 % des fibres musculaires exprimaient le transgène trois semaines plus tard, ce qui démontre que le traitement *ex vivo* est une option intéressante pour la thérapie cellulaire. Chez les singes, cette méthode est également fonctionnelle, mais elle n'a pas été quantifiée. Comparée à l'injection intramusculaire, l'injection intraveineuse de cellules myogéniques, isolées du muscle et corrigées par un LV, permet seulement à environ 1 % des fibres d'exprimer la microdystrophine provenant des cellules donneuses (362), tandis qu'une technique intra-artérielle augmente ce taux de succès à 5-8 % (363). Un faible nombre, 2×10^4 cellules satellites musculaires isolées, traitées par un LV, puis réinjectées directement dans le TA (sans amplification) conduit à l'expression de la microdystrophine ($\Delta R4-R23$, comprenant le domaine C-Terminal) dans 115 à 126 fibres en moyenne (364).

Pour pallier les problèmes occasionnés par la culture prolongée de myoblastes (baisse d'efficacité de la greffe et nombre limité de divisions), des fibroblastes isolés de souris *mdx* peuvent être cultivés à la place. Deux LV ont été employés : l'un encodant MyoD et l'autre, une microdystrophine fusionnée à la GFP, dont l'expression est régulée par un promoteur musculospécifique. L'expression de MyoD est induite par le tamoxifène au moment voulu et entraîne un changement dans le patron d'expression des gènes. Les fibroblastes se

transforment en tissu musculaire permettant l'activation du promoteur musculospécifique et l'expression de la microdystrophine. Cette approche améliore de plusieurs fois l'efficacité du traitement par rapport aux fibroblastes infectés avec le LV-microdystrophine seul. Plus de 150 fibres du TA sont positives à la microdystrophine-GFP. Par contre, l'efficacité du traitement diminue à 4 semaines (365).

Chez trois chiens, l'injection répétée de cellules souches mésoangioblastiques traitées par un LV, sous le contrôle du promoteur musculospécifique de la chaîne 1 légère de la myosine, a permis d'exprimer une microdystrophine dans 5 à 50 % des fibres, en plus de stabiliser l'expression du sarcoglycane β ($\Delta R4-R23$, (217)). Par contre, les niveaux d'expression ont chuté peu après, soit en même temps que la condition des chiens se détériorait et ce, pour des raisons inconnues. Plusieurs évidences suggèrent que la réponse immunitaire n'est pas en cause. Il est donc possible que le promoteur ait subi les effets du *silencing* (148), un phénomène, aux causes multiples, qui conduit à l'inactivation du promoteur.

1.4.5 L'adénovirus

L'adénovirus (Ad) a été isolé pour la première fois en 1953, à partir des glandes adénoïdes d'un patient (366). Près de 53 sérotypes humains ont été recensés et classés en 7 sous-groupes (A-G) (367, 368). La classification en sous-groupes dépend de plusieurs critères tels que la morphologie (longueur de la fibre), le contenu en guanosines et cytosines, l'homologie des séquences, la mobilité électrophorétique des protéines du virions, la capacité à faire agglutiner les érythrocytes et l'oncogénicité associée. Des recherches intensives sont faites dans le but de trouver de nouveaux sérotypes avec un tropisme intéressant pour la thérapie génique chez l'homme (369). Les premières études sur l'attachement cellulaire du virus ont été faites majoritairement avec les sérotypes 2 et 5. Ceci explique pourquoi ces sérotypes sont populaires en recherche (367). L'Ad2 et Ad5 sont du sous-groupe C. Les adénovirus ont un

génomique constitué d'ADN bicaténaire, linéaire, très compacte et d'une longueur de ~36 kb au centre d'une capsid. Dans les cellules transduites, l'ADN viral demeure majoritairement sous forme épisomale. Il n'encode pas moins de 40 protéines, dont au moins 12, sont des composantes de la capsid (370, 371). Un schéma de l'adénovirus est présenté à la *Figure 1-7*. La complexité de la capsid est impressionnante, car plus de 2700 polypeptides forment une structure icosaédrique (240 trimères d'hexon et 12 pentons pentamériques) correspondant à une masse moléculaire d'environ 150 megadaltons (MDa). Le virus fait une taille de ~90 nm de diamètre pouvant varier selon le type de fibre (pour revues, (372, 373, 374).

1.4.5.1 *De l'entrée du virion dans la cellule jusqu'au noyau*

Brièvement, le cycle viral de l'adénovirus commence lors de la transduction d'une cellule (pour revue, (375)). Ce processus se fait d'abord par la reconnaissance d'un récepteur, soit le récepteur du virus Coxsackie et de l'adénovirus (*Coxsackie and Adenovirus Receptor, CAR*) dans le cas du sérotype 5 (pour une revue des récepteurs, (376)). La fibre trimérique est responsable de la reconnaissance du CAR dans la plupart des cellules (377, 378). Un changement de conformation s'en suit et découvre le motif RGD de la base penton, où est ancrée la fibre. Lorsque rapproché de la membrane cellulaire, le motif interagit avec les intégrines ($\alpha_v\beta_{i,iii,v}$) (379, 380, 381). Après l'action du RGD, le détachement de la fibre de l'adénovirus à la surface cellulaire est une étape précoce du désassemblage de la capsid (382).

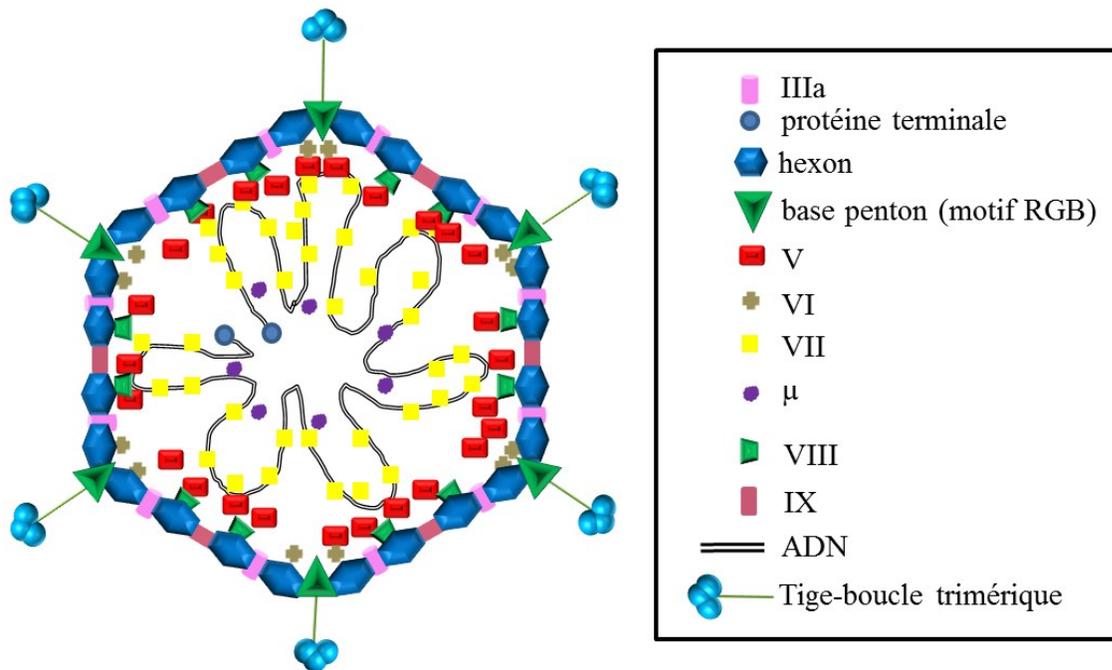


Figure 1-7. Schéma de l'adénovirus ou du HD

La fibre de l'adénovirus est le premier point de contact entre le virion et la cellule lors de l'infection. Suite à la liaison de la fibre avec son récepteur, un changement de conformation permet le contact du motif RGB (sur la base penton) avec les intégrines, ce qui déclenche l'endocytose. L'hexon est la constituante majeure de la capside. La protéine IIIa, VI et IX consolide les interactions et renforce la capside. La protéine V attache indirectement l'ADN génomique viral avec la capside via la protéine VIII. Quant aux protéines VII et μ , elles compactent l'ADN. À chaque extrémité 5' de l'ADN double-brin, une protéine terminale est liée de façon covalente.

L'endocytose s'enclenche avec le recrutement des adaptateurs de clathrine, formant d'abord un puits à la membrane de la cellule. Une vésicule, contenant le récepteur et le virus, se forme et commence son entrée dans la cellule. La vésicule se dirige vers les endosomes, où le milieu devient plus acide (pour revue, (383)). La chute du pH (6.0 pour l'Ad5) est la clef permettant à la capside de s'échapper des endosomes. Le mécanisme précis demeure à élucider, mais plusieurs protéines virales pourraient y participer comme la fibre, la protéase L3/p23, la base penton et la protéine VI. La déstabilisation de l'endosome par des protéines de la capside, la

présence d'un motif de localisation au noyau (NLS), l'activité catalytique de la L3/p23, la signalisation des intégrines, des changements pH-dépendants de la conformation de la capsidie sont tous des mécanismes proposés (384, 385, 386, 387, 388).

Après la lyse de l'endosome, le virus doit se rendre au noyau. À cause de la taille de l'adénovirus (> 20 nm et > 500 MDa) et de la viscosité du cytosol (389) (pour revues, (390, 391)), sa vitesse de diffusion est quasiment nulle. Comme moyen de locomotion, l'Ad utilise les dynéines, via une interaction directe avec l'hexon (392, 393)), pour se mouvoir sur les microtubules vers le noyau. Avec l'hexon, marqué d'un fluorophore, il est possible de visualiser le déplacement de la capsidie virale. Sa vitesse le long des microtubules atteint ~2,6 $\mu\text{m} / \text{s}$ (394) lui permettant de l'atteindre 60 min après l'entrée du virion (393, 395).

Pendant la migration, le désassemblage de la capsidie s'opère, jusqu'à ce qu'on retrouve seulement quelques protéines du cœur de la capsidie: la protéine VII, l'hexon et la protéine terminale. Pour se désassembler complètement, la capsidie de l'Ad2 doit se fixer au pore nucléaire. Pour se répliquer, l'ADN viral doit être transloqué au noyau. Certaines évidences suggèrent qu'un motif sur l'hexon pourrait interagir directement avec des histones H1 nucléaires. Des importines reconnaissent le NLS de l'histone H1 et importent le complexe ADN viral-protéines dans le noyau (396). Le mécanisme de translocation n'est pas entièrement compris et des variations entre les sérotypes doivent exister, car il y a peu de conservation des motifs acides identifiés sur l'hexon susceptible d'interagir avec les histones (396). Des facteurs cellulaires comme NTF2, Ran (GTPase) et HSC70 jouent aussi un rôle sur le désassemblage de la capsidie et/ou sur l'importation de l'ADN au noyau (397).

1.4.5.2 Les divisions du génome

Le génome de l'adénovirus est divisé en régions (*Figure 1-8*, pour revue, (398)). L'activation des gènes précoces (*early*) démarre le programme de réplication. Ces gènes sont exprimés à partir de cinq unités de transcription : *E1A*, *E1B*, *E2*, *E3* et *E4*. Trois autres unités de transcription précoces sont activées avec un retard, soit les *IX*, *IVa2* et *E2* tardif. S'en suit avec l'unité majeure de transcription tardive (*major late promoter*, MLP) qui produit 5 familles d'ARNm (L1 à L5), toutes transcrites par l'ARN polymérase II cellulaire. Le programme de réplication n'est pas étanche, car certains ARNm viraux sont tout de même exprimés à un bas niveau dès le début de la réplication (220).

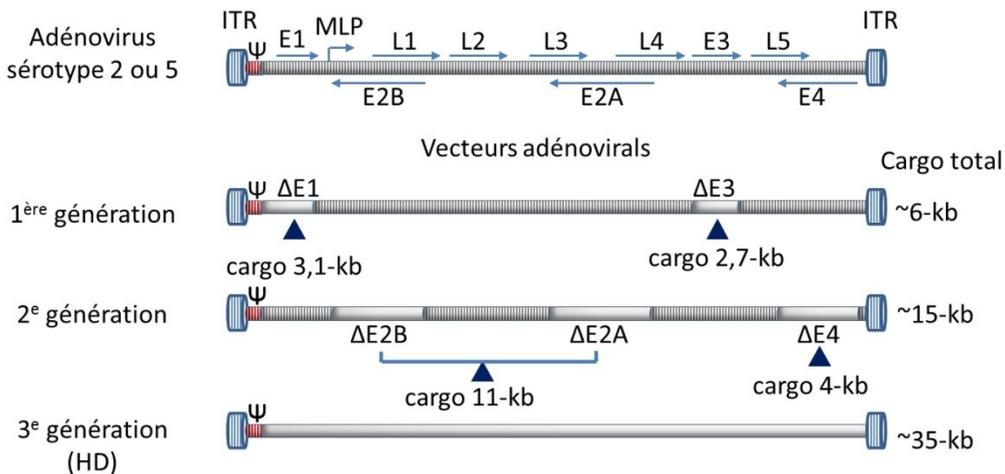


Figure 1-8. Schéma des génomes de l'adénovirus et de ses vecteurs dérivés.

Le génome de l'adénovirus est caractérisé par quatre régions précoces (*early*) E1, E2, E3 et E4. La région E1 est particulièrement importante puisqu'elle encode la protéine E1A, le grand maître d'orchestre du cycle de réplication virale. Son ablation rend le virus déficient pour la réplication, mais elle peut être complétée *in trans* pour la production de vecteurs. Cinq autres régions sont transcrites tardivement (L1 à L5). Trois différentes générations de vecteur ont été développées successivement possédant un cargo de plus en plus grand. MLP : promoteur majeur tardif, *Major Late Promoter*. Ψ : signal d'encapsidation. Δ : région supprimée. La figure n'est pas à l'échelle et certains détails manquent pour des fins de clarté.

1.4.5.3 *Les étapes de la réplication*

Le programme de réplication de l'adénovirus est séquentiel. La première phase est d'inciter les cellules à entrer en phase S pour faciliter la réplication de l'ADN viral. Les protéines E1A et les produits des gènes E4 permettent de créer un environnement optimal à la réplication virale. En réponse au virus, la cellule réplique par le déclenchement de l'apoptose cellulaire. Pour contrer l'apoptose, un environnement non propice à sa réplication, le virus use de plusieurs stratégies comme en régulant le niveau de p53, en inhibant les protéines proapoptotiques, en se dérochant des lymphocytes T cytotoxiques et en supprimant l'expression des cytokines. La dernière étape est de répliquer le génome viral et de produire les protéines structurales nécessaires à la formation des capsides (220).

1.4.5.4 *Une brève description des fonctions de E1A*

Une protéine mérite un peu plus d'attention que les autres dans le cycle de réplication viral. C'est la protéine *E1A* qui est l'une des premières produites et elle est essentielle à la réplication. Elle possède au moins 5 isoformes, dont les plus gros (289R et 243R) sont majoritaires et possèdent des fonctions diverses (pour revue, (399)), incluant la liaison à plusieurs facteurs de transcription via ses domaines conservés (N-Terminal, CR1-CR4). *E1A* ne lie pas l'ADN, mais elle est le coeur d'un réseau de connexions entre les protéines cellulaires, dont plusieurs facteurs de transcription (400, 401). La régulation transcriptionnelle, via son CR3, permet de transactiver les gènes précoces *E1B*, *E2A*, *E2B*, *E3*, *E4* et d'autres protéines du virion. L'interaction de *E1A* avec pRb libère le facteur de transcription E2F, facilitant la transition G1/S du cycle cellulaire (402) (pour revue, (403)).

1.4.5.5 *Des fonctions importantes de E1, E3, E4*

La région E1B encode deux protéines antiapoptotiques. E1B-19k inhibe l'action de protéines proapoptotiques de type Bcl2 comme Bax et Bak. E1B-55k et l'E4orf6-25k conduisent à l'ubiquitination du facteur de transcription p53 et à sa dégradation (404, 405). Les cadres de lectures ouverts de la région E4 encodent des protéines ayant des actions variées, dont la

plupart module la transcription (dimère E4orf6/7) et la traduction (E4orf1/4), influence l'export nucléaire des ARNm (E1B-55k et E4orf6), la réplication de l'ADN (E4orf3 et E4orf6) et l'apoptose (E4orf4) (220). Une autre fonction est attribuable aux régions E4orf3 et E4orf6. Les deux protéines encodées forment un complexe et inactivent des composants clefs de la machinerie réparatrice des brisures double brins (406).

1.4.5.6 *La réplication et la région E2 précoce*

La réplication du génome viral se fait via la polymérase virale (région E2) de 5' à 3' (407), dont l'expression est régulée par le facteur de transcription E2F. En 5', la protéine terminale est associée de façon covalente à l'ADN et fournit l'amorce nécessaire à la réaction de polymérisation. Un modèle en deux étapes de polymérisation de l'ADN a été proposé (408). La polymérisation du nouveau brin à partir du brin matrice déplace le brin inutilisé jusqu'à ce qu'il décolle. Le brin décollé se circularise via les ITR et se repolymérise, avec l'aide de la protéine terminale, comme amorce. Ces deux étapes peuvent donc être répétées des milliers de fois.

1.4.5.7 *Les protéines structurales*

Au moment de l'activation des gènes tardifs, le promoteur majeur de la transcription tardive est plusieurs centaines de fois supérieures en force (par génome viral) par rapport au niveau initial (220). Des facteurs de transcription cellulaire (MAZ et Sp1), des partenaires de E1A, peuvent activer le promoteur (409). Les protéines encodées par les régions L1 à L5 sont principalement structurales, incluant les polypeptides II (hexon), III (base penton), IIIa, IV (fibre), V (coeur), VI, VII (coeur), VIII, excluant la protéine IX, la μ (coeur) (220). L'assemblage de la capsidie a lieu dans le noyau, où les protéines virales doivent être importées (410). Pour aider le repliement de l'hexon et l'assemblage des trimères, 100K agit comme chaperon moléculaire (411). L'empaquetage de l'ADN dans la procapsidie peut se faire grâce à

la séquence Ψ en 5'ITR du génome viral et les protéines IVa2 (412), 52/55K (L1) (413) et 22K (L4) (414) (pour revue, (415)). La maturation des capsides est prise en charge par la protéase L3/p23 (L3) (416) (pour revue, (417)).

1.4.5.8 *Le détournement de la machinerie cellulaire*

La production de particules virales se fait au détriment de la cellule. L'exportation des ARNm cellulaires est bloquée par E1B-55k et E4orf6 en inhibant l'exportine CRM1 (418, 419). E1B-55k peut également lier l'ARNm de façon non spécifique et interagit avec des facteurs de l'épissage (420). D'autres protéines stimulent le transport des ARNm viraux au cytoplasme au détriment des ARNm cellulaires séquestrés dans le noyau. Dans la phase tardive de réplication virale, environ 20 % des ARNm cytoplasmiques sont viraux (421). La traduction est aussi contrôlée par l'adénovirus. 100K inhibe la phosphorylation de eIF4E, une protéine liant la coiffe des ARNm cellulaires. Son hypophosphorylation empêche l'initiation de la traduction (422, 423). L'unité de transcription tripartite (*tripartite leader, TL*) surmonte cette contrainte en permettant à la sous-unité ribosomique 40S, de sauter de la coiffe au codon d'initiation, sans passer par le processus de balayage de l'ARNm (424). La protéine 100k peut lier directement le produit de transcription du TL et faciliter la traduction des ARNm viraux tardifs (425).

1.4.5.9 *La relâche des virions*

Deux mécanismes principaux semblent impliqués dans la relâche du virus. La protéase L3-p23 peut jouer un rôle dans l'affaiblissement du cytosquelette au moment de la relâche du virus en digérant des kératines (426). Un autre mécanisme dépend de l'ADP (*adenovirus death protein*). L'ADP aide à la lyse cellulaire (427) tardivement lors de la réplication virale (428).

1.4.6 Les vecteurs adénoviraux

Les recherches sur l'adénovirus ont conduit vers l'élaboration de vecteurs adénoviraux contenant moins de séquences virales en échange de plus de capacité de transport (*Figure 1-8*). Il existe trois générations de vecteurs (pour revue, (398)). Pour la première génération (PGAd), les régions E1 ± E3 ont été enlevées. Ce type de virus est non répliquatif en absence de E1A. Ceci peut avoir des avantages pour cultiver les virus *in vitro* en diminuant le risque pathogène lié à sa production. La lignée cellulaire HEK 293 est couramment utilisée pour compléter la région E1A. Elle a été générée à partir de la transfection des régions E1A et E1B de l'adénovirus de type 5 (429). Ces séquences ont transformé les HEK 293 en cellules immortelles. Puisque cette région rend le virus potentiellement oncogénique, son ablation dans le vecteur rend le virus plus sécuritaire pour la thérapie génique.

Dans les lignées productrices de vecteurs adénoviraux, certains gènes utiles à la production du vecteur sont fournis en *trans*. Cette façon de faire est en quelque sorte, un mécanisme de protection pour empêcher la réplication du vecteur une fois chez le patient. Les cellules HEK 293 contiennent les nucléotides 1-4344 (430) de l'adénovirus, ce qui comprend les gènes E1A (essentiel à la réplication), E1B et d'autres séquences (incluant ITR 5' et Ψ). Hors, le vecteur produit contient forcément l'ITR 5' et la séquence Ψ (encapsidation) plus d'autres fragments homologues à la séquence incorporée dans les HEK 293. L'homologie entre le vecteur et la région E1 dans les HEK293 peut générer des adénovirus compétents pour la réplication (RCA) par recombinaison homologue. La présence de RCA doit être sous le seuil établi par la FDA lors d'études cliniques soit $< 1 \text{ RCA} / 3 \times 10^{10}$ particules infectieuses (431). Pour réduire le niveau de RCA, des nouvelles lignées cellulaires ont été générées en intégrant uniquement la séquence de la région E1 sans l'ITR 5' et Ψ (432, 433). Le laboratoire du Dr. Bernard Massie a d'ailleurs généré une lignée cellulaire similaire, les BMAde issues des A549 qui produit des titres viraux comparables aux HEK 293 et ce, en produisant un niveau indétectable de RCA (résultats non publiés). Pour réduire le nombre de RCA produit, une autre technique consiste à

rendre le génome du vecteur trop grand (>105 %) que s'il recombine avec l'ADN intégré dans le génome cellulaire (434).

Pour le vecteur de deuxième génération, en plus des délétions E1 ± E3, les régions E2 ou E4 ont aussi été abolies. L'ensemble de ces délétions pousse la capacité de transport jusqu'à ~14-kb (435) (pour revue (398)). Des essais cliniques ont eu lieu avec le vecteur de deuxième génération (Δ E1-E4) pour rétablir l'expression de l'ornithine transcarbamylase chez 18 patients déficients pour l'enzyme. Malheureusement pour un des patients, une dose de 6×10^{11} particules virales / kg d'un Ad5 s'est avérée létale, 98h postinjection (436, 437). La cause du décès fut associée à une réponse inflammatoire systémique aiguë correspondant à un haut niveau d'interleukines, mais normal pour la cytokine TNF- α . L'autopsie révéla la présence du vecteur dans la plupart des tissus. Selon les auteurs, la cause du décès n'est pas reliée aux gènes viraux encodés par le vecteur de deuxième génération, mais plutôt aux protéines de la capsid. Pourtant, des essais précliniques avec le même vecteur avaient montré son innocuité chez des primates (438, 439), démontrant la complexité du système immunitaire et la limite des essais précliniques. Les vecteurs dérivés de l'adénovirus ont été les plus utilisés en thérapie génique avec 23,3 % des essais cliniques depuis les premiers essais cliniques jusqu'en 2012 (431).

1.4.7 Les vecteurs adénoviraux de troisième génération (HD)

La dernière génération de vecteur adénoviral (appelé aussi *gutless* ou *guttéed adenoviral vector*, *helper-dependent adenoviral vector* [HD] ou encore *high capacity adenovirus*), la troisième, est évidée de tous ses gènes viraux. Seulement deux séquences essentielles, pour la réplication et l'encapsidation du génome viral, sont conservées, soit les séquences terminales inverses de chaque côté (ITR) du génome et le signal Ψ permettant l'encapsidation du virus. La capacité de transport du HD se situe entre 75-105 % de la taille de l'adénovirus, soit entre 28-kb et 36-kb.

Cette limite de taille doit être respectée, car sinon, le vecteur s'encapsidera moins efficacement et le génome sera instable, et propice aux réarrangements (440, 441, 442). Étant donné sa très grande capacité de transport, de l'ADN de remplissage est nécessaire pour atteindre la limite inférieure en taille. Le choix de cet ADN peut affecter la production du vecteur. L'absence de produits géniques exprimés et la stabilité de l'ADN sont deux critères importants pour choisir cet ADN. L'un des premiers HD construits contenait l'ADN du phage Lambda et suite à son injection, il entraîna une réponse immunitaire à cause de peptides phagiques présentés à la membrane cytoplasmique (443). L'utilisation d'ADN procaryotique riche en CpG est particulièrement sensible à la méthylation et peut diminuer jusqu'à 60 fois l'expression du transgène *versus* de l'ADN eucaryotique, utilisé comme ADN de remplissage (444). Inversement, la présence d'ilots CpG dans la séquence codante d'un transgène peut augmenter son expression (445). La présence d'introns de mammifères ou humain semble stabiliser la présence du HD dans les cellules transduites. L'utilisation de séquences d'attachements à la matrice nucléaire, incluse dans l'ADN de remplissage issu du gène HPRT (*Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase*), a amélioré la stabilité dans les cellules transduites et n'a pas stimulé la réponse immunitaire (443, 446). De plus, les 400 pb non-codant en 3'ITR de l'adénovirus augmente les titres du HD (447).

1.4.7.1 *La production du HD*

Puisque le HD ne contient pas de gène viral, un adénovirus auxiliaire fournit les protéines nécessaires à sa réplication. Un virus de première génération est couramment utilisé. Il est complété par une lignée cellulaire possédant la région E1 comme les HEK 293. Pour exclure le virus auxiliaire des préparations de HD, des systèmes de production ont été développés avec différentes recombinases: Cre, FLPe et Φ C31 (448, 449, 450, 451). Ces systèmes de production s'équivalent en efficacité pour éliminer le virus auxiliaire. Les niveaux résiduelles de contaminant dans les préparations de HD sont d'environ de ~0,1 %. Tous ces systèmes ciblent une étape cruciale de la production, soit l'emballage de l'ADN. En plaçant

des sites de recombinaisons de part et d'autre du signal d'encapsidation Ψ sur le virus auxiliaire, l'excision du signal se fait conditionnellement à l'expression de ces recombinaisons. Le cycle de réplication du virus auxiliaire peut être retardé jusqu'à 60h sans affecter la production et l'infectivité du vecteur (451).

Dans des systèmes employant la Cre, il a été démontré que la réduction de la contamination est limitée par la recombinaison (452). Le génome du virus auxiliaire finit par échapper à l'enzyme en mutant ou en s'encapsidant d'une autre façon que par le signal d'encapsidation (453).

En aval des systèmes de production, le HD peut être séparé du virus auxiliaire par densité sur gradient de chlorure de césium (CsCl) à l'aide d'une centrifugation. Par cette méthode, il est possible de diminuer le niveau de contamination d'environ 10 fois (449). En combinant le système Cre / *loxP* optimisé avec la séparation par CsCl, des titres de 0,02 % - 0,01 % de contaminants résiduels sont obtenus (454). Pour les essais cliniques, malgré les niveaux de contamination très bas, seulement un système de production publié (PER.C6.CRE, (453)), suit les normes de la FDA en produisant moins de 1 RCA par 3×10^{10} particules infectieuses de HD (431).

Dans le laboratoire, nous avons développé un virus auxiliaire $\Delta E1-E4+ORF6$ doté de séquences FRT qui peut être utilisé pour amplifier un vecteur de troisième génération. La région E3 a été incluse dans le virus auxiliaire, ce qui augmente la production virale jusqu'à 1 log sans pour autant augmenter la contamination (455).

1.4.7.2 Des avantages du HD

Pour la thérapie génique contre la DMD, le HD est un vecteur très intéressant. Dépourvu de ses gènes viraux, le HD est peu immunogénique favorisant l'expression à long terme de transgènes *in vivo*. Sa grande capacité de transport peut accommoder l'ADN codant pour la plupart des gènes, incluant un promoteur minimal, mais aussi leur promoteur endogène et des *enhancers*, des insulateurs ou autres séquences régulatrices. L'ADN codant de la dystrophine fait environ 12 kb, permettant l'insertion de deux cassettes d'expression. D'autres vecteurs, comme le rAAV et le lentivirus, ne peuvent contenir que des versions tronquées de la dystrophine et ce, avec des promoteurs minimes en taille. Le HD a d'autres avantages. Il peut être cultivé relativement facilement et à faible coût, spécialement pour une production à grande échelle (pour revue, (398)). Le HD a prouvé son efficacité dans plusieurs tissus (456) et ce, dans différents modèles de maladies (pour revue, (457)). Puisque le HD est amplifié à l'aide d'un virus auxiliaire, toutes les modifications des protéines de la capsid du HD peuvent se faire relativement aisément par complémentation.

Pour les applications en thérapie cellulaire, les méthodes non virales sont généralement peu efficaces (458). Certains polymères s'annoncent prometteurs pour la livraison dans les myoblastes primaires de rat, mais leur innocuité reste encore à démontrer (459). Le HD permet de livrer efficacement dans 80 % des cellules (MOI 100) un transgène (jusqu'à ~35 kb) dans des myoblastes DMD avec une fibre de l'Ad5 (le sérotype, le plus souvent utilisé) et plus efficacement encore, avec une fibre chimère Ad5 / 50 (460). Le HD peut également livrer efficacement (efficacité de ~100 %) un transgène dans des myoblastes primaires de souris *mdx* (461).

1.4.7.3 *Le HD et la DMD*

Ces dernières années, les avancements dans le développement de vecteurs ont non seulement aidé à améliorer l'efficacité de transfert génique et l'efficacité thérapeutique des HD, mais ils ont aussi permis d'améliorer les systèmes d'expression génique et ce, dans des modèles d'animaux.

1.4.7.4 *L'administration du vecteur*

Puisque les muscles sont sévèrement atteints par la DMD, le HD devrait emprunter une route permettant de les rejoindre, le plus directement possible, afin d'éviter la dissémination du vecteur dans d'autres tissus et permettre une bonne transduction. La méthode idéale devrait être peu invasive pour éviter les complications chirurgicales.

1.4.7.4.1 dans la circulation systémique

L'injection systémique ne sera pas traitée dans cette section, car plusieurs études démontrent une faible transduction des muscles avec cette méthode (462). Cependant, le raffinement de la méthode intra-artérielle, sous occlusion partielle, est prometteur (463).

1.4.7.4.2 *in utero*

L'administration du HD *in utero* est une avenue intéressante en considérant la capacité de disséminer le vecteur dans tout l'organisme, en plus de profiter du système immunitaire immature du fœtus. De plus, un avantage sélectif des fibres, exprimant la dystrophine, favoriserait la stabilité d'expression. Cette technique a été tentée par le groupe de Paula

Clemens (464) chez des embryons de souris *mdx*. L'injection du HD, par voie intrapéritonale, a permis la transduction d'un nombre restreint de fibres musculaires. Dans ces fibres, le complexe des protéines associées à la dystrophine a retrouvé sa localisation au sarcolème. L'expression stable de la dystrophine a également été observée.

1.4.7.4.3 dans le diaphragme

Le diaphragme est sévèrement affecté chez les souris *mdx*. La morphologie est très différente de la souris normale (465). Une seule injection du diaphragme, à l'aide d'un HD, a rétabli l'expression de la dystrophine dans 24 % des fibres de façon stable pendant au moins 30 jours (466). Les diaphragmes traités ont également une plus grande résistance au stress induit par des contractions.

1.4.7.4.4 intramusculaire

Cette voie s'avère pratique et peu invasive pour acheminer le vecteur dans les muscles. Par contre, des injections multiples seraient nécessaires pour traiter tous les muscles du patient. Chez des chiots, un Ad de la première génération peut diffuser jusqu'à une douzaine de millimètres du site d'injection, la transduction étant la plus efficace entre 2 et 2,5 mm du site d'injection. En procédant à des injections multiples, il serait possible de traiter tout le muscle. Des doses de l'ordre de $\geq 1 \times 10^{10}$ particules infectieuses et $\geq 3 \times 10^{10}$ particules infectieuses du HD permettent une bonne transduction du tissu chez la souris naissante et adulte respectivement. Chez les souris naissantes, une seule injection du HD (sérotypé 5) dans le TA rétablit l'expression de la dystrophine dans plus de 50 % des fibres (467). Dans le muscle juvénile, le traitement est moins efficace avec environ 24 % des fibres exprimant la

dystrophine (468). Un vecteur semblable encodant l'utrophine de souris (469) rétablit l'expression de l'utrophine dans 58 % des fibres chez les souriceaux et jusqu'à 35 % des fibres de souris *mdx* adultes. Ces données et d'autres (voir la section 1.4.7.4.6) suggèrent que les muscles de souris sont plus faciles à transduire à la naissance qu'à l'âge adulte. L'explication pourrait résider dans le fait que les muscles immatures sont plus permissifs au HD en raison du tissu conjonctif moins dense et plus poreux (470). D'autres facteurs pourraient aussi jouer, comme le tropisme du vecteur (471), la route d'administration (472), l'expression du CAR dans les fibres musculaires (473, 474) et la petite taille du muscle. Pour augmenter la transduction des fibres musculaires, plusieurs techniques ont été employées incluant le changement de tropisme avec une fibre chimérique Ad5/F50, l'ajout d'un motif polylysine dans la fibre (475), le développement d'un HD qui exprime le CAR (476) et la suppression transitoire du système immunitaire (477).

1.4.7.4.5 L'expression de la dystrophine dans les souris *mdx*

Le HD est particulièrement efficace chez les souris *mdx* pour mitiger la pathologie. Dans ces études (467, 468), le vecteur employé possède deux cassettes d'expression de la dystrophine murine sous le contrôle du promoteur CB. Une seule injection dans les souris néonatales permet l'expression de la protéine : jusqu'à 230 % du niveau normal dans tout le muscle de la souris pendant au moins 6 mois (buvardage *Western*). De 6 mois à 1 an après le transfert génique, le niveau de dystrophine chute de 230 % à 64 %, ce qui demeure très élevé. Le nombre de fibres positives (52 % du muscle) reste stable jusqu'à 1 an (467). La surexpression de la dystrophine à des niveaux supraphysiologiques semble sécuritaire, car aucun effet adverse n'a été constaté (353). À l'inverse, des niveaux aussi bas que 30 % du niveau normal peuvent mitiger la pathologie (478).

Il est intéressant de noter que la quantité de dystrophine produite diminue entre 6 mois et 1 an (de 230 % à 64 %), mais que le nombre de fibres positives ne varie pas (467). Des études montrent que la dystrophine a une longue demi-vie au sarcolème. L'effet de la suppression de l'ARNm (avec ARN interférences ou arrêt de l'induction) sur l'expression de la dystrophine apparaît seulement après plusieurs mois *in vivo* (479, 480).

L'injection d'un HD encodant l'utrophine murine dans les souriceaux *mdx* conduit à l'expression de la protéine dans 58 % des fibres. Chez les souris adultes, le transfert génique est positif dans 35 % des fibres. Malgré le nombre de fibres élevé à 10 jours postinjection, toutes les souris accusent une perte considérable du nombre de fibres positives 1 an plus tard (469). Chez les souris néonatales ou adultes, la réponse immunitaire ne semble pas être en cause, car la présence d'anticorps dans le sérum des souris n'a pas été détectée. L'infiltration du muscle, par des cellules inflammatoires, après le traitement, n'était pas plus abondante que sans le traitement. Par conséquent, il n'est pas clair quels sont les facteurs responsables de cette diminution. Pour mitiger les symptômes de la pathologie chez les souris *mdx*, il faudrait parvenir à exprimer 7 fois le niveau basal d'utrophine ou aussi peu que 50 % du niveau normal de dystrophine (pour revue, (60)).

1.4.7.4.6 La persistance du HD dans les muscles

Une fois les cellules et les fibres musculaires transduites, la grande majorité de l'ADN des copies de HD reste sous forme épisomale dans les noyaux de celles-ci (pour revue, (481)). Chez des souris néonatales, la quantification de l'ADN du HD montre que le nombre de copies diminue au fil du temps dans les extraits de muscles totaux. En réalité, cette perte se chiffre à environ au trois quarts sur 1 an par rapport à la quantité retrouvée à 10 jours (467). La diminution du nombre de copies du vecteur corrèle avec la perte d'expression de la dystrophine observée par buvardage *Western* entre 6 mois et 1 an postinjection, mais pas avec

le nombre de fibres durant la même période (voir la section précédente). Dans le cas d'un HD, encodant le gène paralogue utrophine (469), le nombre de copies du vecteur reste stable dans les souris néonatales et immunodéficientes, mais il chute dans les souris adultes. Malgré la persistance du HD dans les souris néonatales et immunodéficientes, le nombre de fibres diminue. Il n'est pas clair ce qui pourrait causer cette diminution, mais il est possible que l'activité du promoteur ait diminué.

1.4.7.5 *Les effets thérapeutiques et restauration du DAPC au sarcolème*

La fragilité des muscles déficients en dystrophine conduit à la régénération continue de ce tissu. Les cellules satellites sont les principaux acteurs dans ce processus. Dans un muscle dystrophique, on constate la présence nombreuse de noyaux centraux. Il n'est pas clair, d'où provient exactement ces noyaux, ni le processus qui les amène au centre de la fibre. Cette caractéristique est typique de biopsie musculaire de patients DMD (95). Le traitement des muscles chez la souris *mdx*, avec un HD encodant la dystrophine, réduit de façon importante 1) le nombre de noyaux centraux (de 50 % à 10 % des fibres) et 2) la prise du colorant bleu Evans par les fibres endommagées et ce, 1 an post-traitement. Le traitement chez les souriceaux et les souris adultes restaure aussi la localisation normale du DAPC au sarcolème (467, 482).

Pour les souris injectées au stade néonatal ou adulte, le traitement a amélioré aussi la physiologie musculaire. La force isométrique maximale du muscle TA et sa résistance aux contractions excentriques sont augmentées significativement jusqu'à 1 an post-injection chez les souriceaux. Malgré l'effet important du traitement, la force et la résistance récupérée n'atteignent cependant pas les niveaux des souris de type sauvage. Chez les souris adultes, le traitement n'a pas augmenté le maximum de force isométrique, mais il a amélioré la résistance

aux contractions excentriques. Dans ce modèle, il est très difficile de chiffrer de combien ces paramètres doivent être augmentés pour avoir un impact thérapeutique significatif chez la souris. Il faut se rappeler que les souris *mdx* marchent toujours et n'éprouvent pas de problème majeur de respiration comme chez le patient (467).

Les effets thérapeutiques sont aussi prometteurs avec un vecteur encodant l'utrophine, car une augmentation de la force musculaire est mesurable 60 jours post-traitement chez les souris *mdx*. Les effets s'estompent à 8 mois postinjection. L'hypertrophie du TA est partiellement corrigée pendant toute cette période. Le nombre de noyaux centraux est réduit d'au moins la moitié à 240 jours (469). Une autre étude montre que la surexpression de l'utrophine dans les muscles rétablit la présence du DAPC au sarcolème, toutefois sans détecter la présence de nNOS (482).

1.4.8 La réponse immunitaire

Il est impossible de couvrir tous les aspects du système immunitaire dans cette thèse, mais il faut être conscient que la réponse innée et adaptative (humorale et cellulaire cytotoxique) constitue probablement l'obstacle le plus difficile à surmonter pour arriver à un traitement efficace contre la DMD. Dans les prochaines sections, je traite sommairement des éléments de la réponse immunitaire.

1.4.8.1 Les récepteurs de type Toll

Un grand nombre de récepteurs similaires au type Toll (*Toll-like receptors*, TLRs) sont impliqués dans la reconnaissance de plusieurs pathogènes, incluant les bactéries et les virus. Un nombre croissant d'évidences supportent qu'ils sont un élément clef dans l'activation de la

toxicité aigüe à l'endroit de l'injection de l'adénovirus *in vivo* (pour revue, (457)). Les protéines du virion de l'adénovirus et du HD activent vraisemblablement plusieurs TLRs. Le TLR2 est normalement impliqué dans la reconnaissance de patrons et motifs sur des peptidoglycanes et zymosanes bactériens. Il a été démontré que l'activation du TLR2 conduisait une réponse humorale contre la capsid de l'adénovirus (483), mais il n'est pas clair comment il est activé. Le TLR4 est également impliqué dans la reconnaissance de la capsid. Il reconnaît le facteur X (présent dans le sang) naturellement lié à la capsid virale de l'adénovirus (484). D'autres TLR pourraient également être impliqués dans la reconnaissance de la capsid.

Un autre TLR, le TLR 9, reconnaît l'hypométhylation de motifs CpG généralement présent dans les séquences bactériennes (485). L'interaction entre les motifs CpG et le récepteur se produit généralement en environnement acide principalement dans les endosomes et les lysosomes (486), ce qui est consistant, en partie, avec le parcours de l'Ad ou du HD dans la cellule. Justement, il a été démontré que l'Ad, mais aussi que le HD, activaient le TLR9 (483, 487). Des études ont montré avec l'adénovirus que l'ADN était hypométhylé dans les virions et à l'état libre dans les cellules infectées (plusieurs études sont rapportées à la référence (488)), ce qui est consistant avec l'activation du TLR9 via les CpG hypométhylés. Dans le cas du HD, aucune étude exhaustive n'a été menée pour déterminer le statut de méthylation de son ADN (selon les divers types ADN de remplissages utilisés) dans les cellules transduites. De plus, aucune étude ne démontre explicitement que c'est bien les CpG présents sur l'Ad ou le HD qui active le TLR9.

Globalement, l'activation des TLR déclenche des voies de signalisation cellulaires qui convergent principalement vers des facteurs de transcription comme NF- κ B stimulant la production de cytokines à actions locales et générales (pour revue, (489)). Une élévation des niveaux cytokines et chimiokines peut être mesurée dans le sang suite à l'injection systémique du HD (490, 491). Il existe aussi d'autres capteurs cytoplasmiques (par ex : NOD2) dans les

macrophages et cellules dendritiques. Ils reconnaissent des peptides présents sur des virus et conduisent à une production de cytokines (492).

1.4.8.2 *L'infiltration des monocytes*

Dans les souris *mdx*, comme chez le patient DMD, la nécrose des tissus musculaires entraîne l'émission de cytokines. Uniquement dans le muscle atteint, on retrouve jusqu'à 20 fois plus de macrophages et 7 fois plus de cellules dendritiques que dans le muscle sain (493). Comme on peut s'attendre, l'injection d'un vecteur adénoviral de première génération (PGAd) dans le TA de souris *mdx* engendre une plus grande réponse inflammatoire que dans les C57Bl/10. L'infiltration des macrophages dans le tissu musculaire est plus abondante dans la souris *mdx* âgée. En plus des protéines de la capsid, l'expression des gènes viraux augmente aussi le niveau de cytokines. Dans les muscles squelettiques, l'injection d'un PGAd cause une forte augmentation du nombre de macrophages, de cellules CD4⁺ et CD8⁺. Un HD est plus sécuritaire, car aucune augmentation des cellules CD4⁺ et CD8⁺ n'a été constatée. Pour les macrophages, une augmentation a été détectée chez les souris injectées à l'âge adulte seulement (468). L'injection d'un HD dans le diaphragme cause une faible réaction immunitaire, détectée par la présence de quelques lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺ (466).

1.4.8.3 *Les anticorps*

Les anticorps neutralisants patrouillent notre système sanguin à la recherche d'antigènes provenant d'expositions antérieures à des infections. Ces anticorps sont généralement de faible spécificité. En reconnaissant des épitopes sur la capsid virale, ils peuvent l'inactiver, mais ils peuvent également contribuer à une plus forte réponse immunitaire via l'activation du complément (494). Pour empêcher la reconnaissance du vecteur viral, plusieurs stratégies peuvent être employées, l'une d'elles consiste à changer le sérotype du vecteur de sorte que les

sujets n'aient jamais vu ce sérotype auparavant, donc n'ayant jamais pu développer des anticorps spécifiques. Une autre méthode consiste à protéger la capsid avec des polymères (495, 496). La production de néoanticorps contre la capsid virale n'est pas non plus souhaitable, si l'on veut réadministrer le vecteur pour augmenter l'effet thérapeutique.

Le transgène exprimé par le HD est également susceptible d'être reconnu comme une molécule du non-soi. En effet, si le système immunitaire n'a jamais croisé la dystrophine, il est possible qu'il traite celle-ci comme intruse, particulièrement lorsqu'elle est exprimée à des niveaux supraphysiologiques. Plusieurs épitopes, présents sur la protéine, normalement tolérés sont la cible des anticorps. C'est en effet ce que suggère un essai clinique chez l'humain avec l'AAV (13). Le développement de vecteurs HD, encodant la dystrophine de souris (pour les études précliniques), était important pour limiter le nombre de néoantigènes. Le changement de l'ADN, codant de la dystrophine humaine pour celle murine, prolonge la durée d'expression du transgène de ~90 jours à 365 jours (468, 497).

Étant donné que l'utrophine est toujours exprimée dans les muscles des patients DMD, la protéine n'est pas immunogénique. L'utrophine offre donc une bonne alternative à la dystrophine. L'injection du HD, exprimant l'utrophine, n'entraîne pas d'augmentation significative d'infiltration de monocytes, ni de réponse humorale (469).

1.4.8.4 *Les molécules immunomodulatrices et les immunosuppresseurs*

La réponse immunitaire innée déclenchée par le HD peut être supprimée de façon transitoire en utilisant des immunosuppresseurs. La FK506 permet d'augmenter la durée d'expression de la dystrophine chez les souris *mdx*. Toutefois, elle ne permet pas de réduire la réponse innée qui est dose-dépendante du vecteur après le transfert génique par le PGAd (477, 498). En plus

de réduire l'infiltration des monocytes, la quantité d'anticorps neutralisants diminue. L'utilisation de molécules immunomodulatrices comme CTL4Aig et CD40ig réduisent l'infiltration des monocytes CD4+ et CD8+. CTL4Aig et CD40ig peuvent également réduire la quantité d'anticorps neutralisants circulant dans le sang et stabiliser l'expression de dystrophine produite dans des souris adultes immunocompétentes (499, 500).

1.5 *Comprendre et améliorer l'expression d'un transgène livré par un HD*

Cette section se veut être une démonstration de ce qui a été fait pour stabiliser ou augmenter l'expression de transgènes pour la thérapie génique. J'ai orienté cette recherche vers le HD, mais j'ai également tenu compte de certaines connaissances acquises avec d'autres vecteurs comme les LV qui sont importantes pour l'amélioration des vecteurs actuels. Pour mieux apprécier les modifications génétiques apportées aux nouveaux vecteurs, il est essentiel de comprendre comment l'ADN du vecteur se comporte une fois importé dans le noyau.

1.5.1 L'état nucléaire de l'ADN du HD

L'ADN du HD est principalement sous forme monomérique en absence de réplication (sans son virus auxiliaire) (501, 502). La protéine VII lie fortement l'ADN du HD pour être éjectée quelques heures postinfection (503) possiblement à cause de la transcription (504). L'installation de structures chromatiniennes autour de l'ADN du HD se fait, entre autres, par la déposition de l'histone H3.3 qui est facilitée par la protéine chaperone HIRA. La suppression de l'activité de cette chaperone diminue de 2 à 3 fois le niveau d'expression d'un transgène contenu dans le vecteur (505).

La protéine terminale lie de façon covalente l'extrémité 5'ITR et demeure avec l'ADN dans le noyau. À part sa fonction dans la réplication virale, des évidences suggèrent qu'elle pourrait favoriser la rétention de l'ADN du HD dans le nucléoplasme. La protéine terminale dirigerait le génome viral à la matrice nucléaire (506) jouant ainsi un rôle potentiel dans la maintenance épisomale de l'ADN (507).

Pour le génome du HD, il demeure majoritairement sous forme monomérique *in vivo* (502), mais la présence de concatémères a déjà été observée. L'ADN a aussi été aperçu sous forme circulaire (508). Les connaissances sont très limitées sur le comportement épisomal du HD et sur les raisons de ces différentes formes. Compte tenu de sa très grande capacité de transport, des séquences sont ajoutées pour atteindre ~36 kb. Il est fort probable que certaines séquences introduites dans le vecteur influencent son état et sa localisation. Puisque le HD est tellement différent de l'adénovirus de type sauvage, il est possible qu'il se comporte différemment de ce dernier. Globalement, il en ressort de ces études que la majorité de l'ADN du HD demeure sous forme épisomale, linéaire et monomérique.

1.5.2 Les éléments de régulation de l'expression

Ils peuvent augmenter la durée et la force d'expression d'un transgène de plusieurs façons : en protégeant contre l'atténuation du promoteur (insulateurs et UCOE), en répliquant l'ADN (système EBNA1-OriP et chromosome artificiel) et en retenant l'ADN dans le noyau (S/MARs). Il existe un besoin en thérapie génique pour stabiliser l'expression d'un gène thérapeutique. Ces éléments peuvent être un ajout intéressant à un vecteur.

1.5.3 Les séquences protectrices contre l'effet d'atténuation du promoteur

Les effets des insulateurs sur l'expression génique sont très complexes. Ils peuvent être grossièrement classés en deux groupes selon leurs propriétés, les insulateurs bloqueurs d'*enhancers* et les insulateurs barrières. Cependant, un insulateur peut appartenir à ces deux groupes, comme c'est le cas du HS4 (locus de la β -globine, pour revue (509)). Les insulateurs barrières sont particulièrement utiles en thérapie génique, car ils protègent contre l'effet de l'atténuation du promoteur (ou *silencing*). Ils opèrent par plusieurs mécanismes en recrutant directement et indirectement des facteurs favorisant l'hétérochromatine. Selon leurs caractéristiques et leur position, ils peuvent empêcher l'hétérochromatine de se répandre à un endroit actif transcriptionnellement (510) (pour revue, (511)).

Le choix de l'ADN de remplissage, utilisé pour atteindre la taille optimale d'encapsulation du HD (de 28 à 36 kb), est important pour l'expression du transgène *in vitro* et *in vivo* (443, 444, 447). L'ADN doit idéalement être non codant et provenir du génome humain ou de mammifères. Hors, même avec un ADN qui a ces propriétés, il pourrait quand même avoir un impact négatif sur l'activité de la cassette d'expression présente en *cis* sur le HD. La modulation de l'activité de la cassette peut se faire via des modifications épigénétiques, telle que la déacétylation des histones, souvent associée à la répression génique et à l'hétérochromatine. De façon intéressante, l'ajout d'un insulateur HS4 (de poulet) réduit de façon importante la déacétylation induite par l'ADN de remplissage (444). Ces données suggèrent fortement que le HS4 puisse être utilisé dans le HD pour stabiliser l'expression génique en réduisant le *silencing* induit par l'ADN de remplissage.

Les éléments ubiquitaires d'ouverture de la chromatine (UCOE, *Ubiquitous Chromatin Opening Elements*) sont issus de promoteurs de gènes ubiquitaires. Ils contiennent plusieurs îlots CpG résistants à la méthylation (512). Les UCOE peuvent étendre la résistance à la

méthylation sur la région promotrice et le début d'un gène ou de plusieurs gènes. En plus de modifier le patron de méthylation de l'ADN, l'UCOE induit indirectement la modification des histones via la méthylation et l'acétylation. Une corrélation inverse, entre la méthylation de l'ADN et la modification d'histones activant l'expression génique, a été observée en présence d'un UCOE (513). Lorsque le UCOE (issu du locus HNRPA2B1-CBX3) est utilisé près du promoteur CMV, il a été démontré qu'il pouvait contrer l'effet d'atténuation, augmenter la stabilité et la force d'expression (514). Une seule publication traite de l'usage de ce UCOE dans un Ad, mais aucun bénéfice sur l'expression (régulé par le promoteur CMV) n'a été constaté jusqu'à 24 heures post-infection (515), suggérant que le délai n'est peut-être pas assez long pour observer une résistance à l'atténuation du promoteur.

1.5.4 Les micro-ARN cellulaires pour contourner la réponse immunitaire

Une meilleure connaissance du génome à microARN a permis d'exploiter des microARN cellulaires spécifiques pour exprimer un transgène thérapeutique dans un tissu, mais pas dans les cellules immunitaires. Les cellules présentatrices d'antigènes sont un obstacle majeur en thérapie génique, car elles peuvent conduire à une réponse immunitaire contre le produit du gène thérapeutique. Une approche ingénieuse consiste à introduire des séquences spécifiques (ciblées par un microARN cellulaire) dans une portion non traduite en 3' de l'ARNm encodant le transgène. Le microARN choisi doit être exprimé uniquement dans les cellules présentatrices d'antigènes et absent du tissu cible. Une étude employant cette stratégie a donné des résultats spectaculaires dans les hépatocytes murins *in vivo* pour traiter l'hémophilie (516). Cette approche n'a jamais encore été tentée dans le tissu musculaire.

1.5.5 Des séquences favorisant la réplication du transgène

La réplication de l'ADN est nécessaire dans les cellules en division pour perpétuer le matériel génétique et éviter sa dilution dans les cellules filles ou son élimination. Dans le muscle, les cellules satellites se divisent pour régénérer le muscle. La régénération est fortement activée

au début de la dégénérescence musculaire chez les patients DMD. Cet environnement est propice à la dilution et l'élimination du vecteur.

Le virus humain Epstein–Barr (EBV) de l'herpès est capable de répliquer son génome et jusqu'à 180 kb d'ADN exogène (517). L'antigène nucléaire 1 (EBNA1) est encodé par le virus et s'associe au génome viral via une origine de réplication oriP. Une fois par cycle cellulaire, l'oriP est activée et permet la réplication multiple du génome. EBNA1 n'est pas immunogénique (518, 519), mais contribue à l'oncogénicité en protégeant les cellules contre l'apoptose (520). Cela limite l'utilisation de ce système dans le cadre de la thérapie génique. Kreppel *et al.* 2004, ont développé un HD exploitant les éléments minimaux de réplication du EBV (EBNA1 et oriP). L'efficacité de transmission du transgène atteint jusqu'à 98 % dans les cellules filles (508).

1.5.6 Des séquences d'attachement à la matrice nucléaire (S/MAR)

Les S/MAR sont des séquences généralement riches en A/T d'environ 200 pb de long. Lorsqu'elles sont positionnées *en cis* sur l'ADN, elles permettent d'ancrer les boucles de chromatine à la matrice nucléaire (521) (pour revue, (522)). Plusieurs protéines ont été identifiées pouvant lier directement ces séquences. Les complexes de protéines qui s'associent à ces régions régulent le niveau de transcription génique et peuvent initier la réplication à proximité d'un S/MAR (522). Lorsque présent dans l'ADN plasmidique, un S/MAR peut faciliter la réplication de l'ADN et favoriser son maintien épisomal. La liaison à une unité de transcription active est suffisante pour maintenir et répliquer un épisode de mammifères en absence de sélection négative *in vitro* (523). Dans le foie, un plasmide contenant un S/MAR permet de stabiliser l'expression d'un transgène pendant au moins 6 mois contrairement à 1 semaine pour un plasmide conventionnel (524). Lorsque le promoteur CMV est utilisé avec un S/MAR sur un épisode non viral, ses îlots CpG sont protégés de la méthylation, suggérant un

rôle de la réplication de l'ADN dans l'inhibition de la répression de la transcription (525). Le S/MAR utilisé dans cette étude n'a pas été étudié chez le HD.

L'effet bénéfique du S/MAR pour la thérapie génique est controversé. Il semble que le choix de la séquence d'attachement à la matrice employée soit important. Deux S/MARs (de la lysozyme de poulet (526) et de l'immunoglobuline κ (527)) ont été testés avec un PGAd chez la souris pour le traitement de l'hémophilie (528). Malgré une forte expression du transgène dans le foie (facteur IX humain), les deux S/MARs n'ont pas permis d'augmenter les niveaux sériques du FIX. Le S/MAR (692-pb) de l'intron du gène HPRT humain a été étudiée avec le HD. Malheureusement, il n'augmente pas le niveau d'expression, ni la durée d'expression du transgène (443). Ces évidences montrent que l'ajout uniquement d'un S/MAR a un effet mineur sur la persistance du vecteur *in vivo*.

1.5.7 Le chromosome artificiel encodant le gène complet de la dystrophine

Un chromosome artificiel, contenant le gène complet de la dystrophine ($2,4 \times 10^6$ pb), des télomères et un centromère, a été généré puis introduit dans des cellules souches embryonnaires (529). L'expression de la dystrophine dans plusieurs tissus, incluant le muscle, a été détectée à des niveaux normaux chez des souris chimères (générées à partir de ces cellules souches), démontrant la persistance du chromosome artificiel, même après le développement complet de la souris. L'utilisation des promoteurs endogènes permet d'exprimer spécifiquement au moins deux isoformes dans leur tissu respectif. L'avenir thérapeutique de cette méthode mise principalement sur un traitement à partir de cellules souches pluripotentes induites (530) ou sur la thérapie cellulaire à partir de cellules souches. La livraison du vecteur par transfert de chromosome (par MMCT, *Microcell-Mediated-Chromosome-Transfert*, revue (531)) est compliquée et elle est réalisable qu'à très petite

échelle. L'application de la méthode directement *in vivo*, ou la livraison de l'ADN aussi grand est hors de notre portée actuellement.

1.6 *L'intégration dirigée du HD dans les chromosomes cellulaires*

Le HD ne permet pas d'exprimer de façon permanente la dystrophine ou l'utrophine dans les muscles de souris *mdx* (467, 468, 469). L'intégration de l'ADN du vecteur est une stratégie intéressante pour conserver de façon permanente le gène de la dystrophine dans les muscles du patient DMD. Divers techniques ou l'utilisation d'outils moléculaires permettent de diriger l'intégration à un ou à des endroits précis dans le génome. Les avancements récents dans ce domaine de recherche seront présentés dans l'optique d'applications présentes ou futures avec le HD.

L'intégration dans les chromosomes de vecteurs adénoviraux a été documentée *in vitro* dans plusieurs lignées transformées, dans des cellules primaires (532, 533, 534, 535, 536, 537), *in vivo* (538) et également en transgénèse (539). Selon les études et les conditions suivies, la fréquence d'intégration est faible avec entre 10^{-3} et 10^{-5} événements par cellule pour des événements de type recombinaison hétérologue, et 10^{-3} et 10^{-6} , pour des événements impliquant une recombinaison homologue. On entend par recombinaison hétérologue, une intégration qui a lieu de façon aléatoirement sans homologie apparente avec le site intégré. La fréquence d'intégration d'un HD est supérieure de 6 [MOI 0,1] à 11 fois [MOI 0,01] dans une lignée de glioblastome [U87-MG]) que celle d'un vecteur adénoviral de première génération (533) probablement à cause de l'absence d'expression de gènes viraux. On peut constater que l'efficacité d'intégration dépend de la MOI ou de l'efficacité du transfert génique. Des dommages à l'ADN, induits par l'irradiation des cellules, augmentent significativement l'efficacité d'intégration d'un Ad $\Delta E1$ (540). La fréquence d'intégration du HD a été évaluée dans seulement une étude *in vivo*, soit dans les hépatocytes de souris après l'injection

systemique du vecteur (538). Des fréquences de 6.7×10^{-5} événements par cellule pour la recombinaison hétérologue et 3.9×10^{-7} pour la recombinaison homologue ont été trouvées. Le locus ciblé par le HD était celui de l'hydrolase fumarylacétoacétate, normalement actif dans les hépatocytes. Bien que l'euchromatine favorise l'intégration du HD via la recombinaison homologue (541), l'efficacité n'est toutefois pas suffisante pour miser sur l'intégration du vecteur afin de stabiliser l'expression du transgène.

Dans des cellules souches embryonnaires de primates, l'efficacité de transduction du HD atteint environ 100 % contrairement à 34 %, avec un agent de transfection conventionnel (536). Le taux de survie frôle les 100 % à forte MOI (300) et diminue progressivement en augmentant la dose du HD. En comparaison, seulement 70 % de survie est atteint avec l'agent de transfection. Il est intéressant de constater que pour la transduction, 10 % (pour la transduction) versus 1 % des cellules (pour la transfection) ont conduit l'intégration spécifique au locus souhaité par recombinaison homologue. Dans les cellules embryonnaires de souris, jusqu'à 0,2 % des cellules ont intégré de façon ciblée l'ADN du vecteur au locus *HPRT1* par recombinaison homologue et jusqu'à 5 % par recombinaison hétérologue (534).

Les connaissances sur le mode d'intégration hétérologue du HD sont très limitées. Les résultats de Stephen *et al.* (538) suggèrent que l'intégration hétérologue a lieu via les extrémités ITR. Les 7 événements d'intégration analysés présentent des microdélétions de 1 à 78 nucléotides (nt) dans les ITRs 5' et 3' à la jonction entre l'ADN du vecteur et l'ADN génomique. Seulement deux de ces événements se produisent à l'intérieur d'un gène. Pour l'instant, contrairement à l'adénovirus, aucune étude n'a pu jusqu'à présent démontrer ou caractériser le potentiel oncogénique d'un HD suite à son intégration. Toutefois, il faut noter que les ITR contiennent des sites de liaison à des facteurs de transcription qui pourraient agir comme *enhancer* (542, 543, 544) et potentiellement augmenter l'activité au locus intégré.

Liu *et al.* ont corrigé de façon ciblée une mutation à l'exon 11 de la lamine A (impliquée dans plusieurs laminopathies) par recombinaison homologue avec un HD. Ce locus est transcriptionnellement inactif dans les cellules iPSc. Ceci rend l'environnement génomique réaliste pour tester la correction des gènes par cette approche. Après la transduction des cellules avec un HD, contenant deux marqueurs de sélections et le fragment homologue, une double sélection était appliquée. La première sélection est négative. Le marqueur de sélection du gène suicide de la thymidine kinase du virus de l'herpès simplex est intégré dans le génome lorsque les cellules intègrent le HD de façon hétérologue (non homologue). Le traitement au gancyclovir tue ces cellules. La deuxième sélection à la néomycine détruit les cellules ne contenant pas le gène de résistance à la néomycine (ou G418). La fréquence d'intégration du HD, obtenue par cette méthode, était entre 10^{-6} et 10^{-5} par cellule. Parmi les colonies isolées, 78 à 100 % (selon les conditions de transduction) présentaient une modification du gène cible (545).

1.6.1 L'hybride HD/AAV et la protéine rep

Pour l'instant, seulement deux systèmes publiés permettent d'intégrer spécifiquement (dans le génome) l'ADN livré par un HD (voir 1.6.3). Le premier système est un hybride entre le HD et le virus associé à l'adénovirus (*Adeno-Associated Virus*, AAV). À partir d'un ITR de l'AAV et de la protéine rep, il est possible d'intégrer un HD/AAV avec deux cassettes d'expression de la dystrophine (546). La fonction intégrase de la protéine rep est donc employée pour intégrer l'ADN du vecteur dans le site spécifique AAVS1 sur le chromosome 19 (19q13.3-qter). L'expression de la dystrophine au sarcolème a été observée après le transfert génique dans le *gastrocnemus*. Toutefois, on ignore si l'expression est plus stable post-intégration *in vivo*.

En changeant la fibre de l'Ad5 (groupe C) pour celle de l'Ad50 (groupe B), l'efficacité de livraison du transgène augmente de 18 à 112 fois (selon la MOI) dans des myoblastes dérivés

de patients DMD (460). L'entrée de l'Ad50 se fait via le récepteur CD46 (547), indépendamment du CAR, dont l'expression diminue lors de la maturation des cellules musculaires (474).

Une autre étude dans des cellules hématopoïétiques humaines rapporte que 30 % des événements d'intégration ont eu lieu dans le locus AAVS1 et 25 % dans le locus de la β -globine, dont l'ADN de remplissage était constitué (548). Une observation intéressante est que 90 % des événements d'intégration avait lieu via l'ITR de l'adénovirus et non celui de l'AAV au site AAVS1. Les événements d'intégration sont dispersés à l'intérieur de 5.3 kb du site AAVS1. Suite à l'injection d'un HD/AAV de façon systémique chez la souris, une estimation de 0,2 à 2 % des cellules du foie (par PCR quantitative) ont intégré l'ADN du vecteur. Le site AAVS1 a été détecté chez chaque souris, démontrant le potentiel thérapeutique de la méthode (549). Il reste toutefois à démontrer que cette approche est sécuritaire, car plusieurs évidences suggèrent que rep est toxique, entre autres, en déclenchant l'apoptose (550).

1.6.2 Les nucléases à doigts de zinc, des outils moléculaires prometteurs

Depuis quelques années, les nucléases à doigts de zinc (*Zinc Finger Nucleases*, ZFNs) sont de plus en plus employées en recherche dans le domaine de la thérapie génique. Nous pouvons utiliser ces outils pour induire des modifications génétiques à des endroits précis du génome cellulaire, entre autres, en facilitant l'intégration d'un ADN donné. Les ZFNs pourraient potentiellement être employées pour intégrer l'ADN génomique du HD. Toutefois, un tel système n'a pas encore été publié. Les ZFNs sont une classe de molécules qui agissent en dimère pour cliver l'ADN selon une séquence spécifique. Chaque monomère est constitué de plusieurs modules et d'un domaine enzymatique (551). Les modules de chaque monomère reconnaissent une hémiséquence d'ADN. Les hémiséquences sont séparées par un espaceur. Une fois le dimère en place, la dimérisation des domaines de restriction conduit à la digestion

de l'ADN au niveau de l'espaceur et induit une brisure double-brin spécifique (DSB, *double-strand breaks*).

Dans les chromosomes cellulaires, les DSB sont détectés par la machinerie de réparation, car il est crucial pour la survie cellulaire de réparer ce genre de bris. Deux processus principaux de réparation gèrent ces dommages. Le processus majoritaire est la ligature de terminaisons non homologues (NHEJ, *Non-homologous End-Jointing*) qui possède un haut taux mutationnel. Un second est la recombinaison homologue qui se fait généralement à partir du chromosome sain. La matrice servant à la réparation peut aussi être fournie en *trans* via un plasmide ou un vecteur viral. Celle-ci doit posséder les deux bras homologues en amont et en aval du DSB (pour revue, (552)). La recombinaison homologue, induite par un bris d'ADN, est de plusieurs milliers de fois plus efficace que la recombinaison homologue conventionnelle (553, 554). Les ZFNs ont permis l'ingénierie génétique des cellules humaines, de souris, de rat, de cochon et autres (555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563).

Pour l'instant, les ZFNs ont servi uniquement en thérapie cellulaire, mais ils pourraient être utilisés aussi directement *in vivo* en les exprimant à partir d'un vecteur d'origine viral. La recombinaison homologue induite permet de corriger de façon chirurgicale un gène, en l'inactivant, en corrigeant une mutation ou en insérant un transgène (entre les deux bras d'ADN homologues). Les meilleures efficacités d'intégration répertoriées atteignent une proportion de jusqu'à 50 % des cellules traitées. Des cellules humaines ont été modifiées avec des ZFNs spécifiques au locus CCR5 et au locus de la chaîne γ du récepteur de IL2 (564). Les résultats *in vitro* montrent que cette méthode atteint sa cible environ 93 % des fois (565).

L'engouement à utiliser la technologie des ZFN en thérapie cellulaire a amené au lancement d'essais cliniques avec deux paires de ZFNs, CCR5-224 et VF2468 pour le VIH et le cancer. La spécificité des ZFNs s'avère cruciale dans le succès de cette approche thérapeutique.

L'ingénierie imparfaite des modules de reconnaissance de l'ADN et du domaine de dimérisation de l'enzyme de restriction *FokI*, peut entraîner des DSB hors site dans le génome (566, 567, 568, 569, 570). La difficulté à prédire l'endroit de ces brisures hors sites pose un grave problème au niveau de l'innocuité. Pattanayak *et al.* ont construit des bibliothèques comprenant $>10^{11}$ sites dégénérés (≤ 7 mutations) issus de la séquence complète originale pour les paires CCR5-224 et VF2468. La tolérance pour les mutations est très élevée avec des moyennes de 1,84 à 4,56 à et de 1,10 à 3,45 mutations par site respectivement. Parmi les sites artificiels digérés, 37 et 2652 se retrouvent dans le génome humain respectivement. Environ le tiers de ces sites est réellement ciblé dans les cellules humaines K562. La méthode développée par Pattanayak *et al.* permettra certainement d'étudier et d'améliorer le design des ZFN en réduisant leur tolérance et leur activité non spécifique (569).

Une alternative au ZFN est aussi en développement, soit l'ingénierie de méganucléases pour cibler des sites précis dans le génome. Agissant comme les ZFN, elles peuvent induire un bris dans le génome et favoriser la recombinaison homologe ou encore stimuler la NHEJ. Ce dernier mécanisme de réparation imprécis peut être exploité pour changer le cadre de lecture d'une protéine dans le but de réactiver un gène par exemple. Leur développement s'annonce prometteur au niveau thérapeutique pour la DMD (571).

1.6.3 L'intégration d'un HD accomplie par l'intégrase du phage Φ C31

Un autre système repose sur l'intégrase du phage Φ C31 pour intégrer l'ADN d'un HD. Cette enzyme est capable d'intégrer spécifiquement un ADN dans un nombre restreint de sites transcriptionnellement actifs dans les chromosomes de mammifères (voir prochaine section). Il existe une seule étude démontrant que l'ADN du HD peut être intégré à l'aide de l'intégrase *in vivo* (572). Chez la souris, l'injection d'un HD conduit à l'expression stable du facteur IX pendant au moins 122 jours à l'aide de l'intégrase (livrée à partir d'un plasmide). L'expression du FIX est 5 fois supérieure en présence d'intégrase après avoir induit la prolifération des

hépatocytes. L'efficacité d'intégration *in vivo*, n'a pas été mesurée, mais l'analyse des sites d'intégration dans le foie a permis de constater un événement d'intégration au site mpsL1, un point chaud, dont la fréquence d'intégration est élevée (573, 574). La préférence des sites du HD sont à 44,1 % intragéniques (13,3 % exon et 87,7 % intron) et 44,1 % intergéniques, dont 11,7 % dans les éléments répétitifs (572).

L'ADN du HD est différent du plasmide, car des protéines virales et cellulaires sont attachées spécifiquement à celui-ci (voir la section 1.5.1). On ignore comment celles-ci peuvent affecter l'efficacité ou la spécificité d'intégration (voir *Chapitre 3*). Une meilleure connaissance de l'efficacité et de la spécificité de l'intégration du HD, *in vitro* et *in vivo*, est cruciale pour utiliser ce système dans un cadre thérapeutique pour la thérapie génique contre la DMD.

1.7 *L'intégrase du phage ΦC31*

Au cours du cycle de réplication phagique, le bactériophage ΦC31 doit intégrer son génome dans le chromosome bactérien pour répliquer son ADN (575). Cette intégration est réalisée grâce à une intégrase site-spécifique. Elle nécessite le site *attP*, présent sur l'ADN du phage et le site *attB*, à l'intérieur du génome de l'hôte. De façon intéressante, lorsque l'intégrase est exprimée dans des cellules de mammifères en présence d'un plasmide, contenant un site *attB*, elle peut catalyser l'intégration de celui-ci dans les chromosomes de la cellule à des sites présentant une homologie avec le site *attP*, connus sous le nom de sites *pseudo-attP*. Inversement, le remplacement du site *attB* sur le plasmide, par le site *attP*, ne permet pas une intégration efficace (574, 576).

1.7.1 Le mécanisme de recombinaison

L'intégrase fait partie de la famille des larges recombinaises site-spécifique à sérines. L'intégrase dépend de cette sérine pour son activité catalytique (575, 577). L'intégrase est active dans le noyau, mais elle est également présente dans le cytoplasme. L'ajout d'un NLS redirige l'intégration spécifiquement dans le noyau, mais son effet sur l'activité de l'intégrase est contesté (578, 579).

Un modèle, basé sur d'autres membres de sa famille, indique que le domaine N-Terminal de la protéine possède une fonction « resolvase » (voir plus bas) (580, 581). Le domaine C-Terminal est celui qui varie le plus parmi les recombinaise à sérine et dont l'on connaît le moins les fonctions. Quatre monomères de l'intégrase seraient requis pour catalyser l'intégration. En groupe de deux, ils lieraient soit le site *attP* ou le site *attB*. Les deux dimères de l'intégrase rapprocheraient deux sites spécifiques *attP* et *attB* ensemble à l'intérieur d'une synapse. Agissant en tétramère et en concert, le domaine N-Terminal de chaque monomère couperait le substrat d'ADN et formerait un lien covalent transitoire avec l'extrémité du brin 5' (via l'oxygène de la sérine). Ce même domaine forcerait la rotation de 180° de deux sous-unités opposées du tétramère touchant leur hémiséquence respective (provenant de *attP* et *attB*). Ceci entraînerait un échange avec l'hémiséquence de l'autre site. Ensuite, une ligature des extrémités 3'-OH et 5'-PO₄²⁻ scellerait le tout (575, 581). Le mécanisme d'intégration rendrait possible l'intégration de la cassette dans les deux sens. La direction de la cassette d'expression peut influencer l'expression du transgène de plusieurs fois (582). Il a été reporté quelques microdélétions au cœur des sites d'intégration (574, 576, 583) et une seule copie de l'ADN transportant l'*attB* est généralement intégrée (576, 584, 585).

Au niveau de la séquence, *attB* et *attP* forment chacun un palindrome imparfait d'environ ~30 à 50-bp (586). Au centre des sites est situé un coeur TTG qui correspond à l'endroit, où la recombinaison a lieu (577). De chaque côté du coeur, les séquences palindromiques

respectives forment le bras droit (*attR*, *Right*) et le bras gauche (*attL*, *Left*). Suite à la recombinaison (décrite ci-haut), le bras *attR* et *attL* du site *attB* se lie inversement au bras *attL* et *attR* du site *pseudo-attP* (voir section 3.4.7, FIG. 3-6A). Chez le phage Φ C31, cet événement est réversible grâce à la protéine gp3 permettant l'excision de l'ADN du phage du génome bactérien. En absence des protéines du phage, l'intégrase procède à une recombinaison unidirectionnelle et l'excision de l'ADN n'a pas lieu, séquestrant celui-ci dans les chromosomes cellulaires (voir Figure 1-8, (581, 587)). Une protéine cellulaire endogène, DAXX, a été identifiée pour interagir avec l'intégrase (588). Elle inhibe sa fonction recombinase. Dans deux lignées cellulaires testées, le niveau de DAXX corrèle inversement avec l'activité de l'intégrase (589). L'une de ces lignées, les A549 (avec un faible niveau de DAXX), mais aussi les HepG2 et les HeLa ont des niveaux d'activité de l'intégrase très élevés par rapport à d'autres types de cellule. Par conséquent, ces cellules peuvent constituer de bons modèles pour étudier la fonction de l'intégrase. D'autres protéines ont été identifiées comme partenaires, dont au moins deux qui inhibent l'activité de l'intégrase (590, 591).

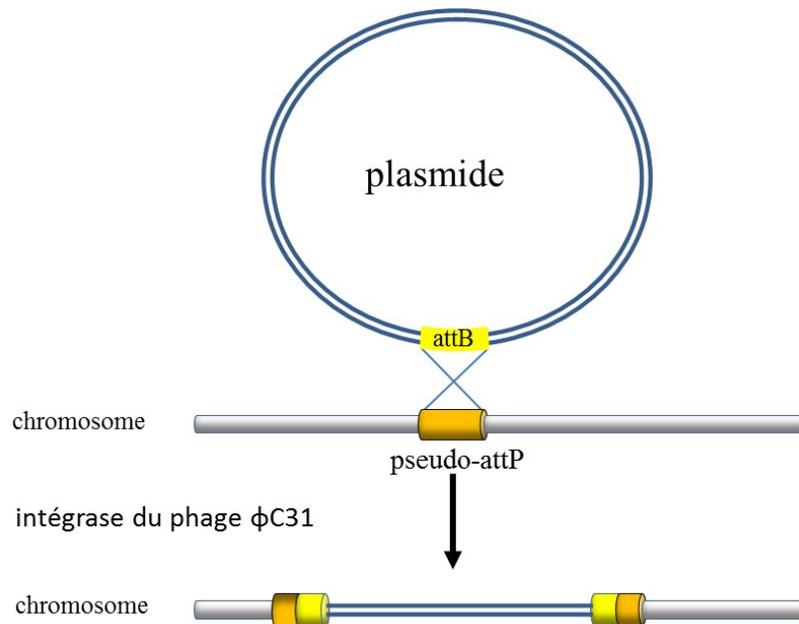


Figure 1-9. Intégration d'un plasmide par l'intégrase du phage Φ C31

Schéma de l'intégration d'un plasmide. La recombinaison entre les sites *attB* et *pseudo-attP* est accomplie par l'intégrase. Les deux sites sont détruits après la recombinaison résultant en une opération unidirectionnelle.

1.7.2 L'efficacité de l'intégrase in vitro

L'intégrase s'avère un outil puissant pour modifier génétiquement les cellules en thérapie cellulaire. En plus d'être site-spécifiques, elle peut augmenter de plusieurs fois le niveau d'intégration d'un transgène dans les chromosomes cellulaires par rapport au niveau basal d'intégration d'un ADN seul. L'efficacité d'intégration absolue a été mesurée dans plusieurs types de cellules suite à des transfections de plasmides **Table 1-I**. On pourrait définir l'efficacité comme suit, soit la proportion (%) du nombre d'événements d'intégration mesurés par cellule. On remarque dans la **Table 1-I** que la variabilité dans l'efficacité est très grande d'un type de cellule à l'autre. Parmi ces études, plusieurs paramètres ont été identifiés pouvant affecter l'efficacité d'intégration, comme le ratio substrat/intégrase et l'efficacité de livraison du transgène. Les méthodes pour transfecter les cellules embryonnaires et les myoblastes primaires sont peu efficaces ou très toxiques. Le vecteur HD est une bonne alternative, à la transfection, car il peut livrer efficacement un transgène dans ces cellules (460, 475, 536).

Table 1-I. Efficacité de l'intégrase observée en culture cellulaire

Type de cellules	*Efficacité (%)
Cellules souches myogéniques murines (MD1) (361)	0,0034
Myoblastes primaires humains (361)	0,01
Fibroblastes embryonnaires murins (592)	0,01
Cellules mésenchymales dérivées du tissu adipeux (592)	0,014
Cellules de cordon ombilical (humain) (585)	3,0
Fibroblastes embryonnaires murins (584)	0,0029
Cellules embryonnaires humaines BG01v (593)	0,002
Cellules embryonnaires de poulet (594)	0,001
Cellules germinales primordiales de poulet (594)	0,00096
Cellules épidermiques de patients atteints de l'épidermolyse bulleuse héréditaire (595)	17
Fibroblastes humain HT1080 (596)	0,3
Cellules progénitrices multipotentes de rat adulte (596)	~0,16
HeLa (572, 597)	~0,40
HEK 293 (574)	0,069
NIH 3T3 (574)	1,2
Huh7 (598)	0,047 ou 0,47
Hep1A (598)	0,13 ou 1,3
HCT116 (598)	0,047 ou 0,47

* L'efficacité correspond à la proportion (%) du nombre d'événements d'intégration par cellule

1.7.3 L'efficacité de l'intégrase *in vivo*

La majorité des études avec l'intégrase *in vivo* sont réalisées dans le foie. Pour améliorer l'efficacité des traitements, il est important de déterminer son efficacité absolue, car elle nous renseigne sur le nombre de cellules participant à la correction de la pathologie. Chez un modèle murin de tyrosinémie héréditaire de type I, Held *et al.* ont réintroduit le gène de l'hydrolase fumarylacétoacétate à l'aide de l'intégrase (599). Malgré une faible efficacité de livraison (2 % des hépatocytes) par injection hydrodynamique (plasmide intégrase et plasmide *attB*-FAH), 3,6 % des hépatocytes en présence vs 0,14 % en absence de l'intégrase, expriment encore l'enzyme après 25 jours, suggérant l'intégration du plasmide. La fréquence absolue d'intégration est de 0,073 % et 0,0028 % (599) dans tous les hépatocytes.

Dans un modèle de souris hémophiles, l'intégration d'un plasmide permet d'obtenir 5 à 7 % des hépatocytes exprimant toujours le FIX à 200 jours postinjection (600). Ces données sont appuyées par une autre étude du même groupe, où le pourcentage d'hépatocytes exprimant le FIX, trois mois suivant l'injection, atteint 12,4 % avec l'intégrase normale et 18,5 % avec un mutant hyperactif (601). Les efficacités d'intégration publiées dans cet article sont les plus élevées jamais publiées *in vitro* et *in vivo*. Les fortes efficacités d'intégration peuvent être expliquées par une livraison efficace des plasmides (602) et une forte activité de l'intégrase dans les cellules hépatiques (588). Environ le trois quart des cellules exprimant l'intégrase exprime de façon stable le FIX. Un constat découlant de cette observation est que la division cellulaire n'est pas requise pour que l'intégration se produise (579). D'autres éléments ont été suggérés, comme la possibilité que l'activité de l'intégrase cause un arrêt du cycle cellulaire empêchant le plasmide de s'échapper. De plus, le marquage des cellules positives au FIX, reflétant l'efficacité d'intégration, constitue une méthode indirecte pour évaluer le niveau d'intégration. Il n'est pas clair si chaque cellule marquée produit réellement le FIX. Quant au niveau d'expression du FIX sécrété dans le sérum, il dépasse celui du seuil thérapeutique d'au

moins quatre fois à 1022 ng / mL et ce, de façon stable pendant au moins 168 jours permettant de mitiger la pathologie (600).

L'injection d'un HD encodant le FIX (et ayant son *attB*) et son intégration (via un second HD, encodant l'intégrase) permet d'exprimer de façon stable le FIX à un niveau de 600 ng / mL à 122 jours. Pour évaluer l'effet de l'intégration sur l'expression du FIX, les hépatocytes sont passés au travers de 3 cycles avec du CCl₄ pour forcer leur prolifération. Par contre, l'efficacité d'intégration par hépatocyte n'a pas été mesurée de façon absolue, ce qui pourrait être utile pour comparer ce système intégratif avec d'autres (572).

1.7.4 La spécificité de l'intégrase *in vitro* et *in vivo*

L'isolation et l'analyse des séquences, au site d'insertion du plasmide dans le génome, ont permis d'établir une faible homologie de ces sites avec la séquence *attP* de type sauvage. Les sites dégénérés retrouvés dans le génome humain et murin sont appelés *pseudo-attP*. Selon une analyse statistique, ce nombre oscillerait entre 202 et 764 dans le génome humain, corroborant une étude antérieure qui les estimait à entre 100 et 1000 (574, 576). Chalberg *et al.* ont trouvé 117 sites *pseudo-attP* différents sur 196 événements d'intégration indépendants. Parmi ces sites, 19 d'entre eux comptent pour 56 % des événements totaux suggérant une préférence de l'intégrase pour certains sites (576).

L'état de la chromatine déterminerait l'accessibilité de certains sites. L'intégrase favorise légèrement les régions denses en gènes. Trois études sont arrivées à des résultats différents sur la distribution des événements d'intégration. Chalberg *et al.* présentent cette distribution: 36,8 % pour les introns, 1,9 % pour les exons et 61,3 % entre les gènes (576). Ehrhardt *et al.* ont trouvé que 71,76 % des événements d'intégration se trouvaient dans les gènes (exons +

introns) (598). Le même groupe a montré dans une autre étude que 44 % des événements d'intégration se produisaient dans les gènes avec le HD cette fois (572). Les différences entre les distributions des trois études pourraient être dépendantes de la nature des vecteurs utilisés pour livrer l'ADN, mais aussi, être de nature technique (598).

L'intégrase semble avoir une préférence pour des éléments répétitifs de la famille HERL-V présente principalement dans les régions intergéniques. Les HERL-V sont le vestige de rétrovirus ancestraux. En présence de l'intégrase, on retrouve 11,0 % des événements d'intégration dans un site HERL-V par rapport à une proportion de 1,4 % de ces éléments dans le génome. D'un autre côté, l'intégrase favorise modérément le début des gènes, contrastant avec les rétrovirus qui les favorisent fortement (576).

Chaque type de cellule présente un patron unique de sites d'intégration, dont chaque site apparaît à sa propre fréquence. Cependant, il existe une exception pour plusieurs dizaines de sites qui ressortent dans plus d'un type cellulaire humain ou murin à fréquences variables. Quelques points chauds d'intégration sont présentés ici. Ils présentent un intérêt pour la thérapie cellulaire ou génique dans les muscles, car ils sont prévisibles. Le site chr8p22 présente un intérêt, car il a été aperçu dans les myoblastes humains (361), mais aussi dans d'autres cellules, comme les kératinocytes primaires (595), les HEK293 (574), les HepG2 (576) et les cellules du cordon ombilical (585). Un autre point chaud, le 19q13.31, a été observé avec une fréquence de ~7,5 % dans les HEK293, 407 et HepG2 (574, 576), mais aussi à 8,7 % dans les Huh-7 et HCT116 (598).

Les deux sites chr19q13.31 et chr8p22 se retrouvent dans les introns des gènes *ZNF223* et *DLCI* respectivement. Pour le gène *ZNF223*, aucune fonction ne lui a encore été accordée, mais l'intégration dans ce site ne cause pas de changement d'expression du gène (585). Quant à *DLCI*, il est un gène suppresseur de tumeur, dont la diminution de l'expression est souvent

associée à divers types de cancers, incluant hépatiques, mais aucun relié aux muscles (pour revue, (603)). L'intégration a peu de risques d'affecter le promoteur du gène, car il se trouve à environ 340 kb de celui-ci. En effet, l'intégration dans l'intron du gène ne modifie pas son niveau d'expression (585). Par conséquent, le potentiel oncogénique du site chr8p22 est faible.

Chez la souris, le site mpsL1 se trouve dans une longue répétition de séquences. Il ressort fréquemment des analyses de position dans un large éventail de types cellulaires tels que les hépatocytes (573, 598, 599, 600), dans les cellules épithéliales de poumons MLE12 (604), dans des cellules progénitrices de neurones (605), dans les cellules embryonnaires de souris (584, 606) et dans les muscles *in vivo* (607, 608). Le potentiel oncogénique de ce site n'a pas été étudié spécifiquement. Étant très fréquent, il est peu probable qu'il soit oncogénique, car aucune étude ne fait état de développement de tumeur causée par l'intégrase spécifiquement (609).

1.7.5 L'innocuité de l'intégrase

Des analyses sur l'intégration montrent que les sites choisis par l'intégrase posent un faible risque d'activation de proto-oncogènes et ce, dans plusieurs types de cellules (576, 610). Des tests de biosécurité ont montré que dans des cellules primaires humaines du cordon ombilical < 5 % des événements d'intégration se produisaient dans les exons et que ≤ 2 copies des transgènes étaient intégrées par site. L'analyse de 11946 ARN transcrits d'une population mélangée de clones montre que l'expression de 96,5 % des gènes n'a pas été altérée (585). Seulement 1,3 % des gènes étudiés ont vu leur expression varier de plus de 2 fois. Parmi les 151 gènes, dont l'expression est altérée, 15 ciblent des proto-oncogènes. De ceux-là, trois sont des gènes suppresseurs de tumeurs, dont la surexpression causerait la mort cellulaire, réduisant par conséquent, le biorisque lié à l'activation oncogénique. La mutation aléatoire de l'intégrase

a permis d'augmenter davantage la spécificité et l'efficacité pour certains sites, ce qui la rend encore plus sécuritaire (597, 611).

Bien que plusieurs études défendent l'innocuité de l'intégrase (voir précédemment et suite), trois études montrent dans les Huh7, HCT116 et dans les fibroblastes primaires que des translocations peuvent se produire suite à l'intégration (598, 612, 613). L'analyse de plusieurs clones dans ces études a permis de quantifier les translocations induites par l'intégrase à environ 15 à 35 % des clones analysés, ce qui est très élevé. Dans les cellules primaires de cordon ombilical, une fréquence de translocation de seulement 1,3 % (4 sur 300 métaphases) a été constatée (585). Actuellement, on ignore pourquoi les fréquences de translocation varient autant parmi les différents types cellulaires étudiés. Dans le cas de cellules musculaires, on ignore quelle est la fréquence de ces translocations.

Pour déterminer le risque que des translocations ou des insertions à l'intérieur d'un gène activent un proto-oncogène, un modèle de souris, dont l'expression *c-myc* est inductible, a été employé pour faciliter le développement de tumeurs. Lorsque l'expression de *c-myc* est induite les souris développent des tumeurs hépatiques. L'injection hydrodynamique dans la circulation d'une solution saline favorise à elle seule le développement des tumeurs puisqu'elle causerait des dommages et stimulerait la prolifération cellulaire. Quant à l'injection de l'intégrase avec le plasmide *attB*, elle ne favorise pas plus le développement des tumeurs. Ces données suggèrent qu'*in vivo*, l'expression de l'intégrase n'entraîne pas et ne précipite pas le développement de tumeurs pendant la période étudiée (609).

1.7.6 L'efficacité de l'intégrase pour la thérapie génique contre la DMD

Chez la souris, l'injection du *tibialis anterior* (TA) à l'aide de plasmides, encodant le facteur endothélial de croissance vasculaire (VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*) et l'intégrase, permet la production du facteur de croissance pendant au moins 40 jours à un niveau 1,4 fois plus élevé que le niveau basal (608). Ces résultats montrent la possibilité d'exprimer à moyen terme un facteur de croissance avec l'aide de l'intégrase.

Dans le TA de la souris *mdx*, l'électroporation de deux plasmides, l'un contenant l'*attB* et une cassette d'expression de la dystrophine, et l'autre encodant l'intégrase, permet d'exprimer la dystrophine dans environ 15 à 20 % des fibres du muscle. À six mois postélectroporation, 55 ± 31 et 164 ± 41 fibres sont positives à la dystrophine en absence ou en présence de l'intégrase, respectivement. Le niveau de l'expression de l'ARNm de la dystrophine est 8 fois plus élevé en présence de l'intégrase. Un plasmide, encodant la luciférase, a été coélectroporé avec un plasmide encodant l'intégrase et un plasmide encodant une cassette d'expression de la dystrophine (transportant aussi un site *attB*). La diminution du signal luciférase est moins prononcée pendant 6 mois et la différence de signal avec et sans dystrophine atteint ~ 2 log. Ces données suggèrent que l'expression de la dystrophine a un effet protecteur sur le muscle. Elle réduirait les dommages découlant de la pathologie en entraînant une perte plus lente du plasmide luciférase. Cette observation est corroborée par la prise du colorant bleu Evans dans les fibres endommagées qui est réduite ~ 8 fois en présence d'intégrase (5,2 % des fibres). De plus, les fibres positives à la dystrophine sont $\sim 2,8$ fois plus longues en présence de l'intégrase, un signe qu'elles sont en meilleure santé et probablement plus puissantes. L'ensemble des résultats de l'étude démontre le potentiel thérapeutique de l'intégrase pour exprimer la dystrophine à long terme dans le modèle murin de la DMD (607).

Malgré la pertinence et la qualité exceptionnelle de cette étude, il n'en demeure pas moins que beaucoup d'éléments demeurent sans réponses. Les sites d'intégration n'ont pas été analysés, ni l'efficacité d'intégration évaluée. Dans les fibres multinucléées, on ne sait pas combien de noyaux doivent intégrer la cassette de la dystrophine pour devenir positives à la dystrophine, ni pour avoir un effet thérapeutique. On ne connaît pas non plus l'efficacité d'intégration dans les cellules satellites musculaires. De plus, l'expression de la dystrophine observée dans 164 des fibres (sur environ 1700) est fort probablement insuffisante pour avoir un gain significatif de force musculaire.

1.7.7 Les autres applications thérapeutiques

L'utilisation de l'intégrase s'est avérée prometteuse dans plusieurs modèles de maladies d'origine génétique: l'hémophilie de type B (déficiency en FIX, (573, 600)), l'épidermolyse bulleuse héréditaire (595), la tyrosinémie héréditaire de type I (599) et la DMD (358, 361, 607). Deux avantages principaux de l'utilisation de l'intégrase, ressortent de ces études de thérapie génique et cellulaire. L'intégration stabilise l'expression d'un gène thérapeutique au moins 6 mois *in vivo*. Dans les cas étudiés, elle permet aussi de corriger la pathologie. D'autres applications de l'intégrase s'avèrent prometteuses pour des maladies : associées aux articulations (614), oculaires (615), vasculaires périphériques (608) et pulmonaires (604).

1.8 *Les promoteurs musculospécifiques*

1.8.1 Des avantages pour la thérapie génique contre la DMD

La régulation précise de l'expression du transgène, par un promoteur musculospécifique, peut s'avérer un élément clef dans le succès d'un traitement. L'expression ectopique d'une protéine thérapeutique dans tout l'organisme peut être toxique, susciter une réponse immunitaire, entraîner des effets secondaires chez le patient et diminuer l'effet et/ou la durée du traitement. Il y a donc un attrait à créer des promoteurs tissus-spécifiques pour la thérapie génique.

Dans l'environnement musculaire dystrophique, les nombres de macrophages et de cellules dendritiques sont augmentés de 20 et 7 fois, respectivement, par rapport aux muscles sains (pour revue, (493)). S'ajoute aussi le fait que comme la plupart des cellules, les fibres musculaires produisent aussi des cytokines pro-inflammatoires augmentant davantage l'inflammation. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes circulant dans le muscle peuvent activer des lymphocytes T dans le ganglion proximal (pour revue, (616)). L'environnement du muscle dystrophique est donc très susceptible à entraîner une réponse immunitaire après l'injection d'un HD (encodant la dystrophine) à cause de l'abondance des cellules immunitaires et de l'inflammation. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes pourraient déclencher une réponse cytotoxique (via lymphocytes CD8+) ou humorale (via lymphocytes CD4+ et lymphocytes B) contre le transgène (pour revue de l'activation des lymphocytes, (617)). En effet, si l'organisme n'a jamais vu la dystrophine, certains peptides de la protéine seront exposés à la surface cellulaire et ils seront perçus comme du non-soi par le système immunitaire. Par conséquent, le bénéfice thérapeutique d'un promoteur musculospécifique sera notable, car il permettra de restreindre l'expression de la dystrophine uniquement aux fibres musculaires et non aux cellules spécialisées dans la présentation d'antigène.

L'attrait principal des promoteurs viraux est probablement leur activité généralement supérieure aux promoteurs cellulaires. Les promoteurs viraux, comme le CMV et possiblement le CAG (contenant l'*enhancer* immédiat du CMV et le promoteur de l'actine β aviaire), contiennent des CpG qui peuvent être méthylés après transfert génique. La méthylation des CpG peut conduire à l'atténuation du promoteur, ce qui peut diminuer la durée d'expression d'un transgène. L'injection intramusculaire d'un vecteur adénoviral de première génération, contenant le promoteur CMV et une séquence encodant le facteur de croissance FGF-4, conduit également à une perte d'expression, jusqu'à 385 fois de l'ARNm du transgène sur une période de 28 jours en considérant la perte de l'ADN du vecteur. Brooks *et al.* ont analysé le patron de méthylation de l'ADN du promoteur CMV et ils ont trouvé que l'*enhancer* était fortement méthylé, soit jusqu'à 70 % des cytosines présentes (618). L'utilisation d'inhibiteur de méthylases peut rétablir l'expression d'un transgène (619).

La méthylation des histones a également été observée chez des souris transgéniques qui contiennent le promoteur CMV. Les marques de méthylation H3K9 et H3K27 sont déposées sur l'histone dans certains tissus, correspondant généralement à de la chromatine peu active transcriptionnellement. La protéine *Methyl CpG binding protein 2* (MeCP2) s'associe également au promoteur. MeCP2 est un recruteur des déacétylases d'histones et de la transférase de méthyle H3K9. Quant à la marque H3K4, associée à une transcription active ou en voie d'activation, elle demeure toujours présente au promoteur. Il est donc possible que le promoteur soit prêt à être réactivé (620).

L'activité du CMV peut être régulée par les niveaux de cytokines. Une augmentation des niveaux de l'interféron γ entraîne des diminutions d'expression (621, 622). Ce scénario pourrait se produire dans les muscles dystrophiques de patients DMD puisque l'on retrouve des hauts niveaux de cytokines par rapport aux muscles normaux. L'inhibition de l'activité du CMV pourrait potentiellement nuire à l'expression d'un gène thérapeutique. Un promoteur

musculospécifique, utilisé dans le cadre de la DMD, doit permettre une expression à long terme, être spécifique et puissant même dans un contexte, où l'inflammation est élevée.

1.8.2 Les promoteurs muscles spécifiques

Plusieurs promoteurs musculospécifiques ont été développés dans le cadre de la thérapie génique. Certains se comparent en force à de puissants promoteurs tels que le CMV ou le CAG (ou encore appelé CB) dans les muscles. La plupart de ces promoteurs musculospécifiques ont une petite taille (sauf pour le promoteur de la desmine), ce qui est avantageux, car ils peuvent s'insérer dans le rAAV. Puisqu'ils sont musculospécifiques, ils dirigent l'expression d'un transgène préférentiellement dans le tissu musculaire, ce qui peut avoir plusieurs avantages (voir la section 1.8.1). Mon équipe a produit deux promoteurs musculospécifiques particulièrement intéressants (623). Les promoteurs les plus prometteurs (incluant ceux de mon équipe) sont décrits dans les paragraphes qui suivent.

À partir d'une librairie, constituée de plusieurs éléments typiques retrouvés dans plusieurs promoteurs / *enhancer* des gènes musculaires, l'équipe de Li *et al.* 1999 ont fait un assemblage aléatoire de ces séquences. Plusieurs promoteurs sont ressortis gagnant de cette étude. Parmi ceux-là, le promoteur SPc5-12 (312-pb) est d'environ 6 à 8 fois plus puissants que le CMV après injection intramusculaire de plasmides encodant la luciférase (624).

Plusieurs promoteurs ont été générés à partir du promoteur de la créatine kinase musculaire (MCK, *Muscle Creatin Kinase*). Le premier développé est le CK6 (625). Il est constitué d'*enhancers* du promoteur MCK et les séquences du promoteur minimal, pour une taille inférieure à 600 pb. Il atteint 12 % de la force du CMV dans le *tibialis anterior* lorsque livré par un vecteur adénoviral de première génération. Dans une autre étude (626), le même

promoteur atteint le niveau du CMV dans le muscle lorsque livré par un rAAV. Il est peu actif dans les cellules dendritiques et hépatiques. Une autre étude a permis de détecter l'expression d'un transgène jusqu'à 4 mois après l'injection d'un vecteur adénoviral de première génération. Toutefois, le promoteur est peu actif dans le cœur en comparaison au CMV, mais il est assez fort dans le muscle (627).

Un autre promoteur, beaucoup plus long celui-ci est celui du gène de la desmine. Il fait 1,7 kb et démontre de l'activité dans les muscles squelettiques, cardiaque et lisses (326, 628, 629). Utilisé pour réguler l'expression dans un vecteur lentiviral, il rivalise en puissance avec le promoteur CMV (326).

Le promoteur MHCK7 (770-pb) est comparable en force au CMV et au RSV (*Rous Sarcoma Virus*). Il est constitué de l'*enhancer* du MCK, de l'*enhancer* des chaînes lourdes de la myosine α et du promoteur proximal de MCK. Le MHCK7 est actif dans plusieurs muscles, dont le cœur, le diaphragme et les muscles squelettiques. Quant à son activité dans les cellules dendritiques JAWSII, elle n'est pas détectable. La livraison systémique d'un rAAV6, contenant une microdystrophine régulée par MHCK7, permet d'exprimer le transgène pendant au moins 10 semaines dans près de 100 % des fibres (cœur, quadriceps et diaphragme) des souris *mdx* adultes (210).

Un autre promoteur, issu de la trimérisation de l'*enhancer* du MCK (tMCK, ~720 pb), dépasse en activité le niveau d'expression du CMV de 4 fois dans les muscles (626) un mois après l'injection d'un rAAV2. Ce promoteur a une préférence pour les fibres rapides et il n'exprime à peu près pas le transgène dans le cœur. Dans la même étude, l'ajout de l'*enhancer* du MCK au promoteur SPc5-12 (624) augmente de 2 à 3 fois l'expression de la microdystrophine jusqu'à trois mois postinjection. De plus, le promoteur n'a pas de préférence de type de fibre

permettant l'expression dans tout le muscle cardiaque et les muscles squelettiques. Cette caractéristique est utile dans le traitement de la DMD.

1.8.3 La régulation du promoteur endogène de la troponine I

Lors du développement foetal chez les rongeurs, l'expression des deux isoformes de la troponine (TnIS et TnIF) n'est pas encore ségréguée entre les fibres lentes et rapides (630, 631). Dans le cœur, la TnIS est exprimée seulement durant l'embryogenèse pour disparaître au détriment de l'isoforme cardiaque (632). Après la naissance, le niveau de troponine I augmente dans les muscles squelettiques suite à l'innervation par les motoneurons (633). Plusieurs essais de délétions dans la région en aval et en amont du gène ont permis de trouver deux séquences régulatrices. Un élément de régulation a été trouvé dans le premier intron du gène de caille (634) permettant l'expression spécifique du TnIF dans les fibres rapides. Un autre élément (SURE, *Slow Upstream Regulatory Element* et appelé USE, *Upstream Slow Enhancer* (623)) confère la spécificité aux fibres lentes de l'isoforme TnIS. L'élément SURE a été trouvé en amont du gène de rat (635) et il est conservé chez l'humain (636, 637).

Dans le SURE de rat (section 4.4.1, *Figure 4-1*), cinq motifs différents sont retrouvés en 5' vers 3' du promoteur. Le premier est un motif de type bicoïde, le BLM (*bicoid-like motif*). Selon Calvo *et al.*, cette séquence consensus serait liée par le facteur général de transcription GTF3 ou MusTRD1 (631, 638), son orthologue humain (*Muscle TFII-I Repeat Domain containing protein 1*). GTF3 est similaire à TFII-I (*transcription factor II-I*) en structure et pourrait avoir plusieurs partenaires. L'expression de GTF3 entraînerait la répression directe ou indirecte de la transcription du gène *TnIS* dans les fibres rapides, mais le mécanisme précis est inconnu. Si le motif BLM est retiré, l'expression de la troponine I lente n'est plus restreinte aux fibres lentes, pouvant ainsi, être exprimée dans les fibres rapides (631).

Le deuxième le motif dans l'élément SURE est le CAGG qui est actuellement orphelin en facteur de liaison connu. En 3' se trouve un motif CACC lié par les facteurs de transcription Sp1, un site MEF-2, lié par MEF-2 et une boîte E (*E-box*) qui peut accueillir la MyoD/myogénine. Ces trois motifs sont suffisants pour conférer la spécificité aux muscles et joue le rôle d'*enhancer* chez le rat (631, 633). La myoD/myogénine et MEF-2 agissent souvent ensembles et occupent un rôle important dans le programme de différenciation des myoblastes en tissu musculaire (639).

1.8.4 Les promoteurs musculospécifiques USE et ΔUSE

En 2010, notre laboratoire a publié un article sur un promoteur musculospécifique issu du gène de la troponine I lente humaine ((623), brevet soumis (640)). Chez l'homme, la séquence régulatrice de l'expression de la TnIS se retrouve dans une portion de 164 pb situés en amont du gène humain (-1036 pb to -873 pb, USE). L'élimination des motifs CAGG et surtout BLM (-940 pb à -873 pb, ΔUSE) retire la spécificité de l'isoforme TnIS aux fibres lentes chez le rat (631). Globalement, le nombre d'éléments USE et ΔUSE multimérisés augmente la force du promoteur minimal de la TnIS. La nomenclature des promoteurs est telle quelle : ils sont appelés par leur élément, leur nombre de copies et ils comprennent le promoteur minimal de la TnIS (-95-pb à +56-pb) en plus du premier intron du virus SV40 (*Simian virus 40*) pour stabiliser l'expression du transcrit (641).

L'électroporation du *tibialis anterior* avec un plasmide encodant la β-galactosidase, régulée par les promoteurs USEx3 et ΔUSEx3 (contenant trois copies du USE et ΔUSE respectivement) permet d'obtenir l'expression de la β-galactosidase dans 15 % des fibres des souris adultes. En utilisant cette méthode, leur force est comparable au promoteur CMV. Le muscle TA est constitué jusqu'à 95 % de fibres rapides (635), ce qui suggère que les deux promoteurs sont actifs dans les fibres rapides. L'électroporation de ces constructions dans le

soleus de souris, un muscle constitué de fibres lentes et rapides, montre une activité indépendante du type de fibre. Pour expliquer cette observation, il a été proposé que la multimérisation des éléments USE pourrait déréguler la spécificité de l'expression dans les fibres rapides, mais pas la spécificité aux muscles (623).

Dans l'optique d'optimiser l'expression de la dystrophine (pour la thérapie génique de la DMD), USEx3 et Δ USEx3 présentent des avantages importants, car ils sont capables d'exprimer fortement un transgène dans les fibres rapides et lentes, ainsi que d'être peu actif par rapport au CMV dans les autres tissus (623). Les deux promoteurs (USEx3 et Δ USEx3) s'équivalent en force et en spécificité dans le contexte d'un plasmide, mais le Δ USEx3 est un peu plus court (504 pb vs < 800 pb). De plus, le promoteur peut être encore réduit (à 352 pb) en éliminant des séquences inutiles ajoutées lors des clonages. Sa petite taille présente un avantage notable pour l'AAV puisqu'il possède une faible capacité d'encapsulation (623).

Chapitre 2

2 Problématique générale

La DMD est caractérisée par une dégénérescence progressive des muscles cardiaques et squelettiques. Elle est le résultat de mutations dans le gène de la dystrophine qui entraînent l'absence de la dystrophine fonctionnelle des fibres musculaires, ce qui fragilise le muscle. L'une des pistes envisagées pour traiter la DMD est d'insérer dans les muscles une copie du gène de la dystrophine à l'aide d'un vecteur viral. Parmi les nombreux types de vecteurs viraux développés au cours des dernières années, le HD possède des propriétés très intéressantes pour ce type d'application. L'abolition complète des gènes de l'adénovirus le rend peu toxique, faiblement immunogénique et lui donne une capacité de transport d'à peu près 35 kb (pour revue, (457)). Ce dernier atout est particulièrement intéressant, car il est l'un des rares vecteurs viraux à pouvoir transporter l'ADN complet codant pour la dystrophine (12 kb). Il a été démontré que l'injection du vecteur dans le muscle mitigeait la pathologie pendant au moins 1 an chez la souris *mdx* (déficiente pour la dystrophine). Par contre, à partir de 6 mois suivant l'injection, l'expression de la dystrophine diminuait progressivement, compromettant l'efficacité de la thérapie à plus long terme (467, 468). Les causes de cette diminution ne sont pas claires, mais des indices nous pointent vers deux pistes possibles (voir les deux prochaines sections). Pour développer un traitement durable et administré qu'une seule fois chez le patient, il faudrait stabiliser l'expression de la dystrophine dans les muscles.

2.1 *L'intégration de l'ADN du HD, hypothèse de travail et objectifs*

Le premier indice provient du dosage de l'ADN du HD dans les muscles. Dans l'étude mentionnée ci-haut, la quantité d'ADN chutait d'au moins 5 fois pendant un an (467, 468). Il est connu qu'après la transduction, l'ADN du HD va dans le nucléoplasme des cellules transduites pour y rester sous forme épisomale (pour revue, (481)). Étant donné que le HD est non répliatif et que le muscle dystrophique est graduellement remplacé (par les cycles de destruction et de régénération, section **1.1.3**), il serait possible que l'ADN du vecteur se dilue au fil du temps. Il est aussi possible que l'ADN du HD dans le nucléoplasme est progressivement dégradé ou que des phénomènes épigénétique (voir plus bas) inhibent sa transcription. La nature épisomique du vecteur pourrait expliquer en partie la réduction de l'expression de la dystrophine. Une solution envisageable serait d'intégrer le HD dans les chromosomes cellulaires pour maintenir l'expression de la dystrophine dans le muscle. Cette approche a été utilisée maintes fois pour stabiliser l'expression d'un transgène (354, 355, 361, 607). L'intégration serait particulièrement utile dans les cellules satellites puisqu'elles sont des acteurs majeurs de la régénération musculaire (642) et qu'elles migrent beaucoup (643) (élargissant l'effet du traitement, voir section **1.1.4**). L'intégration de l'ADN du HD permettrait sa répliation au moment de la division cellulaire.

L'intégrase du phage Φ C31 est utilisée couramment pour intégrer des plasmides dans le but de stabiliser l'expression d'un transgène. Elle dirige spécifiquement l'intégration dans un groupe restreint de sites présents dans le génome (entre 100 et 1000, voir section **1.7**, (574)). Plusieurs études indiquent que l'intégrase est sécuritaire. Une analyse détaillée de plusieurs dizaines de sites a révélé que très rares étaient ceux situés près de proto-oncogènes (576). De plus, l'expression normale des gènes a été constatée à proximité du site d'intégration (585). Aucune tumeur n'a encore été rapportée *in vivo* due à l'utilisation de l'intégrase (609). Pour tous ces avantages, l'intégrase est un bon choix pour intégrer un fragment d'ADN de façon sécuritaire. Comme le génome du HD, au même titre que le plasmide, il est constitué d'ADN, *j'ai alors*

émis l'hypothèse que l'ADN du HD pouvait être intégré à partir de l'intégrase du phage $\Phi C31$. Cette hypothèse est le fondement de ma première étude (Chapitre 3).

Les objectifs de cette étude sont :

- 1) Démontrer la capacité de l'intégrase $\Phi C31$ à intégrer le HD dans les chromosomes cellulaires.
- 2) Bien caractériser le système en déterminant son efficacité, sa spécificité, son innocuité et son mécanisme d'intégration.
- 3) Évaluer la faisabilité de cette approche pour la thérapie génique

2.2 L'expression musculospécifique, hypothèse de travail et objectifs

Au fil du temps, les cellules eucaryotes ont développé des mécanismes cellulaires efficaces pour contrer l'expression des gènes viraux. La méthylation de l'ADN, la modification des histones, le recrutement de répresseurs ont déjà été observés dans le cas de promoteur viraux (618, 644, 645) (pour revue, (646)). Dans l'étude présentée plus haut (467, 468), un puissant promoteur hybride (CAG) a été utilisé avec le HD pour réguler l'expression de la dystrophine. Hors, il est possible que le promoteur ait subi les effets du *silencing* (une atténuation de son activité) par les divers mécanismes introduits plus haut. Une solution envisageable contre le *silencing* est d'utiliser un promoteur cellulaire et musculospécifique (pour la DMD). Puisque le promoteur n'est pas dérivé d'un agent infectieux (construit plutôt à partir d'éléments actifs du muscle squelettique), il devrait être moins susceptible au *silencing*.

Le deuxième indice provient de l'analyse du sérum de souris *mdx* injectées avec le HD. Elle révéla la présence d'anticorps spécifiques contre la dystrophine (467, 468). N'oublions pas que le système immunitaire a pour rôle de protéger l'organisme contre les substances étrangères. Chez les souris déficientes en dystrophine, l'expression d'une copie fonctionnelle de la dystrophine, mais étrangère à l'organisme, engendrerait une réponse immunitaire. Une réponse similaire a déjà été observée chez l'humain à partir d'un AAV encodant une microdystrophine. L'expression était régulée par le promoteur ubiquitaire CMV (13). Étant donné que les promoteurs comme le CMV et CAG sont actifs dans les cellules professionnelles présentatrices d'antigènes (209, 647), ils pourraient déclencher une réponse immunitaire adaptative (pour revues, (616, 617)). Plusieurs études ont démontré que l'expression tissu-spécifique d'un transgène était un moyen efficace pour contourner la réponse immunitaire et pour prolonger la durée d'expression d'un gène thérapeutique (361, 493, 516) (pour revue, (648)).

Mon équipe a publié (623) et breveté (640) un nouveau promoteur musculospécifique (Δ USEx3) très puissant pour la thérapie génique. Δ USEx3 a été créé par la fusion de plusieurs éléments musculospécifiques en amont du gène de la *troponine I lente* (voir section **1.8.4**). Les éléments restrictifs aux types de fibres lentes ont été enlevés dans le but de rendre actif le promoteur dans tous les types de fibres (lentes et rapides). Le fait que Δ USEx3 soit constitué d'éléments endogènes très actifs dans les muscles, cela pourrait lui conférer une résistance au *silencing* dans les muscles. Plusieurs expériences ont démontré la spécificité musculaire de Δ USEx3 (623), même s'il reste encore à évaluer son activité dans les cellules spécialisées pour la présentation d'antigènes.

Bien que Δ USEx3 ait déjà été employé avec succès avec les plasmides auparavant (623), il n'a jamais été évalué dans le contexte de vecteurs viraux comme le HD et le LV. De par la nature des protéines associés à l'ADN (ou pro-ADN pour le LV) et de par l'organisation du génome viral (épisomique pour le HD et chromosomique pour le LV intégré), ces vecteurs viraux diffèrent largement des plasmides. Cela pourrait moduler l'activité d'un promoteur tissu-spécifique tel que le Δ USEx3. Ma deuxième étude (Chapitre 4) est fondée sur l'hypothèse suivante : *que l'efficacité et la spécificité du promoteur Δ USEx3 ne seront pas affectées par le type de vecteur utilisé (HD et du LV) et qu'il sera plus stable qu'un promoteur viral.*

Cette étude a pour objectifs :

- 1) *Déterminer si Δ USEx3 conserve sa force et sa spécificité dans le contexte du HD et du LV in vitro et in vivo.*
- 2) *Évaluer la stabilité de Δ USEx3 in vitro dans les chromosomes cellulaires suite à l'intégration d'un LV.*

Chapitre 3

3 Efficacy and site-specificity of adenoviral vector integration mediated by the phage Φ C31 integrase

Marc-André Robert^{1,2}, Yue Zeng^{1,5}, Benoît Raymond¹, Laurie Desfossé¹, Emilie Mairey¹, Jacques P. Tremblay³, Bernard Massie^{1,4} and Régnald Gilbert^{1,5}.

¹Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, Montréal, QC, Canada

²Programmes de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³Unité de génétique humaine, Centre de Recherche du CHUL, Université Laval, Québec, QC, Canada

⁴Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁵Neuromuscular Research Group, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montreal, QC, Canada.

Running Title: Adenovirus integration through Φ C31 integrase

Corresponding author: Dr Régnald Gilbert

All the materials presented in *Chapter 3* are protected by copyrights, a property of Mary Ann Liebert Publishers. Permission was granted for reproduction in this thesis.

This article has been published in *Hum Gene Therapy Methods*, see the reference (649).

Contributions à l'article

MAR : Design expérimental, réalisation des expériences, analyse des résultats, rédaction.

YZ : Réalisation de la figure 3-4 c et d

BR, LD, EM : Démarrage du projet et clonages des plasmides.

JTP: Idée originale, discussions productives menant aux essais de colonies.

BM : Design expérimental, discussion, gestion des ressources.

Rénald Gilbert : Idée originale, fonds de recherche, discussion, gestion des ressources, rédaction.

3.1 *Abstract*

Adenoviral vectors deleted of all their viral genes (helper-dependent [HD]) are efficient gene-transfer vehicles. Because transgene expression is rapidly lost in actively dividing cells, we investigated the feasibility of using phage Φ C31 integrase (Φ C31-Int) to integrate an HD carrying an attB site and the puromycin resistance gene into human cells (HeLa) and murine myoblasts (C2C12) by co-infection with a second HD-expressing Φ C31-Int. Because the HD genome is linear, we also investigated whether its circularization, through expression of Cre using a third HD, affects integration. Efficacy and specificity were determined by scoring the number of puromycin-resistant colonies and by sequencing integration sites. Unexpectedly, circularization of HD was unnecessary and it even reduced the integration efficacy. The maximum integration efficacy achieved was 0.5% in HeLa cells and 0.1% in C2C12 myoblasts. Up to 76% of the integration events occurred at pseudo attP sites and previously characterized hotspots were found. A small (two- to three-fold) increase in the number of γ -H2AX positive foci, accompanied by no noticeable change in γ -H2AX expression, indicated the low genotoxicity of Φ C31-Int. In conclusion, integration of HD mediated by Φ C31-Int is an attractive alternative to engineer cells, because it permits site-specific integration of large DNA fragments with low genotoxicity.

Traduction du résumé

Les vecteurs adénoviraux sans gène viral (HD) sont des véhicules très efficaces pour le transfert génique. Toutefois, l'expression d'un transgène avec le HD est rapidement perdue dans les cellules en division. Dans cette étude, nous avons étudié la faisabilité d'employer une intégrase, celle du bactériophage Φ C31 (Φ C31-Int), pour accomplir l'intégration d'un HD dans les cellules humaines et dans les myoblastes de souris. Le HD transporte un site attB (reconnu par l'intégrase) et une cassette d'expression de la puromycine tandis qu'un second HD a été employé pour livrer Φ C31-Int. Étant donné que l'ADN du HD est linéaire, nous avons examiné la possibilité que sa circularisation par la Cre recombinase (livrée via un troisième HD) puisse affecter l'efficacité d'intégration. L'efficacité et la spécificité d'intégration ont été mesurées en comptant le nombre de colonies résistantes à la puromycine et en séquençant les sites d'intégration respectivement. De façon inattendue, la circularisation de l'ADN du HD a réduit son efficacité d'intégration. Le maximum d'efficacité d'intégration obtenu a atteint 0,5 % dans les cellules HeLa et 0,1 % dans les myoblastes C2C12. Jusqu'à 76 % des événements d'intégration ont eu lieu de façon spécifique à des sites pseudo attP et dont plusieurs sont connus comme étant des endroits plus propices à l'intégration. Une légère augmentation (2 à 3 fois) du nombre de foci positifs à γ -H2AX (sans changement d'expression apparent) indique une faible génotoxicité en présence de Φ C31-Int. En conclusion, l'intégration du HD par Φ C31-Int est une méthode intéressante pour l'ingénierie cellulaire parce qu'elle permet l'intégration site-spécifique de très long fragments d'ADN de façon peu génotoxique.

3.2 *Introduction*

Stable insertion of exogenous DNA within the cell chromosomes has several important applications in fundamental research and applied biotechnology. One of the simplest methods to integrate a DNA fragment (usually a plasmid) into the chromosomes is by transfection. A major limitation of this approach is the relatively low (and highly variable) integration efficacy found among different cell types with a frequency of approximately 10^{-3} per transfected cell (650). The integration occurs randomly (651) and therefore makes the sites of integration unpredictable. Additional limitations are: some cells can be very difficult to transfect and transfection efficacy decreases with the plasmid size (652). The most efficient method to integrate a gene of interest is by means of retroviral vectors (653, 654). Retroviral vectors derived from lentivirus (lentiviral vectors), can integrate their DNA into both dividing and non-dividing cells; whereas those derived from simpler oncoretrovirus require breakdown of the nuclear envelope during mitosis. One disadvantage of retroviral vectors is their functional limited transport capacity of about 6-7kb (312). Integration occurs nonspecifically, often (depending of the vector type) with a strong bias towards active transcription units (655).

One of the most popular vectors for gene transfer and gene therapy applications is derived from adenoviruses. Adenoviral vectors (Ad) readily transduce both dividing and non-dividing cells. The first generation of Ad developed (E1-deleted) retained most of its viral genes and exhibited limited transport capacity comparable to retroviral vectors. Subsequent improvement was achieved using Ad devoid of all viral genes (referred to as helper-dependent, [HD] or gutless). The absence of viral genes reduces the toxicity of HD and allows for a substantial increase in transport capacity of up to 35-kb (656). For this reason, HD is an ideal vehicle for large cDNA segments, such as dystrophin, multiple copies of an expression cassette, entire loci and native promoter elements. The normal life cycle of adenovirus does not involve its integration into the chromosome. Consequently, although vectors derived from this virus, such as HD, provide sustained expression in non-mitotic tissues such as adult liver and skeletal

muscle, expression is rapidly lost in actively dividing cells, due to the episomal nature of the vector. Nevertheless, a low level of random (also termed heterologous or basal) integration of Ad (frequencies ranging from 10^{-5} to 10^{-2} per cell) has been documented in mammalian cells (532, 533, 534, 535).

The *Streptomyces* Φ C31 phage produces a site-specific integrase (Φ C31-Int) widely used as a genome engineering tool. In nature, it mediates efficient recombination between two attachment sites, *attB* and *attP*, which are present on the bacterial and phage genome, respectively (581). Minimal functional sizes are 34-bp and 39-bp respectively (586). The recombination results in the integration of the phage genome into the bacterial chromosome. Interestingly, Φ C31-Int is also active in mammalian cells and no additional protein is necessary to promote integration. When a plasmid containing an *attB* site is introduced into a mammalian cell that expresses Φ C31-Int, this enzyme mediates integration of the plasmid into the chromosomes at specific sites known as pseudo *attP* sites. These sites share homology with the wild-type *attP* site (574, 576). Although 100-1000 pseudo *attP* sites are predicted to exist in the human chromosomes, the integration is biased towards only a limited number of sites. Additional factors inherent to the cell type and transfection conditions also affect the ability of Φ C31-Int to promote integration (588, 589). The frequency of integration obtained with this integrase varies from 10^{-5} to 10^{-1} integration events per cell (361, 574, 585, 595, 596, 598). The site-specific integration of Φ C31-Int has been successfully exploited to stably modify the genome of cells *in vitro* and to provide stable gene expression in various tissues of the body for gene therapy applications (358, 572, 583, 595, 600, 607).

In the present study, we investigated the efficacy and site-specificity of Φ C31-Int mediated integration of HD into mammalian cells. Our objective was to develop a vector with the valuable properties of HD (e.g. large cargo space, high-titers, good transduction efficacy, physical stability), with the added benefit of safe integration (through targeted integration) in order to provide long-term expression in actively dividing cells. Since the HD genome consists

of a linear double stranded DNA, and previous experiments with Φ C31-Int in mammalian cells were performed with circular templates (plasmids and in one case with a circularized HD (572)), we compared the integration efficacy of HD mediated by Φ C31-Int using linear and circularized HD genomes. We showed that the integration efficacy and specificity for pseudo *attP* sites were maintained in the context of HD in human and murine cell lines with minimal toxicity. Most importantly, we demonstrated that circularization of the HD genome was unnecessary and furthermore that integration of the linear HD was more efficient. We conclude that targeted integration of HD mediated by Φ C31-Int is a valuable alternative to plasmid DNA when a large cargo is needed or for cells and tissues that are difficult to transfect.

3.3 *Materials & methods*

3.3.1 Cell culture

HeLa, HEK 293 and 293FLPe cells (a generous gift of P. R. Lowenstein, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA) (450) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM L-glutamine and 5% fetal bovine serum. C2C12 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 2 mM L-glutamine and 10% fetal bovine serum. HeLa, HEK293 and C2C12 were purchased from ATCC (Manassas, VA). Medium and cell culture reagents were bought from HyClone Laboratories Inc.

3.3.2 Construction of plasmids and Φ C31-int expression

DNA constructs were produced using standard molecular biology methods. Restriction and DNA-modifying enzymes were purchased from New England Biolabs. To construct a plasmid

(pGFPattB) necessary to produce HD-GFPattB, we first cloned two *loxP* sites into pCBDysFl (497). To clone the first site, a linker containing the *loxP* sequence was inserted into the unique SpeI site. Another linker was inserted into the unique SalI site to form the second *loxP* site. The *attB* site from pTA-attB (586) was excised by SalI digestion and cloned into the SalI site of pCBDysFl. The green fluorescent protein (GFP) and rabbit β -globin polyA sequences were amplified by PCR from pAdCMV5-GFPq (657) with specific primers (5'-TATAACGCGTGCCACCATGGCTAGCAAAGGAG-3'; CACGACGCGGTGCGCGTAATATTTGTCTAGG-3') and cloned into the MluI site downstream of the CAG promoter. The puromycin expression cassette was excised from pPur (Clontech Laboratories Inc.) using PvuII and BamHI and then blunt-ended using T4 DNA polymerase. This fragment was cloned between the blunt-ended NsiI and SphI sites in pCBDysFl. The addition of c-myc and NLS to Φ C31-Int integrase was done by PCR using primers (5'-GGACTAGTGCCACCATGGAGCAAAGCTCATTCTGAAG-AGGACTTGAATATGACACAAGGGGTTGTGACCG-3'; and 5'-CCGCGGATCCTCTAGACCTCCTCTTCTTCTTAGGCGCCGCTACGTCTTCCGTGCC-3') and pCMV-Int (586) as the template. The PCR product was used to replace Φ C31-Int in pCMV-Int. The resulting constructs were named pCMV-Int(nls) containing both c-myc and NLS, and pCMV-Int(myc) containing only the c-myc. For preparation of pInt(nls), pInt and pCre, an AscI linker (5'-AGGCGCGCCT-3') was first inserted into the SalI site of pCBDysFl. For cloning pInt(nls) a linker with AvrII and PacI sites (5'-CGCGTTTAATTAACCTAGGA-3') was inserted into the MluI site of pDysFl-AscI. pCMV-Int(nls) was digested by AvrII and PvuI and the fragment was cloned into the newly created AvrII/PacI sites of pCBDysFl-AscI. Cre recombinase was isolated from pBS39 (ATCC; Manassas VA) by PCR using primers (5'-CCGGGAATTCGCCAC-CATGTCCAATTTACTGACC-3' and 5'-TCCTGAATTCCTAATCGCCATCTT-CCAGC-3'). The PCR fragment was cloned into the EcoRI site of pIRES2-DsRed-Express (Clontech Laboratories). The Φ C31-Int gene was isolated from pCMV-Int and was inserted in pIRES2-DsRed-Express after digestion with BamHI and SacI. Two AscI sites were inserted flanking either Int-IRES2-dsRed-Express or Cre-IRES2-dsRed-Express. Removal of bicistronic genes using AscI digestion permitted cloning into MluI site of pCBDysFl-AscI thus generating pInt and pCre.

The intracellular localization of Φ C31-Int(myc) and Φ C31-Int(nls) was detected by immunofluorescence microscopy. HEK293 cells were transfected with pCMV-Int(myc) or pCMV-Int(nls) using Lipofectamine 2000TM (Invitrogen). Forty-eight hours post-transfection, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with 0.5% Triton X100 and reacted with a myc-tag monoclonal antibody (Clone 9E10, Sigma-Aldrich Canada Ltd) and with a FITC-conjugated anti-mouse secondary antibody. Nuclei were stained with HOECHST 33342 (Sigma-Aldrich Canada Ltd.). Gene expression was detected by Western blotting of lysate prepared from transfected cells. The blots were probed with the myc-tag antibody followed by a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Amersham Biosciences). The signal was detected by chemiluminescence using the ECL Western blotting detection reagents (Amersham Biosciences) and exposed to X-ray films.

3.3.3 Production of HD

The procedure to prepare HD carrying two expression cassettes has been described previously (468, 469, 497). We used a similar procedure to produce HD-GFPattB, HD-Int(nls), HD-Int, and HD-Cre by self-ligation of the expression cassette, stuffer DNA, and inverted terminal repeats (ITR) derived from pGFPattB, pInt(nls), pInt, and pCre respectively. After self-ligation, the DNAs were transfected on 293FLPe cells and HD were passaged using 293FLPe and the helper virus (FL helper), as described (450, 658). The construction and production of HDCB-lacZ-ITR, which encodes two copies of the gene for β -galactosidase, has been described previously (658). For amplification of HD-GFPattB, we used helper virus named H-FRT-RFP. It is similar to FL helper, except it contains the E3 region and a dsRed expression cassette within its E4 region, which was deleted, except for the ORF6 region (unpublished data). The construction of this helper virus will be described elsewhere. HD-GFPattB was purified using two continuous CsCl gradients (659) and desalted via a NAP-25 column (GE Healthcare Biosciences AB). Other HDs were purified directly from cell lysates

with the Vivapure Adenopack 20TM columns (Sartorius Stedim Biotech GmbH). Vector stocks were stored at -80°C in 50 mM HEPES, pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, and 5% sucrose. The titer of each HD (transducing units [TU] per ml), except for HD-Int(nls) was determined by flow cytometry (LSRIITM, Becton Dickinson) at 48 hr post-infection of HEK293 cells in the presence of helper virus (FL helper) at a multiplicity of infection (MOI) of 5. To titer HD-Int(nls), an anti c-myc antibody coupled to FITC (Clone 9E10, sc-40 FITC, Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz) was used to stained positive cells prior flow cytometry. The contamination level by the helper virus of our HD preparation was determined by plaque assay on HEK 293 cells. The ratios of helper virus titer (plaque assay) relative to HD titer (flow cytometry) was 0.09 for the CsCl purified HD-GFPattB, and 0.46, 0.87, 0.83 for HD-Int, HD-Int(nls) and HD-Cre respectively.

3.3.4 PCR verification of HD-GFPattB circularization

1 X 10⁶ HeLa cells in 60 mm plates were infected using different combinations of HD-GFPattB (7.5 TU/cell) and HD-Cre (6 TU/cell). Two days after infection, a modified Hirt's extraction was performed. The cells were incubated in lysis buffer (10mM Tris, 10 mM EDTA pH 7.5, 1.0% SDS and 0.18 µg/ml proteinase K) for 4 hr incubation at 37°C, then 1/5 volume of 5 M NaCl was added at 4°C. The next day, phenol-chloroform extraction followed by ETOH precipitation was performed on supernatants. Dry DNA pellets were resuspended in TE pH 8.5. A PCR reaction was performed using primers 5'-GTCAGTCATCCAGGCTTACC-3' and 5'-CCGTGACCGTCGAGAA-3' flanking *loxP* sites and Taq polymerase (New England Biolabs). Circularization produced a 520-pb band that was gel-purified and sequenced (Molecular Biology Analysis Platform, Université Laval, QC, Canada).

3.3.5 Southern blot

5×10^6 HEK 293 cells in 10 cm plates were transduced with the HD in the presence of helper virus at an MOI of 5. The viral DNA was isolated from the infected cells after 48 hr (as described above), digested with restriction enzymes and separated on an agarose gel. The DNA was then transferred to a Hybond-N+ positively charged nylon membrane by capillarity (GE Healthcare Biosciences) under alkaline conditions. Southern blotting was performed according to Roche's procedures and reagents (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Chemiluminescence was detected on an Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Limited). The following primers were used to synthesize DIG-labeled probes: Stuffer 1, 5'-CGCTGCCTTGATATACAC-3' and 5'-GCTGACTGCTGGCAAA-3'; Stuffer 2, 5'-GCTTGTAAGTGCTCCC-3' and 5'-GCCAGTCGGTAAGTTC-3'; Stuffer 3, 5'-GGATTCAGGTACAGGAG-3' and 5'-GCCTTAGCCTGTGTAAC-3'; *attB* site, 5'-TACTCCACCTCACCCATCT-3' and 5'-GTTCGCCGGGATCAACTAC-3'; Φ C31-Int, 5'-TCTCGGAATTGCTCGCC-3' and 5'-ATGCGCTTACAAAGCC-3'; Cre, 5'-AATCCTGTAGGTGATTGGGCAG-3' and 5'-TATGCCTACAGCATCCAGGGTGAC-3'.

3.3.6 Integration efficacy of HD and plasmid by a colony assay

HeLa cells cultured in 12-well plates at 2.5×10^4 cells/well were transduced with HD-GFPattB ranging from 1 to 50 TU per cell. NotI was used to linearize pGFPattB. Circular and linear construct were transfected with an optimized ratio of 1.6 μ g DNA and 2.4 μ L of Lipofectamine 2000TM (Invitrogen). The next day, cells were split. Some cells were analyzed by flow cytometry and others were maintained in culture for the colony assay. To study integration of HD mediated by Φ C31-Int, we co-transduced cells with different combinations of HD-GFPattB, HD-Int, HD-Int(nls), HDCB-LacZ-ITR and HD-Cre. Transduction was done using cells at 70% confluency in either 12-well or 96-well plates, respecting surface/volume ratios. The cells in some wells were counted before transduction to obtain an accurate MOI.

The day after transduction, the cells were split and grown for 3 to 5 days. Cells were counted and equal numbers were seeded onto 10-cm plates (up to one million). In addition, 0.4 and 2.0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ of puromycin dihydrochloride P-8833 (Sigma-Aldrich) were used for HeLa and C2C12 respectively, and selection was maintained during 7 to 9 days. The cells were stained with a solution of 2% methylene blue in 50 % EtOH. The number of colonies (groups > 4 cells) per plate were counted using a microscope.

3.3.7 Cell viability study

3.5×10^5 HeLa cells in 6-well plates were transduced with HD-Int at an MOI 20. The next day, the cells were washed with PBS and detached with trypsin. The medium and PBS wash were combined with the detached cells. Some cells were kept in culture and were processed identically at day 3, 4 and 8 post-transduction. The cell suspension was centrifuged at $200 \times g$ for 10 min and resuspended in PBS. Propidium Iodide solution (Invitrogen) was added to samples at the final concentration of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ prior to flow cytometry analysis.

3.3.8 Integration site mapping

Several puromycin-resistant HeLa and C2C12 colonies were picked from different transduction conditions. Cells were cultured in 6-well plates, trypsinized when they reached confluency and then lysed in lysis buffer (same as for Hirt's extraction) overnight at 37°C. Genomic material was extracted by phenol-chloroform, precipitated with ethanol, resuspended in TE pH 8.5 and digested by AluI. The protocol supplied by the Universal GenomeWalker kit (Clontech Laboratories) was used for isolating integration events. The following two primers near the right arm from *attB* site were used for the nested PCR: GSPR1, 5'-AGTGAAGCAGAACGTGGGGCTCACCTC-3' and GSPR2, 5'-ATCAACTACCGCCACCTCGACCCGTTC-3'. The PCR products were gel-purified and sequenced (Plate-forme

d'analyses génomiques, Université Laval, Québec, QC). To map the integration sites, the sequences were Blat (UCSC Genome Browser, genome.ucsc.edu) in human (Feb 2009, Hg19) or mouse (July 2007, mm9) genome. The integration position in the genome relative to intergenic, intronic and exonic regions was determined according to Refseq, Uniprot, GenBank, CCDS and comparative genomics.

3.3.9 Analysis by PCR of HD-GFPattB structure after integration

The genomic DNA from randomly selected HeLa clones generated by the integration of HD-GFPattB at a pseudo *attP* site (in the absence of Cre) was used for the analysis. The copy number of HD-GFPattB in the genome was determined by real time PCR using primers for GFP (5'-AGATGGTGATGTTAACGGCC-3', 5'-GGGTAAGTTTT-CCGTATGTTGC-3'), at an annealing temperature of 55°C. Primers for the human *β-globin* gene were used for the DNA input control as described previously (660). One hundred ng of genomic DNA from clones was used per reaction. A standard curve was made using known amount of pGFPattB combined to 100 ng of untransduced HeLa cells genomic DNA. For the calculation, it was assumed that 15 pg of HeLa genomic DNA corresponds to the DNA content of one cell. The presence of deletions in the integrated HD-GFPattB was determined using the same procedure as for GFP. The following primers were used: del-270-bp, 5'-CCATTTTCGCGGGAAAAGT-3', 5'-AAATCATTGGCGCGCCG-3'; del-2266-bp, 5'-ACCTGCCAGTGCAGACTGTC-3', 5'-AAGCTGAGGGGACGAGGC-3'; del-6684-bp, 5'-TAGCCAGCCTACCTGAGCC-3', 5'-AGCGCTTGCTGAGCTGGATC-3'; del-8424-bp, 5'-GATGGCGGAGTCATGGATGAGC-3', 5'-CAGTCTCCTGGGCAGACTGG-3'. The end-products of PCR were analyzed on an agarose gel to verify the presence of a specific fragment.

3.3.10 Double-strand breaks, Western blot and immunofluorescence

2×10^4 C2C12 cells were transduced with different combinations of HD-GFPattB, HD-Int(nls) and HD-Int in 6-well plates or in 35 mm dishes with glass slide at the bottom (MatTek Corporation). The cells were harvested 48 hr post-transfection for Western blotting or fixed in 4% paraformaldehyde for immunofluorescence. Double-strand breaks were induced 8 hr prior to harvesting or fixing the cells, using different doses of UV-C (10 J/m^2 , 100 J/m^2 and 250 J/m^2) for positive controls. For SDS-PAGE, the cells were lysed in Laemmli buffer and the protein content was dosed with DC protein assay (Bio-Rad Laboratories LTD). The gels were loaded with $15 \mu\text{g}$ of protein per lane. The Western blots were probed with a monoclonal anti-H2AX-phosphorylated (Ser139) antibody (clone 2F3, BioLegend) and with a secondary goat anti-mouse IgG conjugated with Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc). As an internal control, the blots were also probed with a mouse β -actin antibody (MP Biomedicals). Fluorescence was detected using a Typhoon trio+ scanner (GE Healthcare Biosciences).

For immunofluorescence, the anti-H2AX-phosphorylated (Ser139) primary antibody was used with a goat anti-mouse antibody coupled to Alexa Fluor 594 nm (Invitrogen). Nuclei were stained with HOESCH 33342 (Sigma-Aldrich Canada Ltd). Images were generated with a confocal Laser Scanning Microscope (FV10i, Olympus). Three dimensional images of the nuclei were assembled from multiple z-plane scans. Using Cell D software from Aviso, we counted foci (< 5 pixels) and nuclei (> 150 pixels) in an unbiased manner. The results, expressed as number of foci per cell, were based on a minimum of 5 random fields and of at least 205 cells.

3.3.11 Statistical analysis

The means from two groups were compared using a student T-test. Some means were also analyzed using an analysis of variance (ANOVA) followed by a protected T-test. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

3.4 Results

3.4.1 Description and characterization of HD used in this study

To study the ability of Φ C31-Int to integrate an HD in cell culture, we constructed four HDs depicted in Fig. 3-1A. To construct these HDs, we used a strategy described previously (468, 469, 497) which consists of self-ligating a DNA fragment of about 16-kb carrying the left ITR, the packaging signal of adenovirus, the expression cassette and the stuffer DNA. The resulting HD contains two copies of the same DNA fragment arranged in a head-to-head configuration. HD-GFPattB contains two copies of the *attB* site, GFP expression cassette and puromycin resistance gene. Each of the two copies is flanked by parallel *loxP* sites for circularization upon expression of the Cre recombinase. HD-Cre encodes two copies of a bicistronic cassette for Cre and dsRed linked through an IRES. The structure of HD-Int is similar, except it encodes Φ C31-Int instead of Cre. HD-Int(nls) encodes Φ C31-Int, but is modified with a c-myc tag and a nuclear localization signal (NLS) at the N- and C-terminus, respectively (Fig. 3-4B). The predicted structure of the four HDs was confirmed by Southern blot analysis using three different probes spanning across the genome of the HDs (Fig. 3-2A). Because the four HDs contain the same backbone, the EcoRI and HindIII digestion patterns were similar, showing bands of the expected size. The presence of the *attB* site on HD-GFPattB was confirmed with a specific probe for the sequence (Fig. 3-2A). Southern blots confirmed the presence of Φ C31-Int and Cre genes in our vectors (Supplementary Fig. 3-7).

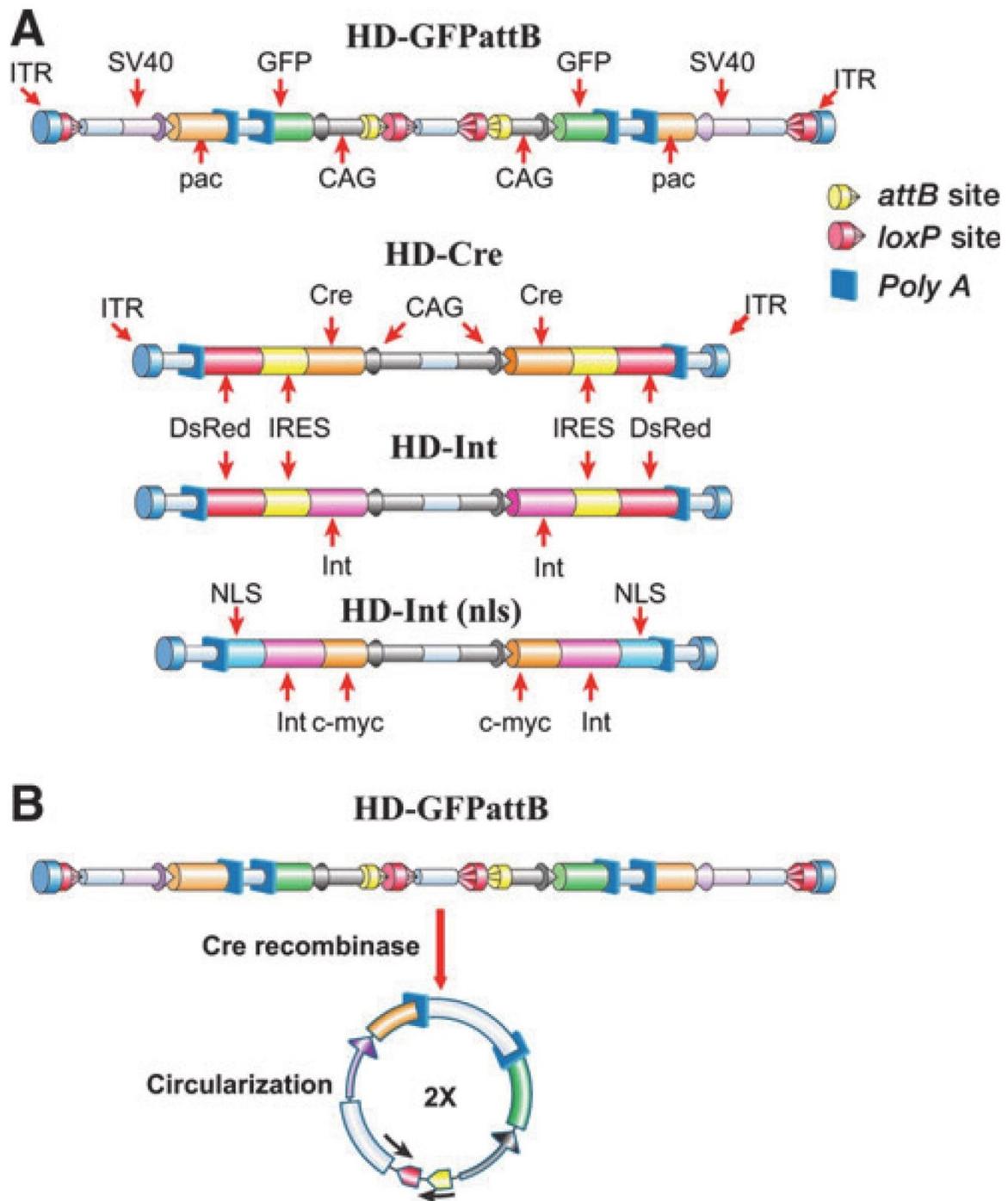


Figure 3-1. The legend is on the following page.

Figure 3-1. Illustrations of HD and the circular form of HD.

(A) Structure of HD (not drawn to scale). HD-GFPattB expresses the green fluorescent protein (GFP) regulated by the CAG promoter and the puromycin resistance gene (*pac*) controlled by the simian virus 40 promoter (SV40). Each copy of the two expression cassettes is flanked by *loxP* sites and contains one *attB* site. HD-Cre encodes two copies of the Cre recombinase (Cre) and of the red fluorescent protein (DsRed). HD-Int has a similar structure, but it encodes the Φ C31-Int (Int). HD-Int(nls) carries two copies of the Φ C31-Int linked to a c-myc tag and to a nuclear localization signal (NLS) at its N and C-terminal, respectively. HD, helper-dependent; IRES: Internal ribosomal entry site; ITR: Inverted terminal repeats; Unlabeled light blue bar: stuffer DNA.; Poly A: position of polyadenylation signal. **(B)** Illustration of the circular form produced after recombination of the *loxP* sites of HD-GFPattB mediated by Cre. The position of the binding sites for the primers (small arrows) used to demonstrate circularization by PCR (Fig. 3-3) is indicated.

A

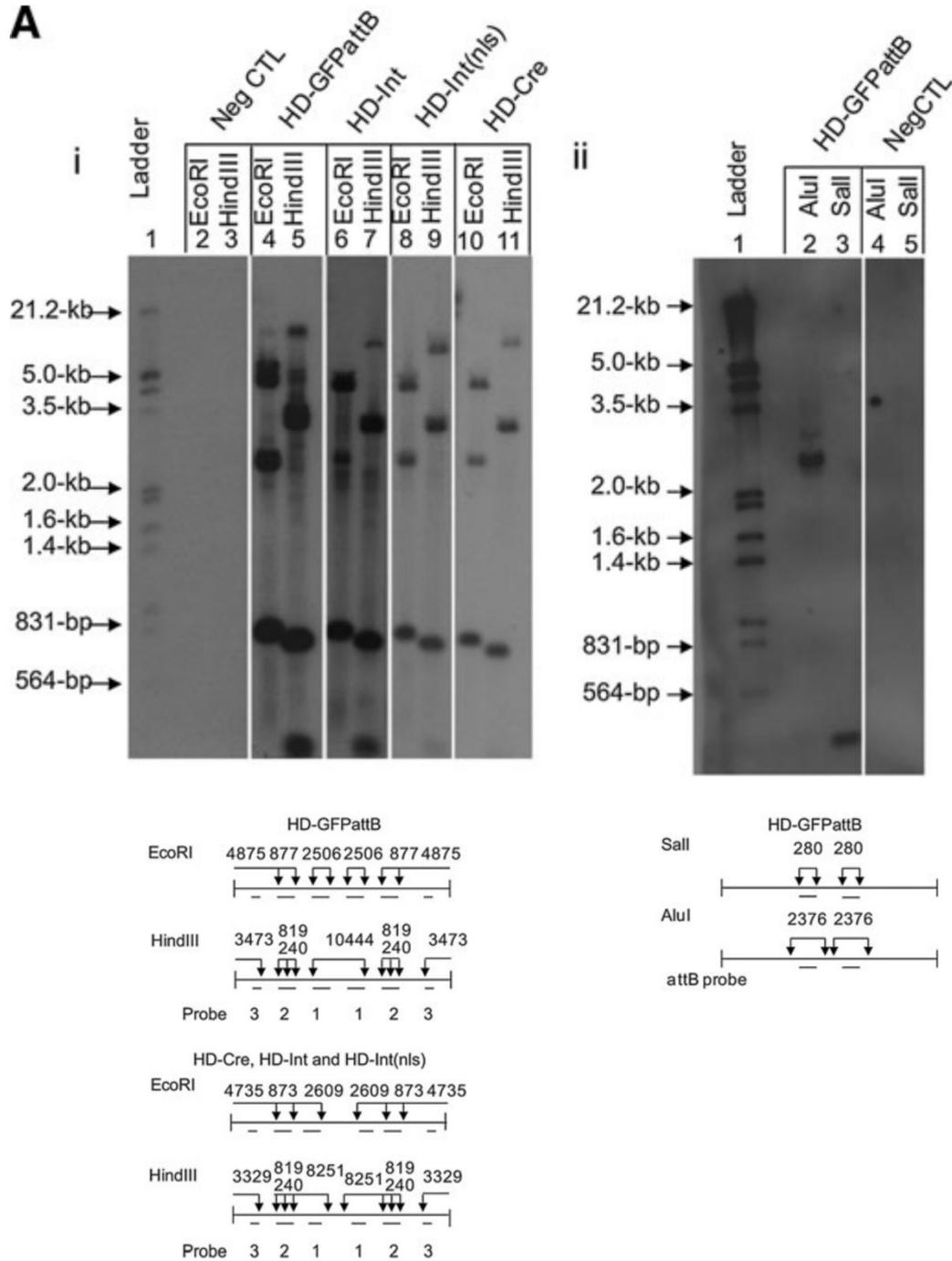


Figure 3-2. The figure is continuing on next page.

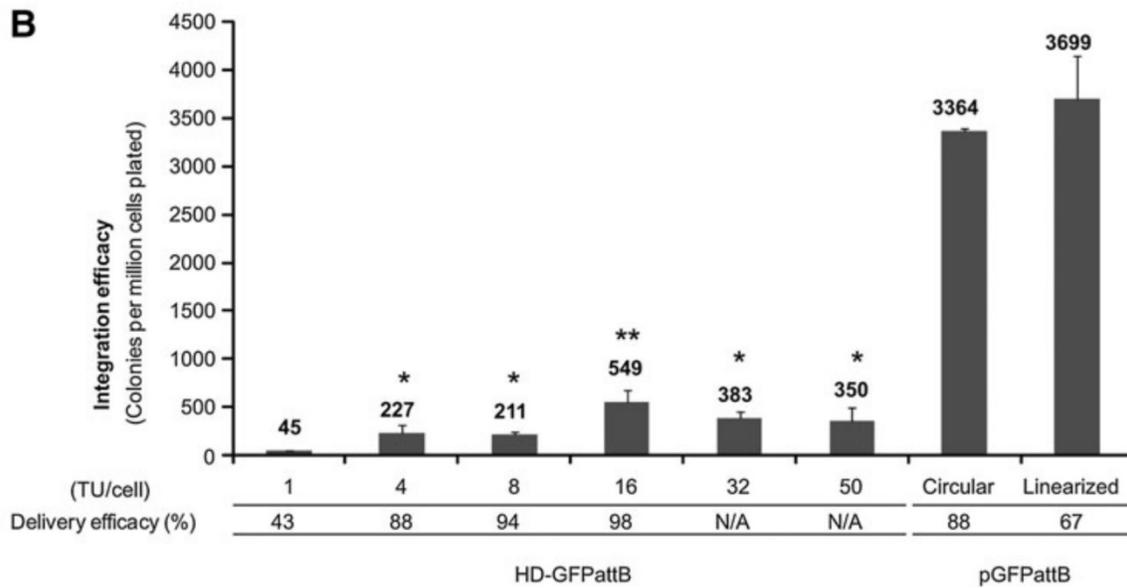


Figure 3-2. Characterization by Southern blot and basal integration of HD.

(A) Southern blot analysis. DNA was isolated from infected cells at 48 hr post-infection and digested with the restriction enzymes indicated. The membrane was probed using i) a mixture of three probes (1, 2, 3) against the stuffer of HD or ii) with one probe against the *attB* site. The positions of the probes are indicated underneath the diagrams on the right of the blots. The sizes of the expected bands are shown above the diagrams. Note, the signal of the expected band around 10 kb is weak, due to its large size, which reduces transfer efficacy on the blot. Neg CTL: DNA isolated from cells infected with only the helper virus. (B) Basal integration of HD-GFPattB was compared with the basal integration of plasmid. HeLa cells were transduced with different quantities of HD-GFPattB (MOI of 1 to 50) or were transfected with 1.6 μ g of circular or linearized plasmid. The transduction or transfection efficacy was measured at 24 hr post-infection (or transfection) by flow cytometry. The percentages of GFP-positive cells (delivery efficacy) are indicated below the graph. The cells were then grown in the presence of puromycin and the numbers of puromycin-resistant colonies (a measure of integration efficacy) were counted 7 to 9 days after selection. N/A: not available. The data are the means \pm S.E.M. (N=3). *: Means higher than MOI of 1 ($P < 0.05$); **: means higher than MOI of 8 ($P < 0.05$).

3.4.2 Basal integration efficacy HD in the absence of Φ C31-Int

It has been shown that the genome of an adenoviral vector can randomly integrate the chromosomes, although at low frequency in the absence of exogenous integrase (533, 534). To better characterize the integration efficacy HD-GFPattB mediated by Φ C31-Int, we first decided to evaluate the basal frequency of integration of this vector in HeLa cells by performing a colony assay using puromycin as selective agent because HD-GFPattB encodes the resistance for this antibiotic. HeLa cells were transduced with different quantities of the HD-GFPattB vector, ranging from a multiplicity of infection (MOI) of 1 to 50 transducing units (TU) per cell (Fig. 3-2B). The transduction efficacy was determined by scoring the percentage of GFP-positive cells by flow cytometry 24 hr later. The majority of the cells (greater than 85%) were transduced at MOI of 4. The integration efficacy (measured by scoring the number of puromycin-resistant colonies per million cells) was the smallest at the lowest MOI used and reached a maximum of 549 colonies (0.055% of cells plated) at an MOI of 15. Increasing the amount of vector used (MOI of 30 and 50) did not further increase the number of integration events.

Plasmid transfection is a standard procedure to generate stable transfectants (by random integration). We therefore transfected HeLa cells with the same plasmid used to generate HD-GFPattB (pGFPattB) in parallel, in order to determine the integration efficacy of HD compared with plasmid. pGFPattB was also linearized to mimic the linear genome of HD. The transfection efficacy was 88 and 67% for the circular and linearized plasmid, respectively, as measured by flow cytometry. Thus, the integration efficacies for the circular and linearized plasmids were similar to each other, and six- to seven-fold higher than the best basal integration efficacy of HD-GFPattB (Fig. 3-2B).

3.4.3 Integration of circular HD in HeLa cells mediated by Φ C31-Int

Because in nature, Φ C31-Int catalyzes recombination between phage DNA (which is circular) into the bacterial chromosome, we hypothesized that integration would be more efficient if the DNA genome of HD-GFPattB was circular. Therefore, we inserted *loxP* sites within HD-GFPattB to promote its circularization upon expression of Cre. A diagram of the predicted structure of the circular form generated by the action of Cre on HD-GFPattB is shown in Figure 3-1B. To verify that Cre can generate such circular vector, HeLa cells were transduced with different combinations of HD-GFPattB and HD-Cre. DNA extracts from transduced cells were then amplified by PCR with primers overlapping the site of recombination so that a band of 520-bp would appear only if circular forms were produced (Fig. 3-3A). When HeLa cells were transduced by HD-GFPattB alone, no 520-bp PCR product was amplified. However, in combination with HD-Cre the expected band was observed. Sequencing of this purified DNA fragment confirmed the predicted recombination event mediated by Cre.

To investigate whether Φ C31-Int can mediate integration of an HD in cell culture, we transduced HeLa cells with different combinations of HD-GFPattB, HD-Cre and HD-Int. Surprisingly, we observed that the basal integration of the circularized HD-GFPattB (in the presence of Cre) was significantly lower compared to the linear HD-GFPattB (Fig. 3-3B). This observation was made multiple times (Fig. 3-3C). As expected, addition of HD-Int at an MOI of 2 and 4 increased the integration efficacy of the circularized HD-GFPattB by a factor of five- to eight-fold respectively, indicating that Φ C31-Int can promote the integration of a circularized HD, as demonstrated previously (572).

3.4.4 Integration of linear HD in HeLa cells mediated by Φ C31-int

In the same set of experiments described in Figure 3-3B, we also transduced cells with HD-Int in the absence of HD-Cre (Fig. 3-3D). Addition of HD-Int at MOI of 2 and 4 resulted in a 5- and 16-fold increase in the integration efficacy of the linear HD-GFPattB, respectively. The

integration efficacy of HD-GFPattB in the presence of the same quantity of Φ C31-Int was therefore 10- to 20-fold higher in the absence of Cre (compare Fig. 3-3B and 3D), indicating that circularization of HD-GFPattB decreases the overall integration efficacy. In order to optimize integration, we tested higher concentrations of HD-GFPattB and HD-Int. Since circularization of HD-GFPattB was not necessary for integration, and linear HD-GFPattB integrated more efficiently, we omitted HD-Cre for these experiments. The integration efficacy of HD-GFPattB increased in the presence of additional quantities of HD-Int and reached a maximum at an MOI of 8 (Fig. 3-3E). In this experiment, the use of more HD-Int (MOI of 16) reduced the integration efficacy. The trend was the same at an MOI of 16 for HD-GFPattB, because higher amounts of HD-Int increased the integration efficacy, but the maximum was reached with less HD-Int (MOI of 4) (Fig. 3-3F). To verify that the lower integration efficacy observed in the presence of HD-Cre was due to the synthesis of Cre and that it was not the result of additional amounts of HD in the preparation, HeLa cells were transduced with HD-GFPattB, HD-Int and HD-Cre. In another group, HD-Cre was replaced with an irrelevant HD encoding β -galactosidase (Fig. 3-3G). Despite the presence of the irrelevant HD, the number of integration events was significantly lower in cells transduced with HD-Cre, thus confirming that circularization by Cre reduced the integration efficacy (Fig. 3-3G). Thus, from our HeLa cell experiments with HD, the optimal conditions for integration efficacy were HD-GFPattB at MOI of 16 and HD-Int at MOI of 4. This corresponded to an efficacy of 0.5%, (i.e., one puromycin-resistant colony per 200 cells). Although we maintained the same culture conditions and transduction protocol, there was some variability in the absolute number of integration events from different experiments even when the same amount of vectors was used (compare Fig. 3-3D, 3-3E and 3-3G; Fig. 3-4Ai and 3-4Aii). For this reason (except for Fig. 3-3C), we did not pool the data when the experiments were not performed at the same time. The cells' viability was not affected by our experimental procedure. The viability of HeLa cells was not affected by transduction with HD-Int at an MOI of at least 20, indicating that under our experimental conditions, the variability

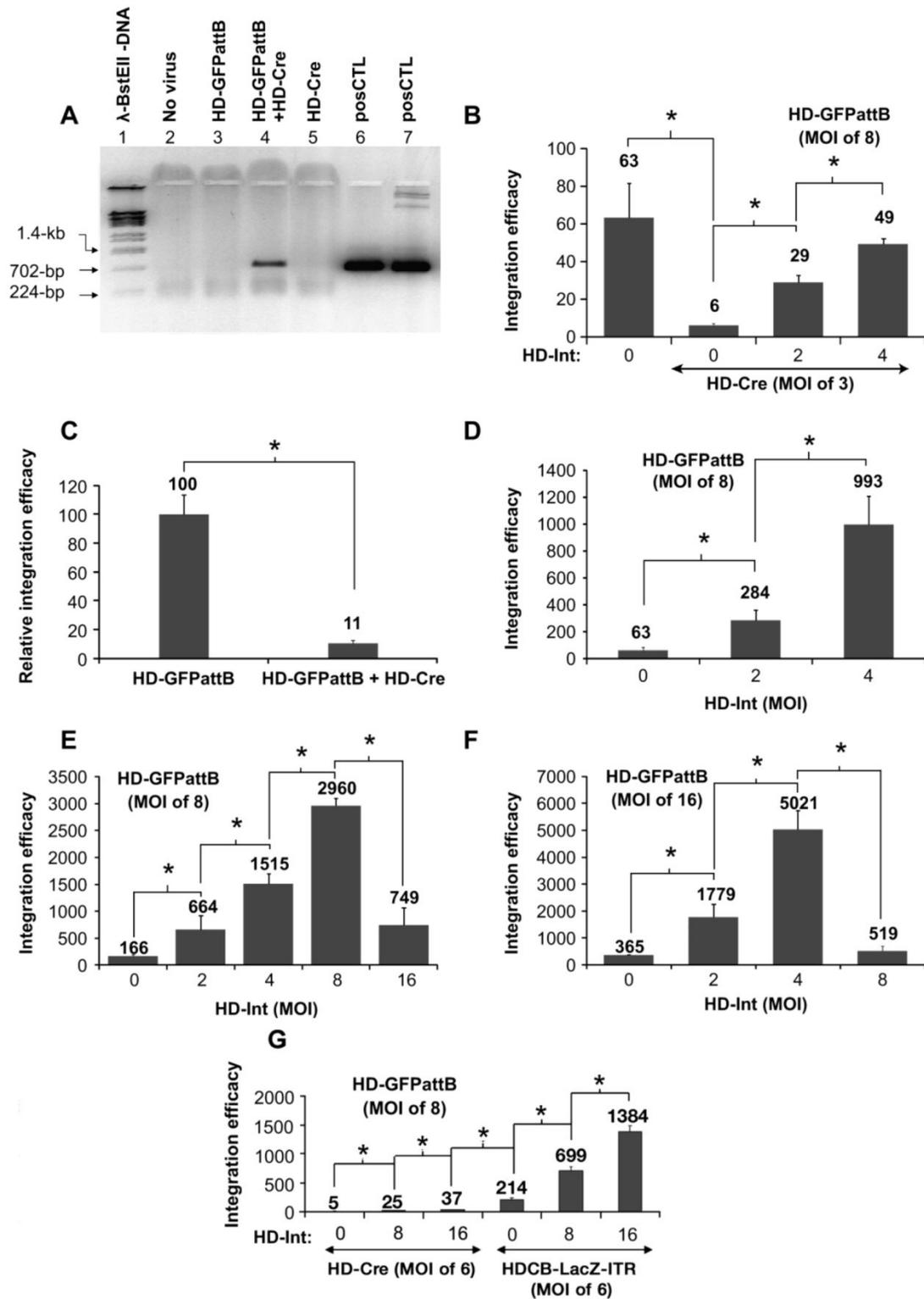


Figure 3-3. The legend is on the following page.

Figure 3-3. Integration efficacy of circular and linear HD in HeLa cells.

(A) Evidence of circularization by PCR. HeLa cells were transduced with different combinations of HD-GFPattB (MOI of 8) or HD-Cre (MOI of 6). Successful amplification of a PCR product resulting from circularization of HD-GFPattB was observed in the presence of HD-Cre (lane #4). Positive controls (posCTL) are PCR reactions made with the same primers used to make probe 3 (Fig. 3-2A) using HD-GFPattB + HD-Cre as templates (lane #6), or using pGFPattB as template (lane #7). **(B-G)** HeLa cells were transduced with different combinations of HD-Cre, HDCB-LacZ-ITR, HD-GFPattB and HD-Int. The integration efficacy (expressed as the number of puromycin-resistant colonies per million cells plated) was determined 7 to 9 days after selection. **(B)** Effect of increasing the concentration of HD-Int (MOI of 0, 2 and 4) on the integration of HD-GFPattB (MOI of 8) in the presence of HD-Cre (MOI of 3). **(C)** Cre expression reduces the basal integration efficacy of HD-GFPattB. Cells were transduced with HD-GFPattB (MOI of 8) in the absence or in presence of HD-Cre (MOI of 3). The data are expressed as the relative reduction in the number of integration events in the presence of HD-Cre as measured by the colony assay. **(D-F)** Integration efficacy of linear HD-GFPattB [**(D and E)**: MOI of 8; **(F)**: MOI of 16] in the presence of increasing concentrations of HD-Int. **(G)** The reduction of integration efficacy is caused by Cre expression and not by the presence of additional amounts of HD. Cells were infected with HD-GFPattB (MOI of 8) and HD-Cre (MOI of 6) in the presence of increasing concentration of HD-Int. As control, HD-Cre was replaced with an HD encoding β -galactosidase (HDCB-LacZ-ITR) at an MOI of 6. The data are means \pm SEM. *Significantly different from each other ($p < 0.05$). N=3, except for **(C)**, where N=6.

of integration efficacy was not due to the toxicity of HD (Supplementary Fig. 3-8). Importantly, before plating the cells for the colony assay, they were cultivated for 4 to 6 days after transduction to let them recover from any possible stress caused by the experimental procedure.

3.4.5 Integration of HD in myoblasts and nuclear targeting of Φ C31-Int

To investigate the integration of HD-GFPattB in an alternate cell line, we co-transduced C2C12 murine myoblasts with different combinations of HD-GFPattB and HD-Int (Fig. 3-4A). Because C2C12 myoblasts are transduced less efficiently with adenoviral vectors compared to HeLa cells, an MOI greater than 10 TU/cell was necessary to transduce more than half of the cell population. As observed with HeLa cells, we observed basal integration of

HD-GFPattB (Fig. 3-4A). Addition of HD-Int at an MOI of 75 and 150 increased the integration efficacy of HD-GFPattB 4- to 10-fold above basal level, respectively. Addition of more HD-Int reduced the integration efficacy (Fig. 3-4A). The highest integration efficacy of HD-GFPattB in C2C12 myoblasts was 0.1% (1045 colonies/million cells) at an MOI of 75 and 150 for HD-GFPattB and HD-Int, respectively (Fig. 3-4A).

Facilitating the accessibility of the Φ C31-Int to its DNA substrate in the nucleus can enhance the integration efficacy in NIH 3T3 and CHO cells (578). To investigate this effect in C2C12 cells, we fused a nuclear localization signal (NLS) to the integrase based on the most active version of Φ C31-Int described by Andreas et al. (578). To visualize Φ C31-Int distribution in the cells, we fused a c-myc-tag to its N-terminus. As a control, we generated Φ C31-Int with the same c-myc-tag but without an NLS (Fig. 3-4B). Proper expression of the two modified integrases was confirmed by Western blot (Fig. 3-4C). Localization of the integrase with the NLS inside the nucleus was revealed by immunofluorescence using an antibody against the c-myc-tag (Fig. 3-4D). In contrast, the wild type Φ C31-Int without the NLS predominantly localized in the cytoplasm. We then constructed an HD-Int(nls) carrying the Φ C31-Int fused to NLS (Fig. 3-1A) and tested this in C2C12 myoblasts. Cells were co-transduced with HD-GFPattB at MOI of 75 and with HD-Int(nls) at MOIs of 150 and 300 (Fig. 3-4E). As expected, the number of puromycin-resistant colonies increased in the presence of HD-Int(nls). It was up to five-fold higher compared to the basal integration efficacy in the presence of HD-Int(nls) (MOI of 300). These results demonstrate that the Φ C31-Int(nls) was functional in C2C12 myoblasts, although it was not as efficient as the wild-type integrase at a comparable dose of vector (compare Fig. 3-4A and 4E). These data agree with the results of Woodard et al., who also observed that the inclusion of an NLS to the C-terminus of Φ C31-Int did not enhance integration efficacy (in HeLa cells) despite the successful nuclear targeting of the integrase (579).

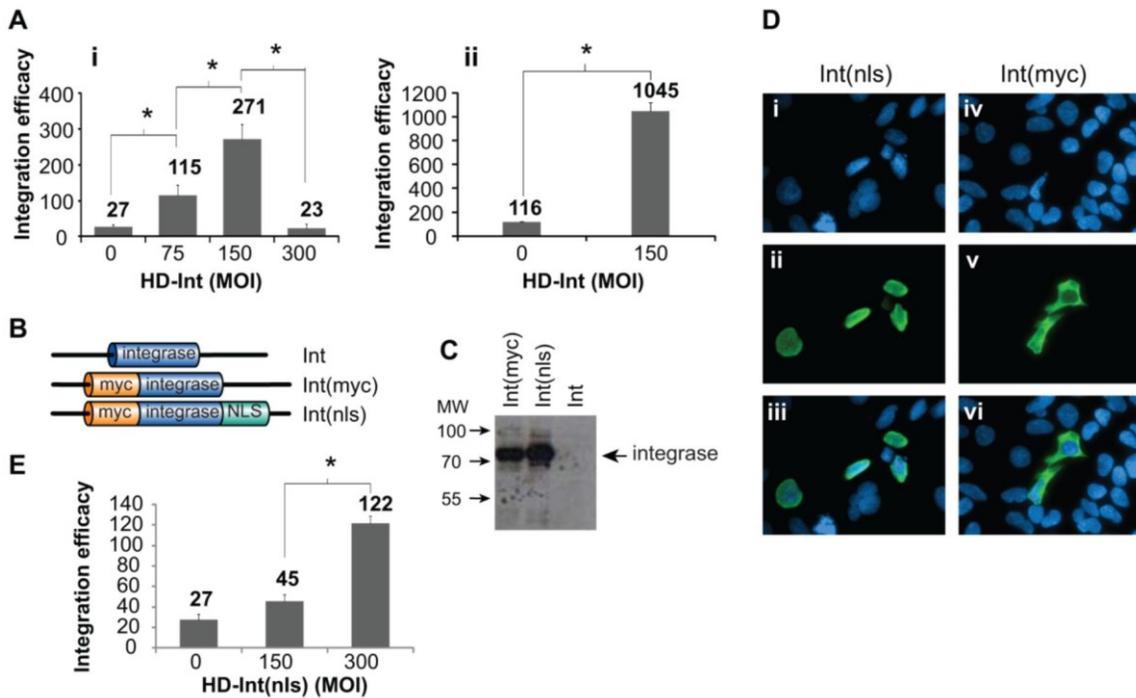


Figure 3-4. Integration of HD-GFPattB in C2C12 myoblasts.

(A) Integration efficacy of HD-GFPattB in C2C12 cells. The results of two independent experiments (i and ii) are presented. Myoblasts were transduced with different combinations of HD-GFPattB (MOI of 75) and HD-Int. The integration efficacy (expressed as the number of puromycin-resistant colonies per million cells plated) was determined 7 to 9 days after selection. (B) Illustration of the modified Φ C31-Int. Int: wild type Φ C31-Int; Int(myc): Φ C31-Int with c-myc tag only, Int(nls): Φ C31-Int with myc tag and nuclear localization signal (nls). (C) Expression of modified Φ C31-Int detected by Western blot. HEK 293 cells were transfected with Int, Int(myc) and Int(nls). At 48 hr post-transfection the cell lysates were analyzed by Western blot probed with a primary antibody specific to c-myc tag.; MW: molecular weight markers (kDa). (D) Intracellular distribution of the integrases. HEK 293 cells were transfected with plasmid carrying Int(nls) (i, ii, iii) or Int(myc) (iv, v, vi). The cells were stained at 48 hr post-transfection with an anti-myc antibody (ii and v). The cell nuclei were also counterstained with Hoechst 33342 (i and iv). Merged images are shown in (iii) and (vi). (E) Integration efficacy of HD-GFPattB mediated by Φ C31-Int(nls). Myoblasts were transduced with different combinations of HD-GFPattB (MOI of 75) and HD-Int(nls). The experiment was performed at the same time as in (A, i). Consequently, the data can be compared with each other. The data are the means \pm SEM (N=3), except for (A, ii) where N=6. *: significantly different from each other (p<0.05).

3.4.6 Analysis of double-strand breaks caused by phiC31-Int in myoblasts

Expression of Φ C31-Int after transfection in mammalian cells has been associated with the formation of double-strand breaks (613). Histone H2AX is phosphorylated on serine 139 during the formation of double-strand breaks. The phosphorylated form is known as gamma-H2AX (γ H2AX) and accumulates into foci in the nucleus (661). To verify if gene transfer of Φ C31-Int after HD transduction also causes double-strand breaks, we transduced C2C12 myoblasts with different combinations of HD-GFPattB, HD-Int and HD-Int(nls), each at an MOI of 75. No significant increase in the overall phosphorylation status of H2AX was observed after transduction with HD-Int or HD-Int(nls), as indicated by Western blot analysis using a γ H2AX-specific antibody (Fig. 3-5A). As a positive control, cells exposed to UV (10, 100 or 250 J/m²) showed a significant increase in the amount of γ H2AX. A more sensitive technique employed for detection of double-stranded breaks consists of marking foci created by the accumulation of γ H2AX with an antibody coupled to a fluorochrome (661). Using this technique, we analyzed the number of γ H2AX positive foci by immunofluorescence microscopy after transduction with the HDs. C2C12 myoblasts transduced with our control HD (HD-GFPattB) alone exhibited an average of 1.2 foci per cell, a value that was comparable to untransduced cells (Fig. 3-5B). Addition of HD-Int or HD-Int(nls), increased the number of foci ($p < 0.05$) by a factor of three and two respectively. Most importantly, the number of foci associated with expression of Φ 31-Int and Φ 31-Int(nls) was 8- to 10-fold lower compared to the number of foci observed after irradiating the cells with UV. Taken together, these data indicate Φ C31-Int expression causes a modest augmentation in the number of double-strand breaks, which is too small to modify the phosphorylation status of H2AX as determined by Western blot.

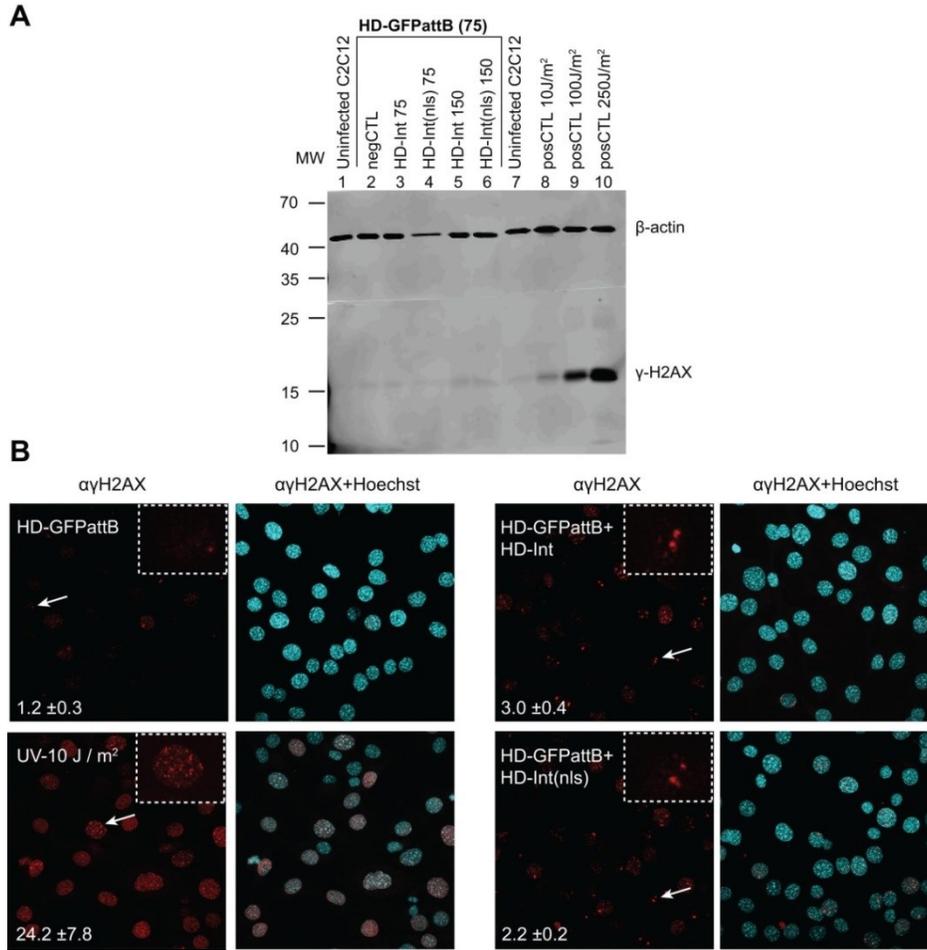


Figure 3-5. Effects of Φ C31-Int expression on the formation of double-strand breaks.

(A) Expression of Φ C31-Int does not promote phosphorylation of histone H2AX. C2C12 myoblasts were transduced with different combinations of HD-GFPattB, HD-Int and HD-Int(nls) at an MOI of 75 or 150. Western blotting was performed at 48 hr post-infection using a primary antibody against phosphorylated H2AX (γ -H2AX) as a probe or β -actin as loading control. The positive controls (lanes #8, 9, 10) are cells irradiated with different doses of UV. A negative control (negCTL, lane #2) was transduced only with HD-GFPattB at MOI of 75. MW: molecular weight marker (kDa). (B) Expression of Φ C31-Int slightly increases the number of γ -H2AX positively nuclear foci. C2C12 myoblasts were transduced with different combinations of HD-GFPattB, HD-Int and HD-Int(nls), each used at an MOI of 75. The cells were processed for immunofluorescence microscopy at 48 hr post-transduction using an antibody against γ -H2AX. The cell nuclei were also counterstained with Hoechst. Inset: higher magnification of a nucleus (arrow). The average number of foci per cell (\pm SEM) is displayed in the pictures (205 to 329 cells were analyzed for each condition). The number of foci for the untransduced cells was 1.1 ± 0.2 .

3.4.7 Genomic characterization of the integrated linear and circularized HD

During integration, Φ C31-Int catalyzes a crossover between the *attB* sites in the vector and the pseudo *attP* sites of the chromosome (Fig. 3-6A) (581). To map the integration sites of HD-GFPattB, genomic DNA from puromycin-resistant colonies was isolated, and the crossover junction was identified by genome-walking using an approach similar to the one described by (576), and primers specific for the right arm of the *attB* sites (Fig. 3-6A). The presence of genomic DNA sequence near the crossover region was viewed as a specific integration event mediated by Φ C31-Int. When the PCR product contains only the vector sequence, this is scored as a non-specific integration event (not mediated by Φ C31-Int). As negative controls, we used DNA from clones of HeLa cells transduced with HD-GFPattB in absence of Φ C31-Int. Out of 26 HeLa-control colonies sequenced, none of them showed an altered *attB* site. The calculated specificity of integration for all events recorded in presence of Φ C31-Int is listed in Table 3-I. In HeLa cells transduced with either circularized or linear HD-GFPattB, we found 76% and 72% of the integration events occurred through specific integration, respectively. This comparable percentage of specific integration events indicated that the nature of template (circular or linear vector) did not affect the specificity of integration for pseudo *attP* sites. In the case of C2C12 myoblasts transduced with the linear HD-GFPattB, 65% of the integration events were found to be specific.

Table 3-I. Specificity of integration

<i>Number of clones analyzed</i>		<i>% of integration events</i>
<i>HeLa</i>	<i>Circularized HD-GFPattB</i>	
	Specific	76
34	Non-specific	24
<i>HeLa</i>	<i>Linear HD-GFPattB</i>	
	Specific	72
64	Non-specific	28
<i>C2C12</i>	<i>Linear HD-GFPattB</i>	
	Specific	65
17	Non-specific	35

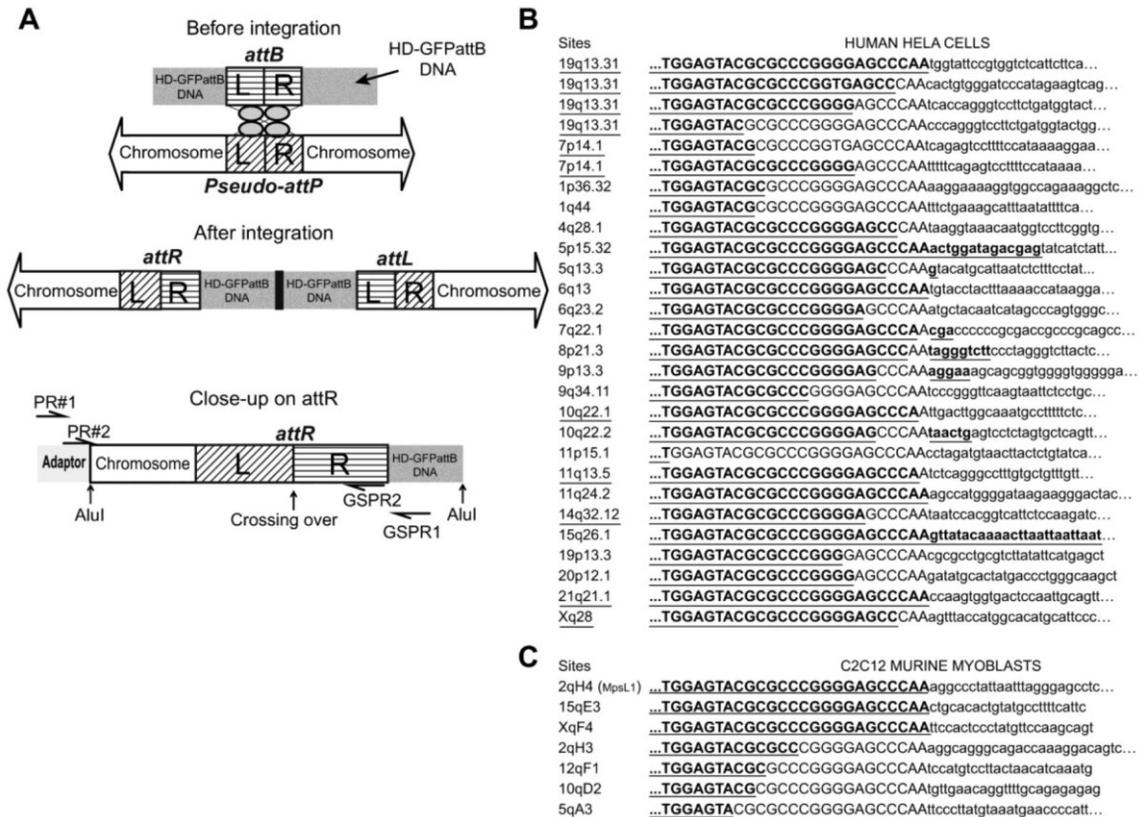


Figure 3-6. Sequence of pseudo attP sites used by HD-GFPattB for integration.

(A) Diagram of attB and pseudo attP sites before and after integration. Integration mediated by Φ C31-Int (gray circles) occurs through the recombination between the attB and pseudo attP sites (581). AttB and pseudo attP contain two half sites consisting of left (L) and right (R) arms, each separated by a TT core sequence. The recombination process destroys the original sites by generating the attR and attL. To map the integration site, the purified DNA isolated from each clone was digested with AluI and ligated to an adaptor. Nested PCR was then carried out using the two primer pairs PR#1/GSPR1 and PR#2/GSPR2. The PCR product was then sequenced to map the integration site. (B and C) Nucleotide sequences at the junction of the attR and chromosomal DNA in HeLa cells and C2C12 cells respectively. Capital bold + underline: match with vector sequence; capital + not bold: deleted vector bases; lowercase: genomic DNA; lowercase + bold = new bases added. For HeLa cells, the integration sites previously characterized by other research groups (576, 585, 593, 595, 598, 610, 662) are underlined.

We aligned the sequences obtained from all the clones and eliminated all the identical sequences, based on the assumption that they were duplications of the same integration event. To establish a distribution of the integration events, we classified all the single integration events according to their propensity to hit intergenic, intronic or exonic regions of genes. Most integration events occurred between genes (47.1%) or within introns (44.1%) and few events were found within an exon (8.8%). Fig. 3-6B shows the sequence of the crossover point for 28 different integration events in HeLa cells. We note that in most integration events, the right arm from *attB* site carries small deletions up to 23 nucleotides from the TT core (or AA core depending on the strand shown). Some other integration events contained a few inserted bases at the crossover with the genomic sequence. The most frequent integration sites found in HeLa cells were 19q13.31 (14.3%) and 7p14.1 (7.1%) located in an intron of *ZNF223* and in an exon of *GLI3*, respectively. In C2C12 myoblasts, no integration event was detected within an exon after screening 17 clones. Micro-deletions near the core were also present. Interestingly, an integration event within the hot spot *mpl1* (599) in murine genome was found (Fig. 3-6C).

To gain a better understanding of the mechanism by which Φ C31-Int can integrate an HD in the absence of circularization by Cre, we first defined the number of integrated copy of HD genome in the HeLa cells. This was done by real time PCR using specific primers for the GFP sequence. Genomic DNA from nine HeLa clones (randomly selected based on integration events through *attB* sites) were used for the analysis. In 78% of the clones (seven out of nine colonies) only one copy of HD was integrated into the cell (Table 3-II). We then tested by PCR the presence of a deletion near the ITR using primer pairs binding at various locations from the HD extremities. In one clone, we were able to amplify all the regions of the HD indicating that one vector moiety was complete or had a deletion smaller than 270-bp (Table 3-II). Two clones had deletions smaller than 2.3 kb, whereas for four clones the deletion ranged from 6.7 to 10.4 kb. Taken together, these data indicate that deletion of the extremities during integration of linear HD is relatively common.

TABLE 3-II. CHARACTERIZATION BY PCR OF THE STRUCTURE OF HD AFTER INTEGRATION MEDIATED BY ϕ C31-Int

Clone name ^a	Copy of HD per cell ^b	Presence of PCR product using different primer pairs specific to the HD. The distance (in bp) from the ITR of the primer pairs is indicated ^c				Size of the deleted HD fragment (from ITR) ^d
		270 bp	2266 bp	6684 bp	8424 bp	
11q24.2	1	YES	YES	YES	YES	None or <0.3 kb
10q22.2	1	NO	YES	YES	YES	0.3 to 2.3 kb
14q32.12	1	NO	YES	YES	YES	0.3 to 2.3 kb
7q22.1	6	YES	YES	YES	YES	None or <0.3 kb
9q34.11	2	NO	NO	NO	YES	6.7 to 8.4 kb
10q22.1	1	NO	NO	NO	NO	8.4 to 10.4 kb
7p14.1	1	NO	NO	NO	NO	8.4 to 10.4 kb
19q13.31	1	NO	NO	NO	NO	8.4 to 10.4 kb
20p12.1	1	NO	NO	NO	NO	8.4 to 10.4 kb

^aClones are described in Figure 6.

^bReal-time PCR with primers for GFP was used to quantify the number of copies of HD.

^cThe absence of a PCR product (no) means the deletion affects both ends, because the HD is a head-to-head tandem repeat (Fig. 1).

^dBecause all the clones were resistant to puromycin (the gene for puromycin resistance is 10.4 kb from the ITR), the deletion cannot be larger than 10.4 kb.

3.5 Discussion

In this study, we confirmed previous works indicating that the genome of adenoviral vectors can integrate into the chromosomes after transduction (532, 533, 534, 535). Under our experimental conditions however, the basal integration efficacy of HD was six- to seven- fold lower than that observed for high-level transient transfection (67-87% of cells transfected) of circular and linear plasmid DNA. Most importantly, we demonstrated that it was feasible to significantly increase the integration efficacy of HD, and at the same time to target the integration at pseudo *attP* sites, by co-expressing the Φ C31-Int by means of a second HD. Previously, it was shown that Φ C31-Int can integrate either a linearized or circular plasmid with the same efficacy (572), suggesting that the nature of DNA is not important for integration. Surprisingly, our observations with HD differ from those with plasmids, based on our results indicating that integration of the linear HD was more efficient than circularized vector (see discussion below). With respect to sites of integration, the specificity for pseudo *attP* sites remained the same irrespective of the linear and circular nature of vector. The integration efficacy of HD was optimized by testing various concentrations of HD-Int and HD-GFPattB. We found that increasing the concentration of both vectors resulted in an increase of the integration efficacy until a maximum is achieved. Further increments in the amount of vector reduced the integration efficacy. The maximum increase of integration

efficacy (as measured by the number of puromycin-resistant colonies in the absence vs. presence of Φ C31-Int) was up to 18-fold for the linear HD (Fig. 3-3E). These values are in the range obtained by other researchers using Φ C31-Int after transfection of plasmid DNA (361, 574, 583, 596, 663). The optimal amount of vectors needed varied greatly between the two cell lines investigated. This was most likely due to the differences in the transduction efficacy and to inherent factors specific to each cell type, such as expression levels of DAXX, that influence Φ C31-Int activity (588, 589).

The best integration efficacy of the HD/ Φ C31-Int combination (0.5% in HeLa cell and 0.1% in C2C12 myoblasts) is lower than the efficacy observed with lentiviral and retroviral vectors, and with the recently optimized transposases (664). However, it is in the same range of the best efficacy reported for plasmid and Φ C31-Int (574, 583, 596) and for other types of integrating hybrid vectors derived from herpes simplex and adenovirus (549, 665, 666, 667). The Φ C31-Int has been successfully used *in vivo* in the context of plasmids to integrate and consequently stabilize transgene expression in various tissues and organs (liver, skeletal muscle, skin, lung for examples) for gene therapy applications (573, 583, 595, 600, 604, 607). HDs are safer than first generation adenovirus (E1-deleted) because they not encode viral proteins. However the presence of capsid proteins can cause an acute but temporary inflammatory response after injection *in vivo* (656). Because of the good transduction capability of HD *in vivo*, we expect that integration of HD mediated by Φ C31-Int will be more efficient than plasmids. Indeed, it has been shown that Φ C31-Int can promote the integration of an HD in the liver and that integration improves the stability of transgene expression (572). In that particular study however, the HD was circularized and the efficacy of the linear HD was not investigated. According to our data, integration would be improved further by using a linear HD.

The fact that linear HD can be integrated in the absence of circularizing enzyme such as Cre or FLPe, greatly simplifies the system for *in vitro* and *in vivo* applications since only one enzyme

(Φ C31-Int) needs to be delivered with the HD. Unexpectedly, we observed that circularization of the HD significantly reduced the efficacy of both basal as well as Φ C31-Int mediated integration. The reason for this reduction is unclear, but it appears to be specific for HD since, in the case of plasmid DNA, the integration efficacy (as measured by colony assay) in the presence of Φ C31-Int was comparable for both circular and linearized plasmid (572). Although we cannot completely rule out that the reduction is due to the splicing out by Cre of the vector DNA that was integrated as a linear template, the higher integration efficacy of the linear vector DNA could be due to its unique property. The ends of the adenovirus DNA are covalently linked to the terminal protein, which has been shown to connect its DNA to the nuclear matrix (506, 668). This specific nucleoplasmic localization of the viral DNA might increase its integration efficacy (both heterologous and mediated by Φ C31-Int). Following circularization, the ITRs and the terminal protein are spliced out from the vector DNA (Fig. 3-1). Consequently, this would eliminate the vector interaction with the nuclear matrix and reduce its integration efficacy. According to the known mechanism of action of Φ C31-Int (581), unless the 5' and 3' extremities of the linear HD genome are ligated during the integration process, integration of a linear HD at a *pseudo attP* sites should cause a double-strand break. This break is most likely repaired rapidly by the enzymes from the DNA repair machinery. One potential mechanism of integration could involve self-circularization of HD in the absence of Cre. Although low level of HD (1 to 3% of transduced genomes) were converted into circular molecules in HeLa cells expressing EBNA (508), we tried unsuccessfully to amplify DNA fragments created by self-circularization of HD after infection of HeLa cells using several primers specific for the extremities of our HD (data not shown). Furthermore, if the HD was forming circular intermediates after infection of HeLa cells, the primers used for the experiments of Fig. 3-3A should have amplified a DNA fragment of 1.4-kb encompassing the two ITRs. Such fragment was not observed. Our data suggest that most of HD were linear and that they were integrated as linear genomes in the absence of Cre. The discrepancy between our results of those of (508) could be explained by the enrichment in their study a rare circular form of HD through EBNA. The analysis of the integrated HD shows deletions of the vector extremities in the majority of clones, except for one. Although the size of deletions ranged from 0.3 to 10.4-kb of ITR, a substantial amount of DNA was left

intact, including the GFP cassettes and the selection marker. Our data suggest that the double strand breaks created by the integration of linear HD at pseudo *attP* sites are repaired by random cleaving of the HD extremities (which removes the terminal protein covalently linked to the ITRs), followed by ligation of the two ends. Because of this putative integration mechanism, one possible strategy for preventing the isolation of clones having large truncations would be to position the gene of selection closer to the ITR. Additional studies are necessary to clarify if the location of the *attB* site within the vector influences the size of the deletion.

We have identified the integration sites of the HD into the human and murine genome. In HeLa cells, 76% and 72% of the clones analyzed for circularized and linear HD, respectively, yielded a PCR fragment containing the junction between *attB* site from HD and genomic DNA. In C2C12 myoblasts, this value was 65% for the linear HD. This indicates that, irrespective of the nature of the HD (linear or circular) and cell type (human and murine), about 70% of integration events were catalyzed into pseudo *attP* sites by Φ C31-Int. Most likely this underestimates the specificity of Φ C31-Int, since the absence of a restriction site in the chromosome near the integration junction would prevent amplification of a PCR product. In addition, microdeletions in the *attB* site larger than 48-bp (from the TT core) would impair hybridization of the nested primer (GSPR2), again resulting in no PCR product. In the case of the linear HD, these would have created a false reading for heterologous integration because only the internal *attB* site would be amplified (the linear HD contains two *attB* sites Fig. 3-1). It is difficult to compare our values of specificity from previous published data, because the frequency of heterologous integrations observed after sequencing were not presented (572, 576, 598). Nevertheless, in the case of circular plasmids, based on an increase of 5- to 10-fold for the integration efficacy in the presence of Φ C31-Int, it was estimated that 80 to 90% of integration events occurred at pseudo *attP* sites (574).

We have identified the same integration hot spots, at position 19q13.31, 21q21.1 and 7p14.1 in HeLa cells and on chromosome 2 (band H4, site MpsL1) in mouse C2C12 cells, as those described before (576, 585, 593, 598). Overall, 26% of the *pseudo attP* sites we have characterized (Fig. 3-6) were previously identified (572, 576, 585, 593, 595, 598, 599, 600, 604, 610). In our study, 53% of the integration sites occurred within genes, which is coherent from other reports as a mean of 51% of integration event was found in genes (572, 576, 598). The alteration of genomic DNA such as microdeletions (about 6 to 20 bp), addition of a few random bases and imprecise integration events (5 to 15 bp from core of *attB* and *pseudo attP* sites) were also reported by other groups (572, 576, 598). In summary, the pattern of integration and microalterations of DNA we observed using HD were similar to previous data obtained with plasmids.

Because Φ C31-Int can cause chromosomal aberrations and DNA damage (613), we monitored the number of nuclear foci stained for phosphorylated H2AX (γ -H2AX), a marker of double-strand breaks (661). We observed a small increase (two- to three-fold) in the number of γ -H2AX positive foci in the cells transduced with HD-Int(nls) and HD-Int respectively. Although above background level, this increase was small compared to cells treated with UV. Under the exact same conditions, we did not detect any increase of H2AX phosphorylation by Western blot, indicating that DNA damage due to transient Φ C31-Int delivered by an HD is relatively minor. As with most integrating vectors, there is the potential of tumorigenicity because of the unpredictable nature of the integration location. However, with Φ C31-Int, this hazard is diminished based on the fact that the majority of integration events occurred at *pseudo attP* sites and only a few of these sites have been identified in close vicinity to potential oncogenes (576, 585). The Φ C31-Int appears to be safe, because the formation of tumors was not observed when it was used for gene therapy in preclinical studies (663) or when its tumorigenic capacity was evaluated (585, 609).

In agreement with previous studies, we have shown that the wild type Φ C31-Int is principally localized in the cell cytoplasm (579, 588). Because inclusion of an NLS in the enzyme can increase its recombination efficacy in mammalian cells (578, 669), we evaluated a version of Φ C31-Int fused to a NLS at its C-terminus. Our modified Φ C31-Int was identical to the one described previously, except for the presence of a myc tag (578). However, inclusion of an NLS did not increase its efficacy. Similar observations were also made by others (579). Because our experiments were performed using actively dividing cells, it is possible that during mitosis, the cytoplasmic Φ C31-Int gains access to the chromatin after dissolution of the nuclear envelope and therefore does not require an NLS.

In conclusion, our study demonstrated the ability to integrate an HD at pseudo *attP* sites with low genotoxicity through expression of Φ C31-Int without the need to circularize the vector. The evidence that circularization is not required for integration greatly simplifies its usage, because only the Φ C31-Int needs to be provided *in trans*. Moreover, the safety of HD, its large transport capacity and its ability to transduce a large variety of cells *in vitro* and *in vivo* makes the HD/ Φ C31-Int combination a very attractive system to stably modify the genome for cell engineering and gene therapy.

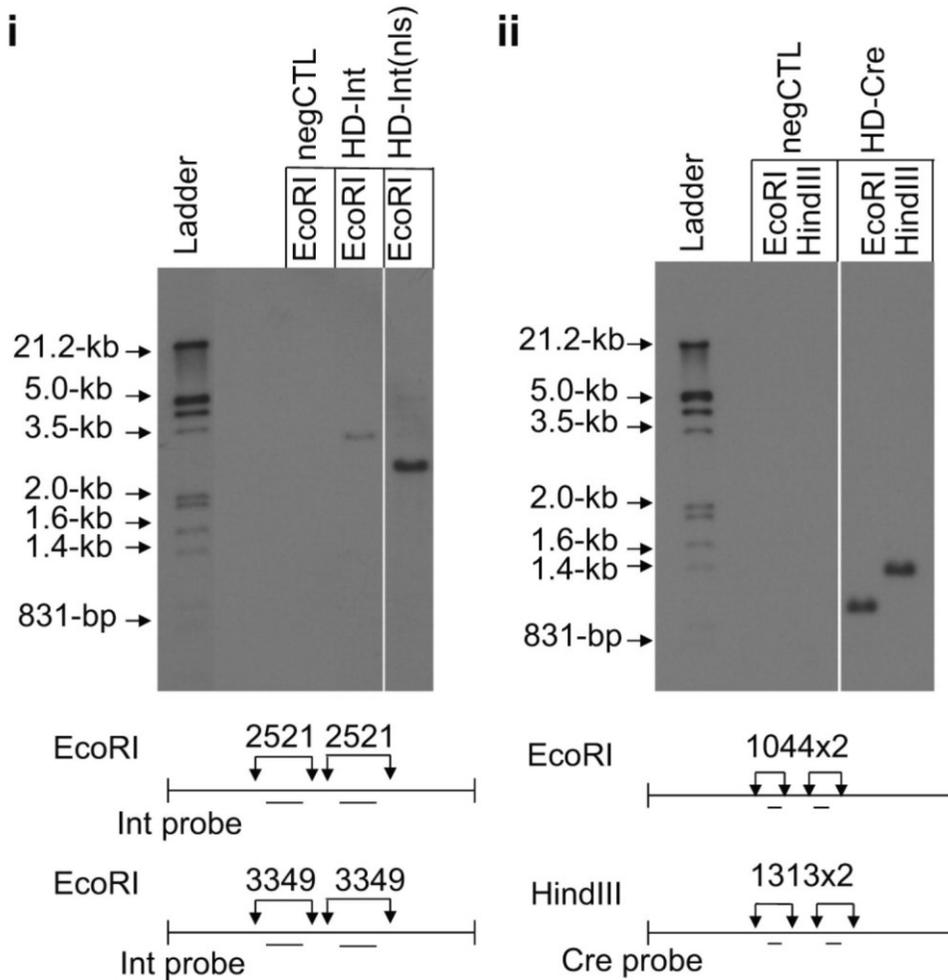
3.6 Acknowledgements

We acknowledge the expert technical assistance of Lucie Bourget for the flow cytometry analysis and Antoine Caron for the microscopy. We wish to thank Michele P. Calos for the generous gift of pTA-attB and pCMV-Int and John Zwaagstra for reviewing the manuscript. This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (MOP 81296) to RG. This is an NRC publication number: xxxx.

3.7 Disclosure Statement

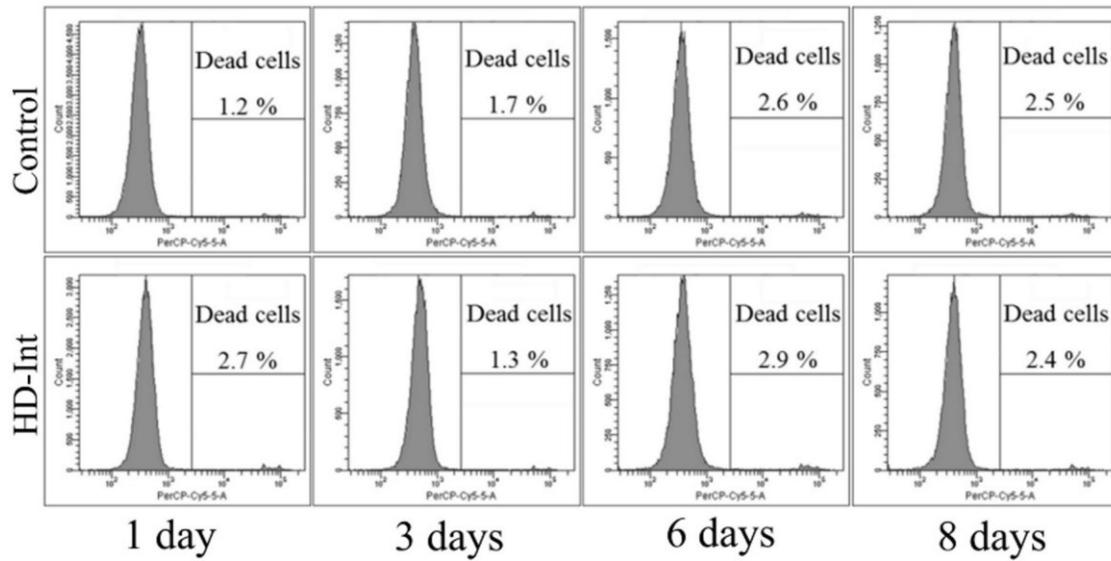
All authors have nothing to disclose

3.8 *Supplementary figures*



Supplementary Figure 3-7. Presence of Φ C31-Int and Cre sequences in HD detected by Southern blot.

DNA was isolated from infected cells and digested with the restriction enzymes as indicated. The membrane was probed with **(i)** a probe against Φ C31-Int sequence or **(ii)** a probe against the Cre sequence. The position of the probes is indicated underneath the diagrams. The sizes of the expected bands are shown above the diagrams. negCTL: DNA isolated from cells infected with the helper virus only.



Supplementary Figure 3-8. Transduction of HeLa cells with HD-Int does not reduce cell viability.

HeLa cells were transduced with HD-Int at an MOI of 20 and were harvested at different time points after transduction. Cells were then stained with propidium iodide and the viability was assessed by flow cytometry. 25,000 cells were analyzed per condition. Control: untransduced cells.

Chapitre 4

4 Strength and muscle specificity of a compact promoter derived from the slow troponin I gene in the context of episomal (gutless adenovirus) and integrating (lentiviral) vectors

short title: Troponin promoter activity in the context of viral vectors

Marc-André Robert^{1,2}, Yuanbang Lin^{1,3}, Mehdi Bendjelloul¹, Yue Zeng¹, Sofien Dessolin¹, Sophie Broussau¹, Nancy Larochelle⁴, Josephine Nalbantoglu⁴, Bernard Massie^{1,5} and Rénaud Gilbert^{1,4,*}

¹Biotechnology Research Institute, National Research Council Canada, Montreal, QC, Canada, H4P 2R2

²Département de Biologie Moléculaire, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

³Department of General Surgery, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin, Heping District, China;

⁴Neuromuscular Research Group, Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, QC, Canada;

⁵Département de Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, QC, Canada.

Corresponding author: Dr Rénaud Gilbert

All materials presented in *Chapter 4* are protected by copyrights, a property of John Wiley & Sons LTD (Wiley-Blackwell). Reproduction is allowed for this thesis.

This article has been published in *Journal of Gene Medicine*, see the reference (670).

Contributions à l'article

MAR : Design expérimental, réalisation des expériences (figures 4-2a, 4-2c, 4-3, 4-4, 4-8a, 4-8b, 4-8c, 4-9), analyse des résultats et rédaction.

YL: Réalisation des expériences et analyse des résultats (figures 4-5, 4-6, 4-7, 4-8d et 4-8e).

MB : Préparation des HD et LV, contribution aux expériences (figures 4-2a, 4-2b, 4-6a, 4-8b et 4-8c).

YZ : Préparation des HD et évaluation

SD : Expériences préliminaires avec lentivirus

SB : Préparation des lentivirus

NL : Injection des souris. Préparation des coupes de muscles sur lame et pour *western*

JN : Design expérimental, discussion et gestion des ressources.

BM : Design expérimental, discussion, gestion des ressources et analyse des résultats.

RG : Idée initiale, design expérimental, discussion, gestion des ressources, analyse des résultats et rédaction.

4.1 *Abstract*

Background: Gutless adenovirus (helper-dependent adenoviral vector; HD) and lentiviral vectors (LV) are attractive vectors for the gene therapy of muscle diseases. Because the organization of their DNA (episomal versus integrated) differs, we investigated whether the strength and specificity of Δ USEx3, a novel muscle-specific promoter previously tested with plasmid, were maintained in the context of these vectors.

Methods: Two HDs expressing β -galactosidase regulated by Δ USEx3 or CAG [cytomegalovirus (CMV) enhancer/ β -actin promoter], and three LV expressing green fluorescent protein regulated by Δ USEx3, CMV or a modified skeletal α -actin promoter (SPc Δ 5-12), were constructed. Gene expression was compared in cell culture and after intravenous (HD only) and intramuscular injection of mice.

Results: Irrespective of the vector used, Δ USEx3 remained poorly active in nonmuscle cells and tissues. In myotubes, Δ USEx3 was as strong as CMV and SPc Δ 5-12, although it was ten-fold weaker than CAG, a proven powerful promoter in muscle. In cell culture, Δ USEx3 activity in the context of LV was more stable than CMV, indicating it is less prone to silencing. In the context of HD, the behavior of Δ USEx3 in skeletal muscle mirrored that of cell culture (10% of the CAG activity and half the number of transduced fibers). Surprisingly, in muscles treated with LV, Δ USEx3 activity was five-fold lower than SPc Δ 5-12.

Conclusions: The data obtained in the present study confirm that Δ USEx3 is a strong and robust muscle-specific promoter in the context of HD (cell culture and *in vivo*) and LV (cell culture). However, it was less efficient *in vivo* in the context of LV.

Keywords: gutless adenovirus; helper-dependent adenovirus; lentivirus; muscle; muscular dystrophy; promoter

Traduction du résumé

Mise en contexte: Les vecteurs adénoviraux sans gène viral (appelés aussi *gutless* ou *helper-dependent adenoviral vector* [HD]) et les vecteurs lentiviraux (LV) sont des vecteurs intéressants pour le traitement des maladies musculaires par thérapie génique. À cause de la différence significative au niveau de l'organisation nucléaire de l'ADN du HD et du LV (épisomique vs intégré), nous avons évalué comment se comportait un nouveau promoteur musculospécifique (Δ USEx3) dans le contexte de ces deux vecteurs. La force et sa spécificité tissulaire de Δ USEx3 ont déjà été étudiées dans le contexte de plasmides, mais jamais auparavant dans le contexte du HD et du LV.

Méthodologie: Deux HD exprimant la β -galactosidase régulée par Δ USEx3 ou CAG [*enhancer* du cytomegalovirus (CMV) / promoteur de la β -actine] ont été construits. Trois LV exprimant la protéine fluorescente verte régulée par Δ USEx3, CMV ou un promoteur de l'actine α squelettique (SPc Δ 5-12) ont également été construits. L'expression génique a été comparée en culture cellulaire, après l'injection intraveineuse (HD seulement) et après l'injection intramusculaire chez des souris.

Résultats: Peu importe le vecteur utilisé, l'activité de Δ USEx3 est demeurée faible dans les cellules et les tissus non-musculaires. Dans les myotubes, bien que l'activité de Δ USEx3 fût aussi forte que le CMV et le SPc Δ 5-12, elle était 10 fois plus faible qu'avec le CAG. En culture cellulaire, l'activité de Δ USEx3 dans le contexte du LV était plus stable qu'avec le CMV, ce qui indique que Δ USEx3 est moins susceptible au phénomène de *silencing*. Dans le contexte du HD, le comportement de Δ USEx3 dans le muscle squelettique était identique à celui en culture cellulaire (10 % de l'activité du CAG) avec près de la moitié des fibres transduites. Dans les muscles traités par les LV, l'activité de Δ USEx3 était 5 fois plus faible que SPc Δ 5-12, ce qui était inattendue puisque l'activité était semblable en culture cellulaire pour les deux promoteurs.

Conclusions: Les données obtenues dans cette étude confirment que Δ USEx3 est un promoteur musculospécifique puissant et robuste dans le contexte du HD (en culture cellulaire

et *in vivo*) et du LV (en culture cellulaire). Toutefois, Δ USEx3 était moins efficace *in vivo* dans le contexte d'un LV.

4.2 *Introduction*

An effective gene replacement therapy for a muscle disease such as Duchenne muscular dystrophy (DMD), will require expression in the muscle of a therapeutic gene product (dystrophin or its paralog utrophin for example) at a sufficient level to correct the pathology caused by mutations of the dystrophin gene. The transfer of a therapeutic gene can be mediated by the injection of plasmid DNA, naked or coupled to various compounds to increase the transfection efficacy, or by using vectors derived from viruses such as adenovirus, adeno-associated virus and lentivirus. As a safety precaution, the expression of the therapeutic gene product should be restricted to the target tissue (i.e. the skeletal muscle in the case of DMD) to avoid the potential side-effect of widespread expression throughout the body. Also, by restricting the expression of the therapeutic gene to the targeted cell type, one can reduce the odd of generating an immune response against its product by preventing expression in specialized antigen-presenting cells (493, 625, 671). In addition to being muscle-specific, the enhancer/promoter complex (herein referred to as a promoter for simplicity) that controls transcription should be sufficiently strong to reduce the amount of vector needed for the therapy. For these reasons, several research groups have developed promoters that are both strong and muscle-specific. Among the most efficient of these muscle-specific promoters is a battery of synthetic promoters made by the random assembly of *cis*-acting myogenic regulatory elements linked to the minimal promoter of skeletal α -actin (624); the MHCK7 promoter, constructed by ligating the α -myosin heavy chain enhancer to the muscle creatine kinase (MCK) enhancer/promoter (210); the dMCK and tMCK promoters, which contain two or three copies of the MCK enhancers ligated to the basal promoter of that gene (626); and the human desmin promoter (326). We have developed strong muscle-specific promoters constructed by ligating several copies of the human slow troponin I (TnI) upstream enhancer (USE) of 160 bp in front of the minimal promoter of that gene. One promoter (Δ USEx3)

contained three copies of a 100-bp deletion of USE (Δ USE). The latter enhancer is active in slow-twitch as well as in fast-twitch muscle fibers because the deletion removed the binding sites for factors preventing transcription in fast-twitch muscle fibers (631). In the context of plasmid DNA, Δ USEx3 is inactive in nonmuscle cells, although it is almost as strong as the ubiquitous cytomegalovirus (CMV) promoter in differentiated myotubes (623). After electrotransfer of plasmid in mouse skeletal muscle, Δ USEx3 was active in both fast-twitch and slow-twitch muscle fibers, and it was as strong as CMV and the hybrid CMV enhancer/ β -actin promoter (CAG, also known as CB). Another valuable characteristic of Δ USEx3 is its relative small size (504 bp), which makes it advantageous for applications where the limited transport capacity of vectors is an issue. Helper-dependent adenoviral vectors (HD), also known as gutless adenoviruses, are promising gene transfer vehicles for the gene therapy application of DMD. Because all of their viral genes have been deleted, they are less toxic and less immunogenic than previous generations of adenoviral vectors where only a few genes were deleted (672). Although plasmid and HD remain both as extrachromosomal elements within the cell nucleus, HD differs from plasmid because its DNA is linear and the extremities are covalently bound to the terminal protein. Its DNA is also associated with several viral core proteins that form a chromatin-like complex. Soon after transduction, the HD DNA–protein complex becomes associated with histones and other cellular proteins (505, 673, 674). Because of their large transport capacity of 35 kb, HD can carry two copies of the full-length dystrophin cDNA or its paralog utrophin. It has been demonstrated that HD-mediated gene transfer in the mouse model of DMD (*mdx* mice) can produce sufficient dystrophin or utrophin to mitigate the pathology caused by the absence of dystrophin (467, 468, 469, 675, 676, 677, 678).

By contrast to HD, lentiviral vectors (LV) can efficiently integrate their genome within the chromosomes of the cells, thus providing genetic stability of the expression cassette in actively dividing cells. For this reason, LV is the vector of choice to genetically correct muscle precursor cells with a functional version of dystrophin for cell therapy of DMD based on an autologous cell transplantation scheme (148, 358, 362). LV can also be used to provide

sustained dystrophin expression after intramuscular injection of dystrophic muscles (288, 354, 355). The packaging capacity of LV can accommodate smaller versions of dystrophin (Becker minidystrophin of 6 kb; micro-dystrophin of 4 kb) but not the full-length dystrophin. Importantly, the functional titer of LV has been reported to decrease proportionally with the size of the insert (311, 312). Consequently, to obtain a good LV titer, it would be advantageous to use a small promoter such as Δ USEx3.

Because the organization of the vector DNA within the cell nucleus (extrachromosomal versus integrated into the chromatin) and the nature of the proteins bound to it could influence the activity of the promoter, we aimed to investigate whether Δ USEx3 remains strong and muscle-specific in the context of an HD and LV. Our data confirm a previous study performed with plasmid DNA (623) showing that Δ USEx3 is indeed a strong and robust muscle-specific promoter in the context of HD (cell culture and *in vivo*) and in the context of LV (in cell culture only). However, unexpectedly and for unknown reasons, Δ USEx3 was far less efficient in skeletal muscle compared to another muscle-specific promoter after gene transfer with LV in skeletal muscle *in vivo*. Our data highlight the difficulty of predicting the behavior of a promoter *in vivo* based on cell culture data and in the context of different vectors.

4.3 *Materials and methods*

4.3.1 Cells and culture conditions

293A (HEK-293), A549, HeLa, Jurkat and C2C12 cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA). 293FLPe cells (450) were a generous gift from P. R. Lowenstein (Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA, USA). The LV packaging cell line (293SF-PacLV) and the 293 cells expressing the reverse tetracycline transactivator (293rtTA) have been described previously (314). Except for 293PacLV and Jurkat, cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (Hyclone Laboratories Inc.,

Logan, UT, USA) supplemented with 5% or 10% (C2C12) fetal bovine serum (FBS) and 2 mM glutamine. 293PacLV were grown in low-calcium-serum-free medium (LC-SFM; Invitrogen, Grand Island, NY, USA) supplemented with 1% FBS. Jurkat were grown in RPMI medium (Hyclone Laboratories Inc.) supplemented with 5% FBS and 2 mM glutamine. The medium for the 293FLPe cells was supplemented with 1.5 µg/ml of puromycin. C2C12 myoblasts were differentiated into myotubes by replacing the FBS with 2% horse serum as described previously (497).

4.3.2 Construction and production of HDs

DNA constructs were produced using standard molecular biology methods. To produce HDs encoding β -gal regulated by CAG (HD-CAGLacZ) or Δ USEx3 (HD- Δ x3LacZ), we first constructed two cosmids (pCos-CBLacZ and pCos- Δ x3LacZ) by inserting the respective β -gal expression cassette into a cosmid (pCosHCAGfp) encoding the genome of an HD (HCAGfp) expressing green fluorescent protein (GFP) regulated by the CMV promoter (679). Cosmid pCosHCAGfp was constructed by inserting the complete genome of HCAGfp obtained by BssHIII digestion of pHCAgfp into the multiple cloning site of pHC79 (ATCC) previously modified with a unique BssHIII site. Packaging of the ligation product into lambda phage and amplification of the cosmid were performed using the Gigapack III packaging extract (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions.

To construct pCos-CBLacZ, the β -gal cassette was removed from pCB-LacZITR (658) by SpeI/PstI digestion, the ends were blunted and the fragment was ligated with pCosHCAGfp previously digested with *Swa*I. To construct pCos- Δ x3LacZ, the β -gal cassette was removed from pTnIS(Im) β - Δ USEx3 (623) by SpeI/XbaI digestion and ligated with pCosHCAGfp previously digested with *Spe*I. The ligation products were packaged and the cosmids were amplified as described above. The HDs were produced by transfection of 293FLPe cells with

the linearized cosmid using Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. The HDs were then amplified by infecting the 293FLPe cells with a helper adenovirus as described previously (450, 658). The helper virus that we used was similar, except that it contains the E3 region and a dsRed expression cassette within its E4 region, which was deleted except for the ORF6 region (unpublished data). The construction of this helper virus will be described elsewhere. The HDs were purified by centrifugation on a CsCl step gradient for 2 h followed by a continuous CsCl gradient for 18 h. After ultracentrifugation, the CsCl was removed from the viral band by chromatography on Sephadex G25 columns (NAP-10 column; GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) and the HD was eluted with 50 mM HEPES (pH 7.5) supplemented with 2 mM MgCl₂, 150 mM NaCl and 5% sucrose. The titer (physical particles per ml) was measured by taking the optical density at 260 nm as described previously (659). The infectious titers of the HDs were measured by flow cytometry (680) on a BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) at 48 h post-infection of 293A cells in the presence of helper virus (FL helper) (450) at a multiplicity of infection (MOI) of 5. The contamination level by the helper virus was determined by plaque assay on 293A cells. The infectious titer of HD (measured by flow cytometry) compared to the titer in plaques forming units revealed that the contamination level as a result of the helper virus was in the range 0.3-5 %.

4.3.3 Construction of LV

The transfer vector (pTet07-CSII-CMV-GFPq) used to produce the conditional self-inactivating (SIN) LV expressing GFP regulated by CMV (LV-CMVGFP) has been described previously (314). To construct a transfer vector (pTet07- Δ x3-GFP) producing the conditional SIN LV expressing GFP regulated by Δ USEx3 (LV- Δ x3GFP), we first constructed pTet07-5-mcs. This was carried out by introducing the Tet07 promoter into the 3' long terminal repeat (LTR) of pCSII-CMV-mcs (681). The Tet07 promoter was removed from pLVR2-GFP (682) by *BsmI/XhoI* digestion and ligated into pCSII-CMV-mcs previously digested with *PmeI* and

BspEI. The CMV promoter of the resulting plasmid was then removed by polymerase chain reaction (PCR) and a unique *PacI* site was inserted at the 5' end of the multiple cloning site, thus generating pTet07-5-msc. The GFP gene was isolated from pCSII-CMV-GFPq (314) by digesting this plasmid with *BamHI* and it was inserted into the unique *BamHI* site of pTet07-5-mcs, thus generating pTet07-GFP. The Δ USEx3 promoter (without the intron) was isolated by PCR using primers 5'-CCTTAATTAAGCCGGCCAGTGAATTGGCGCGCCGT-ACTAGT-3' and 5'-AATACCGGTCCTCCAGTTCCTCGATGGTACCAATTTCG-3' and pTnIS (Im) β - Δ USEx3 (623) as template. The PCR product was digested by *PacI/AgeI* and cloned into pTet07-GFP, thus generating pTet07- Δ x3-GFP. To construct the transfer vector (pTet07- Δ 5-12-GFP) used to produce LV- Δ 5-12GFP, the DNA for SPc Δ 5-12, flanked by *PacI* and a *EcoRI* sites, was ordered from GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ, USA) and cloned upstream of GFP into the *PacI/EcoRI* sites of pTet07-GFP. The sequence of SPc Δ 5-12 is identical to the sequence of SPc5-12 (624) published in patent US2004/0175727 A1, except for an internal deletion of 69 bp (nucleotides 64-133, according to the patent).

4.3.4 Production and titration of LV

LV were generated from producer cells as described previously (683). Briefly, the packaging cell line 293SF-PacLV (314) was transfected with pTet07-CSII-CMV-GFPq, pTet07- Δ x3-GFP or pTet07- Δ 5-12-GFP using polyethylenimine (25 kDa linear; Polysciences, Warrington, PA, USA). The supernatant was harvested 48 and 78 h later, and the LV was concentrated by ultracentrifugation on a sucrose cushion and resuspended in LC-SFM supplemented with 1% FBS. The producer cells were then generated by transducing the packaging cells with the concentrated LV in the presence of polybrene (Hexadimethrine Bromide; Sigma-Aldrich Canada, Oakville, ON, Canada). The LV was produced after expansion of the producer cells and induction with cumate and doxycycline. The supernatant was harvested at 48 and at 78 h post-induction and the LV was concentrated by ultracentrifugation on a sucrose cushion. The

LV was resuspended in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% FBS and kept at -80°C until needed.

The LV titer was determined by transduction of 293rtTA cells. Cells (50 000 per well) were seeded in 24-well plates 24 h before the experiment. The LV were diluted in DMEM supplemented with 5% FBS and 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ polybrene and incubated for 30 min at 37°C . The cell culture medium was removed and the LV/polybrene mix was applied directly onto the cells, which were then incubated overnight at 37°C in the presence of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ doxycycline. In the presence of the inducer (doxycycline), the reverse tetracycline transactivator (rtTA) activates transcription from the left LTR, resulting in a GFP expression event if the gene is regulated by a tissue-specific promoter such as ΔUSEx3 . At 72 h post-transduction, the cells were fixed with 2% paraformaldehyde and the percentage of GFP-positive cells was determined using a BD LSRII flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

4.3.5 Cell transduction and measurement of β -gal and GFP expression

To test the activity of ΔUSEx3 in the context of HD, the day before transduction, 50 000 cells (HeLa, A549, C2C12 and Jurkat) were separated into 24-well plates. The next day, the medium was replaced with 1 ml of fresh medium containing the HD diluted at the desired MOI. Forty-eight hours later, β -gal activity was measured by luminometry using the β -gal chemiluminescent Reporter Gene Assay (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. Production efficacy was expressed as relative units of β -gal activity per μg of total protein determined by the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada). Some cell samples were also detached by incubation with trypsin and fixed with 2% paraformaldehyde. The transduction efficacy was determined by measuring the percentage of GFP-positive cells by flow cytometry using a BD LSRII flow cytometer. To study the efficacy of the promoter

carried by HD in C2C12 myotubes, C2C12 myoblasts at 48 h post-transduction were incubated in differentiation medium (DMEM + 2% horse serum) and β -gal activity was measured as described above 10 days later. For histochemical staining of myotubes, 200 000 C2C12 myoblasts were plated in six-well plates. The next day, the medium was replaced with 2 ml of fresh medium containing the HD diluted at a MOI of 100 transduction units (TU)/cell. Forty-eight hours later, the medium was replaced with differentiation medium and, 10 days later, the cells were fixed with 0.5% glutaraldehyde in PBS for 3 min at room temperature. β -gal was then visualized by incubation with X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside) using standard procedures. To test the activity of the promoter in the context of LV, 293A, HeLa, A549 and C2C12 myoblasts were seeded at 50 000 cells/well in 24-well dishes 24 h before transduction. The LV was diluted in DMEM supplemented with 5% FBS and 8 μ g/ml polybrene and incubated for 30 min at 37°C. The culture medium was removed and the LV/polybrene mix was applied directly onto the cells, which were then incubated overnight at 37°C. The medium was removed and replaced with fresh culture medium. At 48 h (293A, A549, HeLa) or 72 h (C2C12) post-transduction, some cells were detached with trypsin and fixed with 2% paraformaldehyde. The fluorescence index [calculated from the product of (the percentage of GFP-positive cells) and the (mean fluorescence intensity of the GFP positive cell population)] was measured using BD LSRII flow cytometer. The remaining cells were transferred onto six-well plates. Some C2C12 myoblasts were maintained in culture for 2 months and analyzed as described above by flow cytometry at 7, 30 and 60 days post-transduction.

4.3.6 Western blot analysis of GFP expression

The strength of Δ USEx3 in the context of LV in differentiated myotubes was evaluated by measuring GFP expression using Western blotting. At 7 and 60 days post-transduction with the LV, 200 000 myoblasts were plated into six-well plates. The next day, the medium was replaced with differentiation medium. Ten days later, the dishes were washed with PBS and

the myotubes were lysed with 200 µl of lysis buffer 1X [142 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 25 mM HEPES pH 7.5, 2 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 0.3% NP-40) supplemented with 100 µg/ml of protease inhibitors (Roche, Laval, QC, Canada). After 30 min of incubation at 4°C, the lysate was clarified by centrifugation. Protein concentration was determined by the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). The same amount of total protein was analyzed by Western blotting using a rabbit polyclonal antibody against GFP generated using bacterially expressed GFP (684), followed by a horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin IgG antibody (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). As a loading control, the membrane was also incubated with a mouse anti-actin antibody (clone C4; ICN, Aurora OH, USA), followed by horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG antibody (Amersham Biosciences). The signal was revealed by chemiluminescence using the ECL Western Blotting detection reagents (Amersham Biosciences) and analyzed with a digital imaging system (ImageQuant™ LAS 4000 mini biomolecular imager; GE Healthcare).

4.3.7 Animal studies

Animal experiments were performed in accordance with the McGill University and Biotechnology Research Institute Guidelines for animal care. To study the strength of ΔUSEx3 in muscle *in vivo* in the context of HD, the *tibialis anterior* (TA) muscle of neonatal (5-day-old) *mdx* mice (C57BL/10ScSn-*mdx*/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) was injected as described previously (462) once with 10 µl of HD-Δx3LacZ or HD-CAGLacZ at a titer of 3.5×10^{10} or 4.6×10^{10} TU/ml, respectively. At 13 days post-injection, the TA was analyzed for β-gal expression by luminometry and by histochemical staining of cryostat sections as described previously (685). To study the strength of ΔUSEx3 in nonmuscle tissue, 5-6-week-old normal mice (CD1; Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) were injected through the tail vein with 200 µl of PBS containing 2.0×10^9 TU of HD. At 48 h post-injection, the mice were sacrificed and liver, spleen and lungs were harvested and lysed in β-gal buffer for the reporter gene assay (Roche Molecular Biochemicals). The solution was

clarified by centrifugation and β -gal was measured in the supernatant by luminometry in accordance with the manufacturer's instructions. The cell pellet (insoluble tissue fraction) was kept to isolate the DNA for real-time PCR (see below). The data were expressed as relative units of β -gal activity per μ g of total protein determined by the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). DNA was extracted from the insoluble tissue fraction (liver, lung and spleen) by resuspending the insoluble fraction into 0.5 ml of lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.2% sodium dodecyl sulfate, 200 mM NaCl containing 20 μ g/ml proteinase K) and incubated overnight at 50°C. The samples were extracted with phenol/chloroform followed by ethanol precipitation. The DNA pellet was re-suspended in TE buffer and the concentration was determined by spectrophotometry at 260 nm. Quantitative real-time PCR was performed as described above using 40 ng of DNA and primers 5'-TTGCTGGCCTGTTTCAACCTTGCT-3' and 5'-TGCAGTGGCTTTCCTAACACTGGT-3', which bind to a stuffer region of the HD. Values were then normalized to the genomic DNA content using primers for the murine adipsin gene. To compare the strength of Δ USEx3 and SPc Δ 5-12 in muscle *in vivo* in the context of LV, the TA muscle of neonatal (3-5-day-old) *mdx* mice were injected once with 10 μ l of LV- Δ x3GFP or LV- Δ 5-12GFP at a titer of 2.0×10^9 TU/ml in DMEM + 5% FBS, or with the buffer only. At 30 days post-injection, the mice were euthanized and the entire TA were removed and frozen in liquid-cooled isopentane. Cryostat sections (8 μ m thick) were fixed overnight with vapors of formaldehyde at -20°C as described previously (686). The sections were dried at room temperature for 1 min and mounted in Fluormount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) and observed with a confocal microscope (FluoviewTM FV10i; Olympus, Tokyo, Japan). For Western blot analysis of GFP expression, 50 cryostat sections (8 μ m thick) were extracted using 100 μ l of the same buffer as described above for the myotubes. The samples were then clarified by centrifugation and 50 μ g was processed for Western blotting using the same protocol as that for the myotubes. The cell pellet was used to extract the DNA of the sample to measure the number of vector genomes per ng of genomic DNA. The extraction was performed as described above for the tissues injected with the HD. Real-time PCR was performed as described above for the C2C12 myoblasts transduced with the LV.

4.3.8 Statistical analysis

Data were compared with each other using Student's t-test. $p < 0.05$ was considered statistically significant. The HD intravenous injection data were transformed into their natural logarithms before the analyses. All data are presented as the mean \pm SEM.

4.4 Results

4.4.1 Promoters and viral vectors used in the present study

The structures of Δ USEx3 and viral vectors used in the present study are shown in Figure 4-1. Δ USEx3 consists of three copies of the truncated upstream enhancer of the human *slow Tnl* gene (Δ USE) fused to the minimal promoter of that gene (623). To evaluate the strength and tissue specificity of Δ USEx3 in the context of a non-integrating vector, we constructed an HD encoding two copies of β -gal, each regulated by Δ USEx3 (HD- Δ x3LacZ). To facilitate the titration of the HD, we inserted a GFP expression cassette regulated by CMV into the vector. As a control, we constructed a second HD (HD-CAGLacZ), encoding β -gal regulated by the hybrid CMV enhancer/ β -actin promoter (CAG) (687). We used CAG (also known as CB) as a control because this promoter is significantly stronger than CMV in skeletal muscle in the context of HD (497). Because of its strength, CAG has been successfully used to express full-length dystrophin and utrophin in skeletal muscle after gene transfer with HD (467, 468, 469, 676, 678). To investigate the strength and specificity of Δ USEx3 in the context of an integrating vector, we constructed an LV expressing GFP regulated by Δ USEx3 (LV- Δ x3GFP) and, as a control, an LV expressing GFP regulated by CMV (LV-CMVGFP).

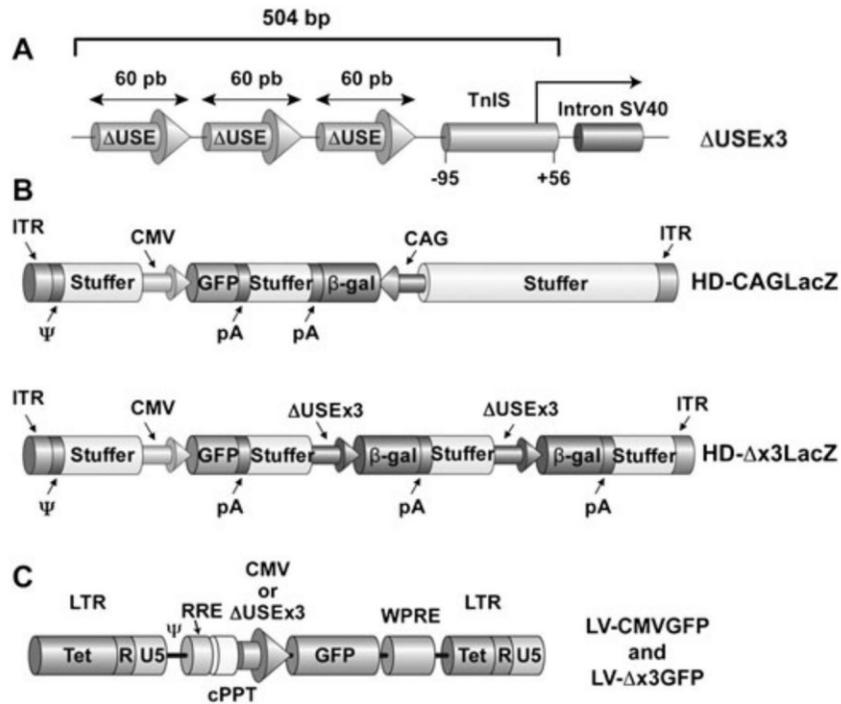


Figure 4-1. Structure of Δ USEx3 and viral vectors.

(A) Cartoon of Δ USEx3. The promoter was made by linking three copies of Δ USE to the minimal promoter of the *slow TnI* gene (623). The numbers below the construct indicate the nucleotide position in the original gene. The construct contains a small intron derived from SV40. (B) Structure of the two HDs encoding β -gal regulated by CAG (HD-CAGLacZ) or Δ USEx3 (HD- Δ x3LacZ). In addition to the β -gal expression cassette, each vector carries an expression cassette for GFP controlled by the CMV promoter. Stuffer, fragment of DNA used to maintain the size of the vector to 32 kb; pA, polyadenylation signal; ITR, inverted terminal repeats; Ψ , packaging signal. (C) Structure of the two LVs encoding GFP regulated by the CMV (LV-CMVGFP) or Δ USEx3 (LV- Δ x3GFP). The structure of the LVs after reverse transcription and integration is depicted. Note that LV- Δ x3GFP does not contain the SV40 intron. Tet, tetracycline-regulated promoter; U5 and R, unique 5' and repeat regions of the LTR; Ψ , packaging signal; RRE, rev-responsive element; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory elements. cPPT, central polypurine track.

4.4.2 Strength and specificity of Δ USEx3 in the context of HD in cell culture

We first compared the activity of Δ USEx3 in the context of HD in cell culture. The vectors were first purified by two rounds of CsCl centrifugation and the infectious titer (TU/ml) was determined by measuring the percentage of GFP-positive cells by flow cytometry after transduction of 293 cells. Nonmuscle cells (HeLa, A549 and Jurkat) and C2C12 myoblasts were transduced with the same quantity (TU/cell) of either HD- Δ x3LacZ or HD-CAGLacZ, and β -gal activity was quantified 2 days later by luminometry. Cultures of transduced myoblasts were also differentiated into myotubes and β -gal activity was measured 10 days later. β -gal activity was normalized to the values obtained with HD-CAGLacZ, which was arbitrarily set to 100. The level of β -gal expression in HeLa, Jurkat and C2C12 myoblasts obtained with HD- Δ x3LacZ (despite the fact that it carries two copies of the β -gal expression cassette) was 2% or less than the value obtained with HD-CAGLacZ. This demonstrates a very weak activity of Δ USEx3 in these cells (Figure 4-2A). In A549 cells, however, Δ USEx3 was more active because the β -gal activity of HD- Δ x3LacZ corresponded to 8.9% of the value of HD-CAGLacZ. Importantly, there was a significant increase of Δ USEx3 activity during muscle differentiation because the β -gal activity of HD- Δ x3LacZ increased from 0.8% in myoblasts to 19% in myotubes compared to HD-CAGLacZ (Figure 4-2A). To confirm the strength of Δ USEx3 in differentiated muscle, myotubes were processed for β -gal histochemistry. Intensely and homogeneously stained myotubes were readily observed after transduction with HD- Δ x3LacZ, thus confirming its strong activity in differentiated muscle cells (Figure 4-2B). The relative weaker activity of Δ USEx3 compared to CAG in myotubes in the context of HD is similar to the value obtained after transfection of plasmids (623). The difference of β -gal activity between the two HDs was not a result of different transduction efficacies because the percentage of GFP-positive cells was the same in HeLa, Jurkat and A549, and only slightly less for HD- Δ x3LacZ in C2C12 myoblasts (Figure 4-2C).

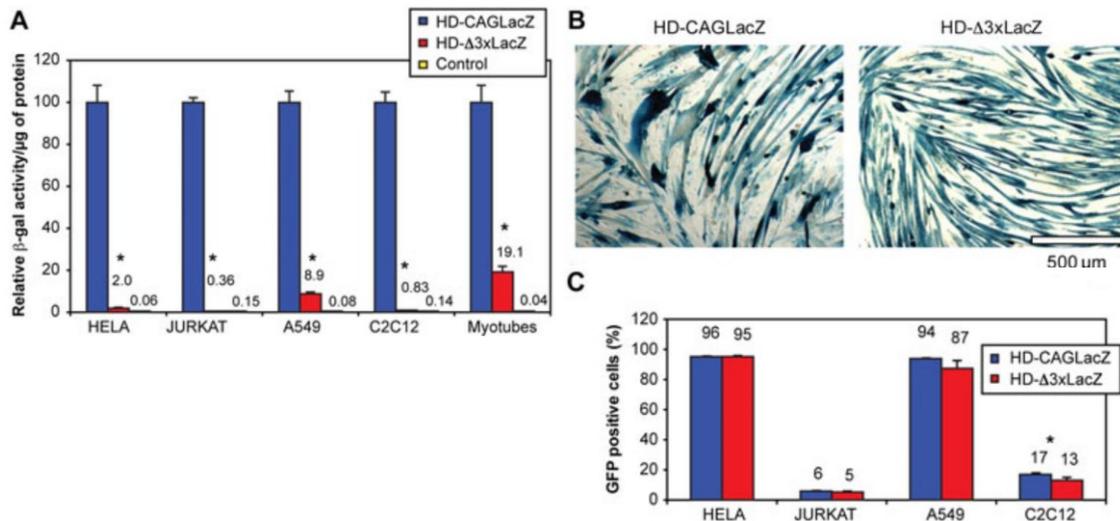


Figure 4-2. β -gal expression after gene transfer with HD-CAGLacZ and HD- Δ x3LacZ in cell culture.

Nonmuscle cells (HeLa, Jurkat and A549) and myoblasts (C2C12) were transduced with the two HDs and β -gal activity was measured 48 h later by luminometry. Some myoblasts were differentiated into myotubes and β -gal expression was measured 10 days later. The MOI used was 25 TU/cell for HeLa and A549, and 100 TU/cell for Jurkat and C2C12. (A) Quantification of β -gal expression. The β -gal activity was normalized to the value of HD-CAGLacZ, which was set arbitrary to 100. *HD- Δ x3LacZ smaller than HD-CAGLacZ (n = 9). (B) Images of myotubes transduced with HD and processed for β -gal histochemistry. The transduced myotubes appear blue. (C) The percentage of cells expressing GFP was determined by flow cytometry at 48 h post-transduction (n = 3). *Means significantly different from each other.

4.4.3 Strength and specificity of Δ USEx3 in the context of HD *in vivo*

Having investigated the activity of HD- Δ x3LacZ in cell culture, the next step was to compare this vector with HD-CAGLacZ *in vivo*. The TA muscle of young (5-day-old) *mdx* mice was injected with comparable amount of HDs and transduction efficacy was analyzed 13 days later. On cryostat sections processed for β -gal histochemistry, strong homogeneously stained β -gal positive fibers were observed after treatment with both HDs (Figure 4-3A). Notably, the mean number of β -gal positive fibers (Figure 4-3B) after treatment with HD- Δ x3LaZ was

approximately half the number obtained with HD-CAGLacZ. That value corresponds to 28% of the average number of fibers (1700) in the TA muscle of *mdx* mice (688). Lysis of muscle and measurement of β -gal produced by HD- Δ x3LacZ showed 20% of the value obtained with HD-CAGLacZ (Figure 4-3C). Taken together, these data demonstrate a strong expression level for a tissue-specific promoter, considering the fact that CAG is the most active regulatory element in skeletal muscle described so far (497, 689). To study the activity of Δ USEx3 in nonmuscle tissues, adult mice were injected through the tail vein with HD- Δ x3LacZ and HD-CAGLacZ at the same titer. The transduction level was determined by measuring β -gal activity by luminometry 48 h post-injection in the liver, lung and spleen. The value was then normalized to the level obtained with HD-CAGLacZ. Compared to HD-CAGLacZ, 23-to 50-fold less β -gal activity was detected in the three organs tested after injection with HD- Δ x3LacZ, thus confirming the weak activity of Δ USEx3 in nonmuscle tissues (Figure 4-4A). This was not a result of the absence of vector DNA in the tissues because the number of vector copies in the three organs tested was comparable between the two vectors injected (Figure 4-4B). It should be noted that the larger variation of the data sets that we observed in the *in vivo* experiments, compared to cell culture, is most likely a consequence of the variability of the injection techniques.

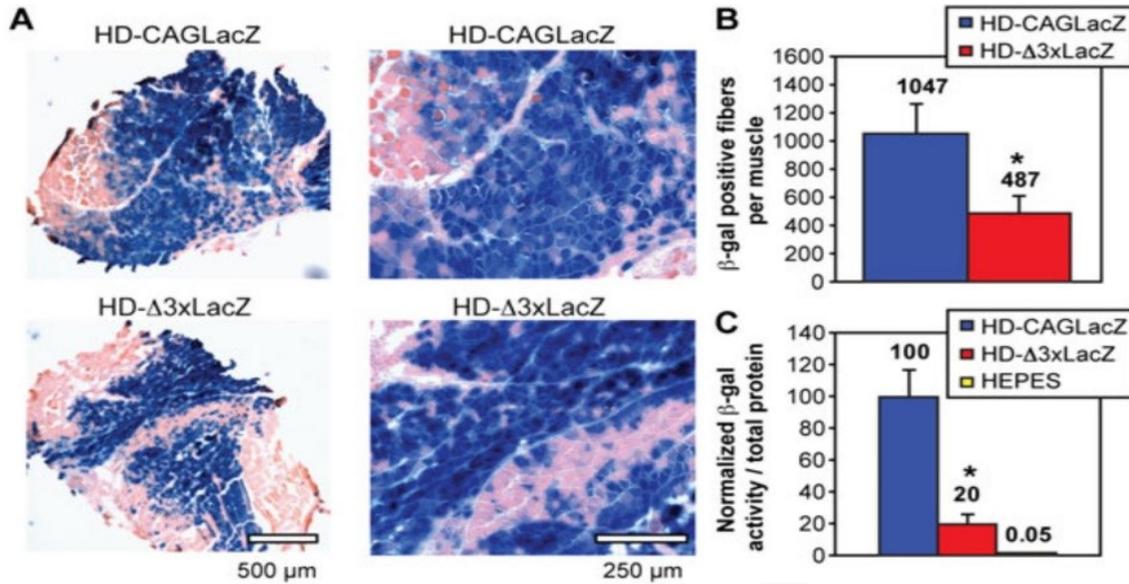


Figure 4-3. β -gal expression after gene transfer with HD-CAGLacZ and HD- Δ x3LacZ in *mdx* mouse muscle.

The TA of 5-day-old *mdx* mice was injected with 10 μ l of purified HD-CAGLacZ (4.6×10^{10} TU/ml) or with 10 μ l of HD- Δ x3LacZ (3.5×10^{10} TU/ml). Thirteen days later, the muscles were processed for β -gal expression. (A) Cryostat sections were processed for β -gal histochemistry. The transduced muscle fibers are blue. The right row shows a higher magnification of the micrographs of the left row. (B) Number of β -gal positive fibers per muscle ($n = 10$); *Means significantly lower than HD-CAGLacZ. (C) β -gal activity measured by luminometry. HEPES, muscles injected with buffer only ($n = 6$); *Mean of HD- Δ x3LacZ significantly lower than HD-CAGLacZ ($n = 10$).

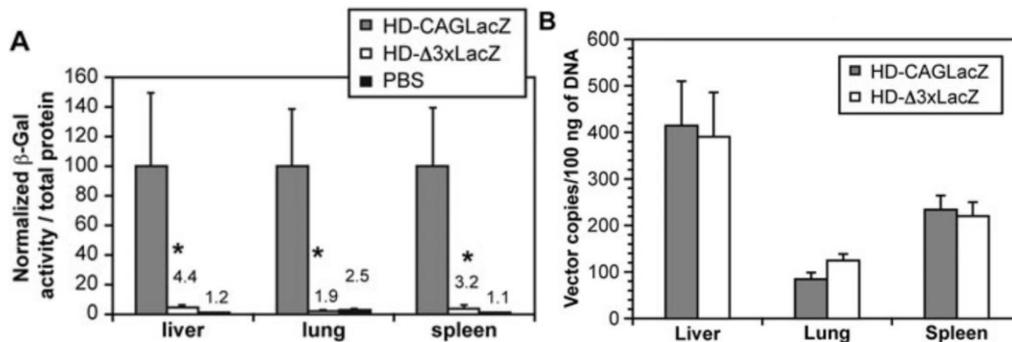


Figure 4-4. β -gal expression after gene transfer with HD-CAGLacZ and HD- Δ x3LacZ in nonmuscle tissues.

Adult normal mice were injected through the tail vein with 2.0×10^9 TU of HD-CAGLacZ ($n = 6$), or HD- Δ x3LacZ ($n = 5$), or with PBS ($n = 5$). (A) Forty-eight hours later, the liver, lung and spleen were analyzed for β -gal expression by luminometry. For each tissue, β -gal activity was normalized to the value obtained with HD-CAGLacZ, which was set to 100. *Means of HD- Δ x3LacZ significantly lower than HD-CAGLacZ. (B) The vector copy number per 100 ng of genomic DNA was measured by real-time PCR. The means were not different from each other.

4.4.4 Strength and specificity of Δ USEx3 in the context of LV

To investigate the strength and muscle specificity of Δ USEx3 in the context of an integrating vector, nonmuscle cells (293, HeLa and A549) and muscle cells (C2C12 myoblasts) were transduced with known amounts of LV expressing GFP regulated by Δ USEx3 (LV- Δ x3GFP) and CMV (LV-CMVGFP) as a control (Figure 4-1). The only difference in the structure of Δ USEx3 between HD and LV is the absence of the SV40 intron in the later vector. These two LVs are derived from a conditional self-inactivating LV (682). After integration, transcription from the left LTR, which produces the LV RNA encompassing the GFP coding sequence, can be initiated by the binding of the rtTA on the Tet operator in the left LTR in the presence of doxycycline. Consequently, GFP can be produced after integration of the LV in cells expressing rtTA even in the absence of internal promoter (314, 682). This property was used to titer the LV by flow cytometry on 293 cells stably expressing the rtTA. 293, HeLa and A549 cells were transduced at a MOI of 10 and C2C12 myoblasts at a MOI of 100 TU/cell. GFP expression was then measured 2 or 3 days later by flow cytometry. Under these experimental conditions, in 293 and HeLa cells (without doxycycline), the GFP expression level conferred by LV- Δ x3GFP was lower than 1% of the value of obtained with LV-CMVGFP (Figure 4-5A). By contrast, in A549 cells, in agreement with our experiments with HD, GFP expression was higher because it corresponded to 12% of the value of LV-CMVGFP. In C2C12 myoblasts, the relative GFP expression level of LV- Δ x3GFP was 29% of the value of LV-CMVGFP. In all cell lines tested, the number of integrated copies of LV was comparable between the two LV, indicating the differential GFP expression level was not a result of different transduction efficacies (Figure 4-5B). We then compared the strength of Δ USEx3 in myotubes after differentiation of previously transduced C2C12 myoblasts. After 10 days in differentiation medium, well developed myotubes were present in the culture. Under the fluorescence microscope, GFP appears as a diffuse green fluorescence staining throughout the myotubes (Figure 4-6A). No difference in the intensity of the fluorescent signal was observed between cells transduced with LV- Δ x3GFP and LV-CMVGFP. To quantify more precisely the level of GFP expression, the myotubes were lysed and GFP was analyzed

by Western blotting (Figure 4-6B). The signal was then quantified and normalized to the value obtained with LV-CMVGFP (Figure 4-6C). There was no significant difference in the amount of GFP produced in cells transduced with LV- Δ x3GFP and LV-CMVGFP. Taken together, these data confirm our experiments with HDs showing that Δ USEx3 is a strong and muscle-specific promoter, regardless of whether it is used in the context of an episomal or integrative vector.

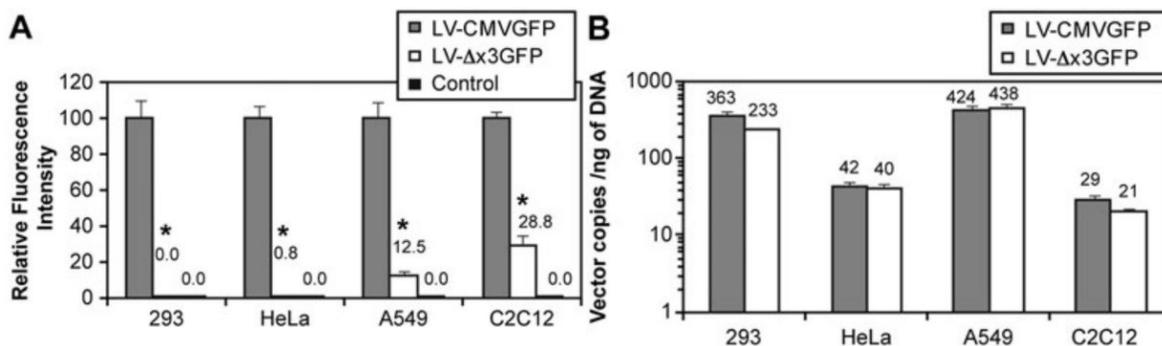


Figure 4-5. GFP expression after gene transfer with LV-CMVGFP and LV- Δ x3GFP in cell culture.

Nonmuscle cells (293, HeLa and A549) were transduced at a MOI of 10 (TU/cell) with the LVs, whereas the myoblasts (C2C12) were transduced at a MOI of 100. (A) The fluorescence index of the cell population [(% of cells expressing GFP) x (green fluorescence intensity of positive cells)] was measured by flow cytometry at 48 h (293, HeLa and A549) or 72 h (C2C12) post-transduction. *Means of LV- Δ x3GFP significantly smaller than LV-CMVGFP (n = 6). (B) The transduction efficacy was determined by measuring the copy number of vector DNA in each cell line by real-time PCR. For a particular cell type, the means are not different from each other (n = 6).

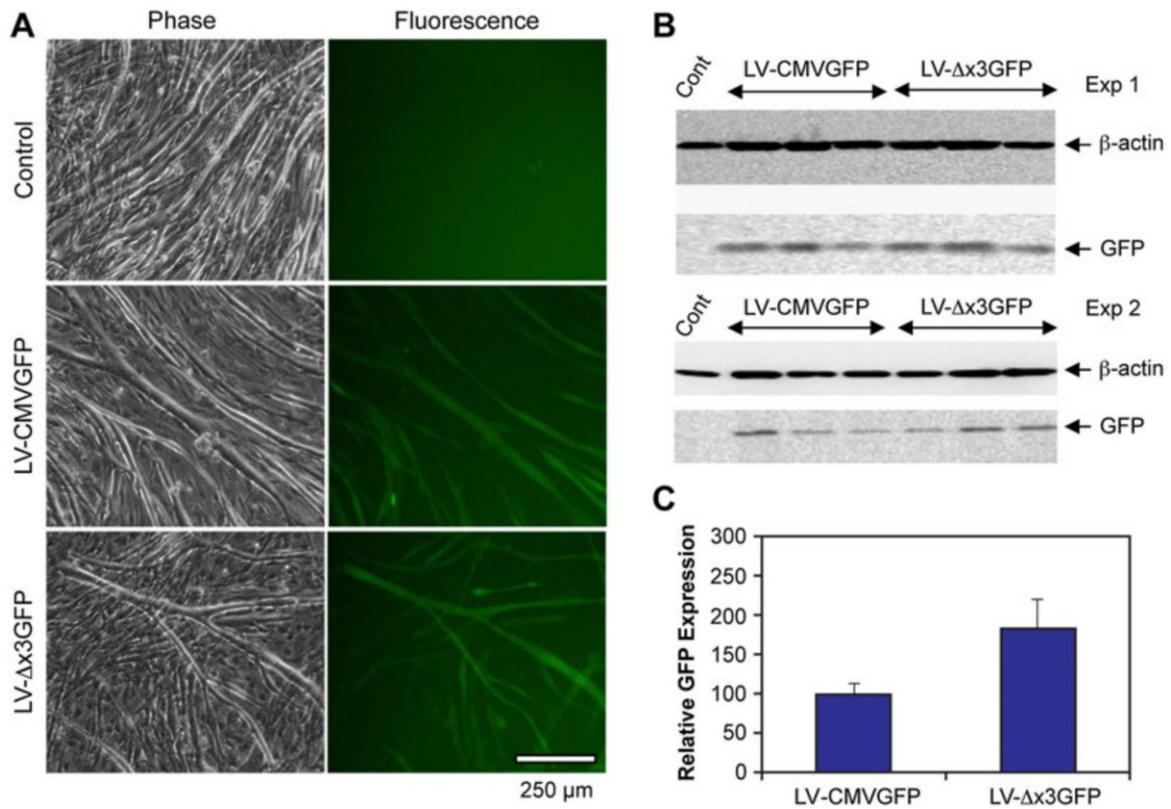


Figure 4-6. GFP expression after gene transfer with LV-CMVGFP and LV-Δx3GFP in cultures of myotubes.

C2C12 myoblasts were transduced at a MOI of 100 with LV-CMVGFP or LV-Δx3GFP. Eight days later, the myoblasts were differentiated into myotubes and processed for GFP expression by Western blot analysis. (A) Image of myotubes 10 days after differentiation. (B) Samples of C2C12 myotubes after 10 days of differentiation from two different experiments (Experiments 1 and 2) were processed for Western blotting using an antibody against GFP. As a loading control, the blots were also incubated with an antibody against β-actin. Cont: nontransduced cells. (C) Quantification of GFP expression. The relative signal intensity of GFP for each sample was normalized to the value of β-actin. The means are not significantly different from each other (n = 6).

4.4.5 The activity of Δ USEx3 is more stable than CMV in cell culture

In addition to specificity and strength, one important property of a tissue-specific promoter is its ability to confer long-term expression by being resistant to promoter silencing. To determine whether another advantage of Δ USEx3 (in addition of its tissue specificity and strength) is its capacity to sustain long-term gene expression, we compared the level of GFP expression in myoblasts previously transduced with LV- Δ x3GFP or LV-CMVGFP for a period of 2 months. GFP expression was also investigated after differentiation of the myoblasts into myotubes at the end of the study. In myoblasts, the activity of Δ USEx3 did not significantly decrease for the duration the study (Figure 4-7A). By contrast, expression from CMV diminished to 13% of the initial value after 2 months. A significant reduction was also observed at 1 month post-transduction (Figure 4-7A). The improved stability of Δ USEx3 was mirrored in myotubes because there was significantly more GFP produced relative to CMV at 2 months versus 8 days post-transduction (Figures 7B and 7C).

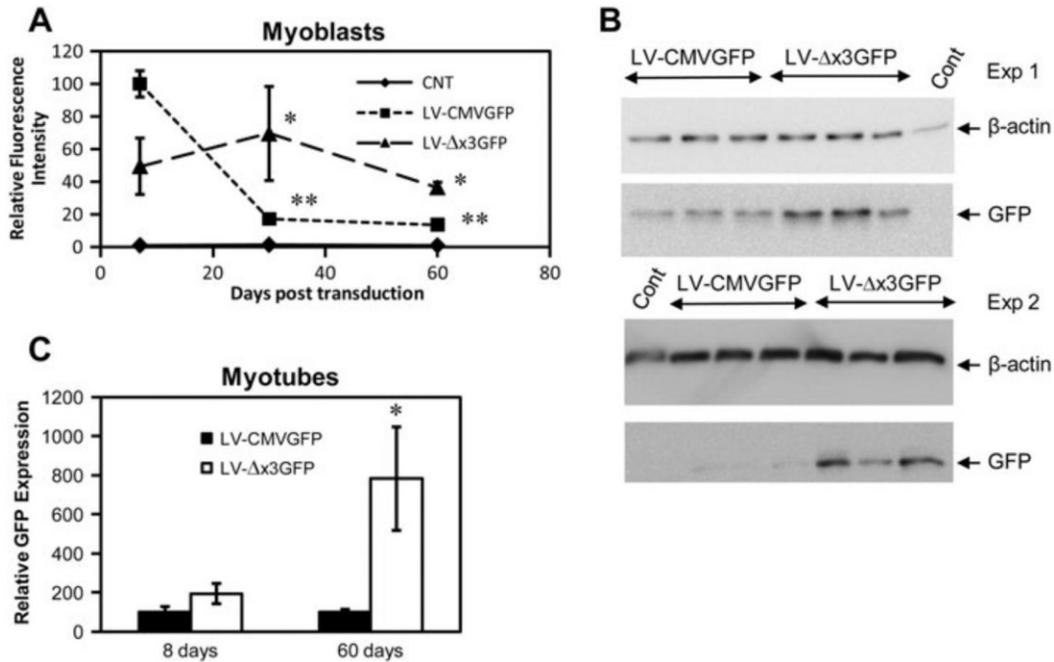


Figure 4-7. The activity of $\Delta USEx3$ is more stable than CMV in the context of LV in muscle cell culture.

C2C12 myoblasts were transduced with LV- $\Delta x3GFP$ or with LV-CMVGFP at a MOI of 100 TU. The transduced and nontransduced control cells (CNT) were maintained in culture for 60 days. The experiment was performed twice in triplicate each time ($n = 6$). (A) The relative GFP fluorescence intensity was measured at 7, 30 and 60 days post-transduction. The data are the fluorescence index [(% of GFP positive myoblasts) x (fluorescence intensity of positive myoblasts)] normalized to the value obtained with LV-CMVGFP at day 7, which was set to 100. The data were normalized to the copy number of LV genome. *Means significantly higher than LV-CMVGFP. **Means smaller than the value at day 7. (B) Western blot analysis of GFP expression in myotubes. At 60 days post-transduction, the myoblasts were differentiated for 10 days into myotubes. The same amount of protein was analyzed by Western blot using an antibody against GFP. As a control, the membrane was incubated with an antibody against β -actin. Cont: nontransduced myoblasts after differentiation into myotubes. (C) The GFP expression level of the myotubes was quantified by scanning the membrane and the signal was normalized to β -actin. The data are compared with the GFP value obtained with LV-CMVGFP, which was arbitrary set to 100. The data of the 8-day time point are the same as in Figure 4-6. The data were normalized to the copy number of LV genome. *Mean significantly higher than LV-CMVGFP.

4.4.6 Comparison of Δ USEx3 with a strong muscle-specific promoter (SPc Δ 5-12) in the context of LV

Strong muscle-specific promoters with activity higher than that of natural promoters can be created by linking together several copies of myogenic regulatory elements (624). To compare the strength of Δ USEx3 with a strong muscle-specific promoter, we constructed an LV expressing GFP (LV- Δ 5-12GFP) regulated by an artificial muscle specific promoter referred to as SPc Δ 5-12. This promoter is identical to SPc5-12 (624), except for a small deletion of 69 bp that removes four myogenic regulatory elements (Figure 4-8A). The structure of SPc Δ 5-12 resembles that of SPc5-5 (624), except for one extra serum response element and one TEF-1 binding site in the SPc Δ 5-12 sequence. In a previous study, it was demonstrated that, in a culture of myotubes, the activity of SPc5-5 was four-fold better than the natural skeletal α -actin promoter and 1.6-fold weaker than SPc5-12 (624). We first compared the activity of SPc Δ 5-12 in the context of LV with that of Δ USEx3 in culture of muscle cells. Actively dividing C2C12 myoblasts were transduced at a MOI of 100 TU with LV- Δ x3GFP and LV- Δ 5-12GFP. The level of GFP expression was then analyzed in actively dividing myoblasts and after differentiation into myotubes (Figure 4-8). In myoblasts, SPc Δ 5-12 was found to be two-fold more active than Δ USEx3. However, after differentiation into myotubes, no difference in the level of GFP expression between the two promoters (as visualized under the fluorescence microscope and after Western blotting) was observed. The activity of Δ USEx3 and SPc Δ 5-12 was also compared in nonmuscle cells. HeLa, A549 and 293 cells were transduced with the two LV at a MOI of 10 TU, and GFP expression was analyzed 48 h later by flow cytometry. The relative activity of the two promoters was close to each other in HeLa [Δ USEx3 was 2.3-fold weaker ($p < 0.01$, $n = 3$)] and in A549 cells [Δ USEx3 was 2.1-fold higher ($p < 0.01$, $n = 3$)]. This contrasts with 293 cells, where the relative activity of Δ USEx3 was 71 fold lower than SPc Δ 5-12 ($p < 0.01$, $n = 3$).

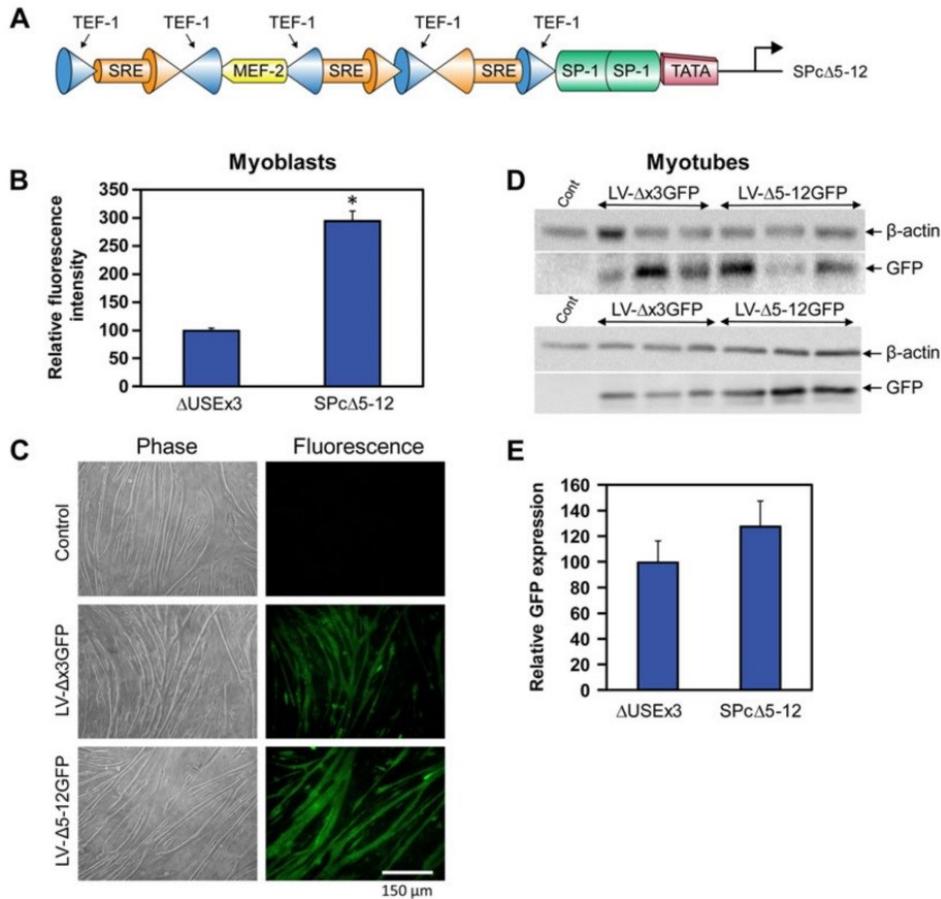


Figure 4-8. Activity of $\Delta USEx3$ and $SPc\Delta5-12$ in the context of LV in muscle cell culture.

(A) Structure of $SPc\Delta5-12$. The position of the myogenic regulatory elements making up this promoter, as well as the TATA box and transcription initiation site (arrow), are shown. This promoter is identical to $SPc5-12$ (624), except for an internal deletion of 69 bp that removes two MEF-2, one TEF-1 and one MEF-1 sites. (B) Strength of the two promoters in dividing myoblasts. C2C12 myoblasts were transduced with LV- $\Delta x3GFP$ or with LV- $\Delta5-12GFP$ using a MOI of 100 TU. The experiment was performed twice in triplicate each time ($n = 6$). The green fluorescence intensity of the cell population was measured by flow cytometry at 3 days post-transduction for one experiment, and at 9 days post-transduction for the other experiment. The data are the fluorescence index [(% of cells expressing GFP) \times (green fluorescence intensity of positive cells)] normalized to the copy number of LV genome. *Means significantly higher than LV- $\Delta x3GFP$. (C) Images of myotubes transduced with LV. At 7 days post-transduction, the myoblasts were differentiated for 10 days into myotubes. Control: myotubes made from nontransduced myoblasts. (D) Western blot analysis of GFP expression in myotubes after 10 days of differentiation. The same amount of protein was analyzed by Western blot using an antibody against GFP. As a control, the membrane was incubated with an antibody against β -actin; Cont: non-infected myotubes. (E) Quantification of GFP in myotubes. The GFP signal intensity was quantified by scanning the membrane and the signal was normalized to β -actin. The data were also normalized to the copy number of LV genome in the cells. Means are not significantly different from each other ($n = 6$).

We then compared the activity of SPc Δ 5-12 in mouse muscle *in vivo*. The TA of neonatal *mdx* mice was injected with the same amount of LV- Δ x3GFP (n = 8) and LV- Δ 5-12GFP (n = 12) and GFP expression was analyzed 30 days later. Examination of muscle cryostat sections with a confocal microscope demonstrated the presence of GFP positive muscle fibers in the muscle treated with LV- Δ x3GFP or LV- Δ 5-12GFP, although the signal intensity was significantly stronger with the latter vector (Figure 4-9A). No such GFP positive muscle fibers were observed in *mdx* muscle injected with the buffer only. The level of GFP expression was then quantified by Western blot analysis. To reduce the experimental variation caused by the injection procedure, only the five best transduced muscles from each group were used for the analysis and the data were normalized to the copy number of the LV genome in the muscle. In agreement with the microscopic observation, more GFP (five-fold) was produced by the muscles transduced with LV- Δ 5-12GFP (Figures 9B and 9C). This contrasts with the myotubes data, where no significant difference of activity was observed between the two promoters.

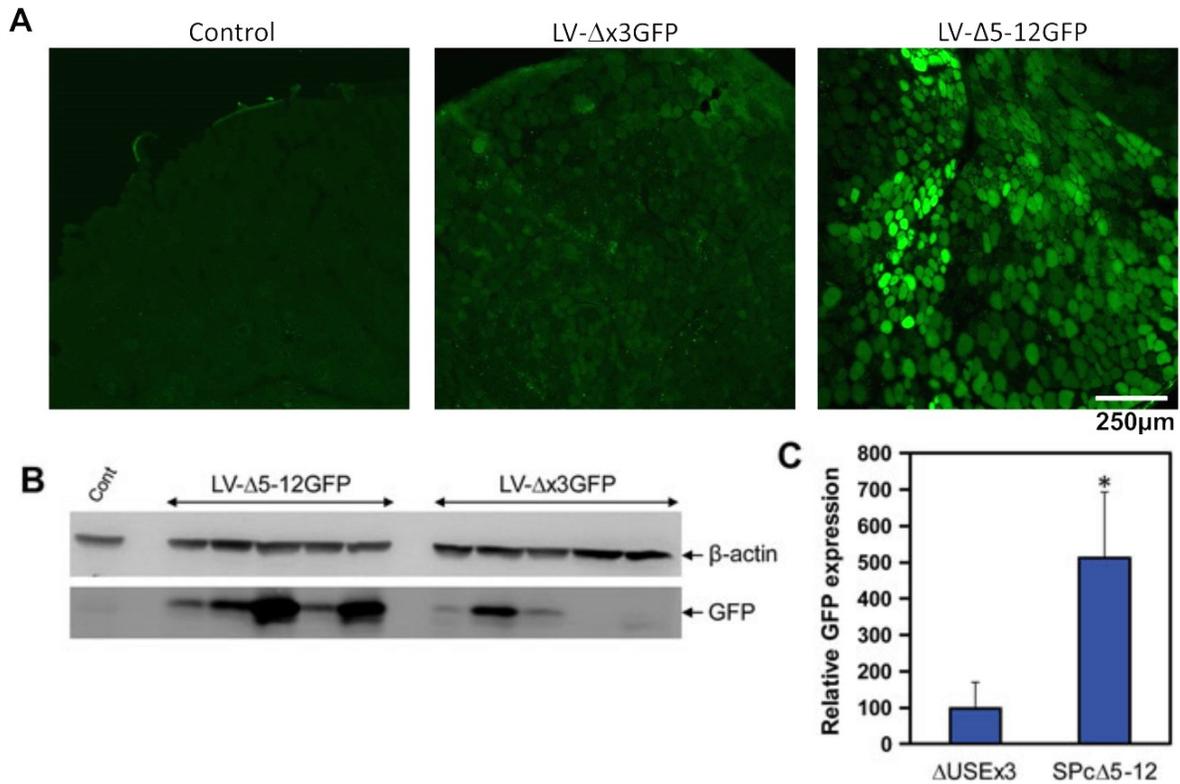


Figure 4-9. Activity of muscle-specific promoters after intramuscular injection of *mdx* mice with LV.

The TA muscles from *mdx* neonates were injected either LV- Δ x3GFP or LV- Δ 5-12GFP. GFP expression was analyzed 1 month later. (A). Picture of GFP signal of cryostat sections of muscle injected either with buffer (Control), LV- Δ x3GFP or LV- Δ 5-12GFP. (B) Western blot analysis of GFP expression in muscle. The five muscles that showed the highest GFP expression for each LV are compared together using an antibody against GFP. As a control, the membrane was incubated with an antibody against β -actin. Cont: muscle injected with buffer only. (C) Quantification of GFP in muscle. The GFP signal intensity was quantified by scanning the membrane and the signal was normalized to β -actin. The data were also normalized to the copy number of LV genome in the muscle. *Means are significantly different from each other (n = 5).

4.5 Discussion

In a previous study (623), we showed that Δ USEx3 was a strong muscle-specific promoter in cell culture and *in vivo*. Because these experiments were performed by transfection of plasmid

DNA, we decided to investigate whether the strength and specificity of the Δ USEx3 was preserved in the context of two different viral vectors, an episomal (HD) and an integrative (LV) vector that have the potential to be used for gene and cell therapy of DMD. We compared the strength of Δ USEx3 in the context of HD with the CAG promoter because this promoter was employed in our previous *in vivo* experiments to drive the full-length dystrophin and utrophin expression in *mdx* mouse muscle (466, 467, 468, 469, 497). CAG is a powerful promoter in skeletal muscle *in vivo* (689, 690) and, in the context of HD, it is much stronger than CMV (497). Because of the large transport capacity of HD, and because our previous experiments with this vectors were performed with HD carrying two copies of the dystrophin or utrophin cDNAs, we tested a vector (HD- Δ x3LacZ) that contained two copies of the Δ USEx3 expression cassettes. Despite these two promoter copies, Δ USEx3 was still weaker than CAG in differentiated muscle. When normalized for the number of promoters carried by the HD, the activity of Δ USEx3 (by comparing the amount of β -gal produced) was ten-fold weaker than CAG in cultures of myotubes and in skeletal muscle *in vivo*. Notwithstanding its weaker activity, several observations indicate that Δ USEx3 is a strong promoter in muscle in the context of HD: (i) β -gal activity after gene transfer with HD- Δ x3LacZ in myotubes and in muscle *in vivo* was 400-fold greater than the background value of mock transduced cells and tissues; (ii) obvious and strongly stained β -gal positive myotubes and muscle fibers were detected after treatment with HD- Δ x3LacZ (Figures 2B and 3A); and (iii) on average, almost 500 muscle fibers (28% of the TA muscle fibers) (688) were producing a detectable amount of β -gal after a single injection of HD, which is significantly more than when similar experiments were performed with an HD carrying dystrophin regulated by CMV (659). We have previously observed that the strength of CAG was comparable to Δ USEx3 and CMV after electrotransfer of plasmid in skeletal muscle (623). By contrast, in the context of HD, CAG is more efficient than Δ USEx3 (Figure 4-3) and CMV (497). The reason for this is not clear. The DNA of both HD and plasmid becomes associated with nucleosomes in the cell nucleus after transduction (505, 673, 674, 691). However, the HD DNA is also associated with viral core proteins and the terminal protein. It is possible that this unique protein-DNA complex facilitates transcription from certain promoters such as CAG. An important property of a muscle-specific promoter is its level of activity in nonmuscle cells, which ideally should be

weak. Indeed, except for a higher activity in A549 (cells derived from human lung tumor), the relative activity of Δ USEx3 in nonmuscle cell lines and tissue (lung, liver and spleen) was no greater than 2% of the value obtained with CAG (after normalization for the promoter copy number). Taken together, these data indicate that Δ USEx3 remains a strong muscle-specific promoter in the context of HD both in cell culture and *in vivo*. In a culture of myotubes at early time points (less than 2 weeks) after transduction with LV, the activity of Δ USEx3 was comparable to the strong ubiquitous CMV promoter, indicating it is strongly active *in vitro* in muscle culture. Most importantly, in actively dividing myoblasts, we showed that gene expression provided by Δ USEx3 was significantly more stable than CMV during 2 months of culture. This observation is consistent with previous studies showing that the CMV promoter is prone to silencing in the context of episomal as well as integrative vectors (618, 692, 693). For this reason, even if muscle specificity was not an issue, Δ USEx3 would be preferable to CMV for driving sustained gene expression in muscle cell culture. The muscle specificity of Δ USEx3 was also maintained in the context of LV, as demonstrated by the fact that its activity in HeLa and 293A cells was lower than 1% of the activity of CMV. The relative activity of Δ USEx3 in A549 cells (12% of the value of CMV) is higher than the values measured after transfection of plasmid (lower than 2%) (623). The reason for this difference is not clear. The integration pattern of the LV, which possesses a preference for actively transcribed genes (694), might facilitate the interaction of Δ USEx3 with muscle transcription factors that could be present at low level in this cancer cell line. Alternatively, active enhancers present in the vicinity of the LV integration site might transactivate the Δ USEx3 promoter. We also observed that Δ USEx3 was more active in C2C12 myoblasts (29% of the value of CMV) in the context of LV compared to HD (Figures 2 and 5). This is clearly a property of LV because the activity of Δ USEx3 after transient transfection of plasmid in C2C12 myoblasts corresponds to 0.4% and 3% of the value of CAG and CMV, respectively (unpublished observations). As hypothesized for A549 cells, the microenvironment of the active transcription units where LV is preferentially integrated could be responsible for this difference. Insertion of *cis*-acting DNA elements, such as insulators within the LV backbone (695), might protect the activity of Δ USEx3 from being modulated by the presence of *cis*- and *trans*-acting elements in the vicinity of the integration sites in the genome.

We also compared Δ USEx3 in the context of LV with a small synthetic muscle-specific promoter (SPc Δ 5-12), that was constructed by linkage of several myogenic regulatory elements to the minimal promoter of the skeletal α -actin promoter. The structure of SPc Δ 5-12 resembles that of SPc5-5 (624). In cultures of muscle and nonmuscle cells, the activity of SPc Δ 5-12 was comparable to Δ USEx3, except in 293 cells where it was significantly stronger. This was not the case after gene transfer in skeletal muscle *in vivo* because Δ USEx3 was found to be five-fold weaker than SPc Δ 5-12. The reason for this discrepancy between the cell culture and *in vivo* data is not clear. The unique properties of the skeletal muscle fibers (long-lived, post-mitotic, very large polynucleated cells) obviously differ from those of myotubes in cell culture. Additionally, the response of fibers to cues of the micro-environment should affect gene expression by certain pathways stimulated only *in vivo*. After integration, it is possible that Δ USEx3 is silenced by some epigenetic modifications of the chromatin. If this were the case, a *cis*-acting DNA sequence (insulator elements, matrix attached regions, chromatin opening elements) known to protect genes from silencing could be inserted into the backbone of the LV to restore the activity of Δ USEx3 *in vivo* (512, 695, 696). Another possibility for the weak activity of Δ USEx3 *in vivo* could be the presence of a repressor that would inhibit transcription. If such a repressor is produced by the muscle fibers, it would be less active on an episomal vector because excellent transgene expression was demonstrated after gene transfer of plasmid DNA (623) or after injection of HD (Figure 4-2). A few very strong muscle-specific promoters (SPc5-12, MHCK7, dMCK and tMCK, as well as the human desmin promoter), whose activity in skeletal muscle are either equivalent or even better than CMV, have been described previously (210, 326, 624, 626). Unfortunately, none of these promoters were evaluated in the context of HD. Although none of them were compared side by side with the CAG in the context of viral vectors, SPc5-12 was shown to be weaker than CAG after transfection of plasmid in muscle cell culture and after electrotransfer in skeletal muscle *in vivo* (690). Skeletal mouse muscle has been reported to be difficult to transduce with LV (354, 355) and only a few studies have evaluated the efficacy of muscle-specific promoters with this vector. In the context of LV, the desmin promoter showed an efficacy comparable to

CMV in culture of C2C12 myotubes and, consequently, its activity is comparable to Δ USEx3. *In vivo*, the strength of desmin promoter was equivalent to CMV. Desmin promoter was also more efficient than the MCK promoter. Interestingly, good transduction has been reported in *mdx* skeletal muscle *in vivo* using the promoter of skeletal α -actin (354). Our *in vivo* data showed that SPc Δ 5-12, which also contains the minimal promoter of skeletal α -actin, is significantly better than Δ USEx3, suggesting that some *cis*-acting DNA elements within this promoter are advantageous for gene transfer in skeletal muscle in the context of LV. Several synthetic powerful muscle-specific promoters containing the minimal promoter of skeletal α -actin have been described (624). These promoters were selected from a screen in muscle cell culture. Because our data show it is difficult to predict the behavior of a promoter *in vivo* based on cell culture data, it would be interesting to analyze some of these promoters in the context of LV *in vivo* to determine whether some are better than SPc Δ 5-12.

Another interesting property of Δ USEx3 is its relative small size of 504 bp (without the intron). It is larger than SPc5-12 (335 bp) and SPc Δ 5-12 (266 bp), although it has the same size as dMCK (509 bp). It is smaller than tMCK (720 bp), MHCK7 (770 bp) and the desmin promoter (1.7 kb). Although the promoter size is not an important issue when dealing with a vector such as HD with a large transport capacity of 35 kb, this is not the case when using vectors with smaller transport capacity such as LV (6-7 kb, to obtain optimal titers) or single-stranded AAV (4.7 kb) or double-stranded AAV (2.3 kb). This is particularly important for gene therapy of DMD because even the microdystrophin (4-5 kb) and the Becker minidystrophin (6.0 kb) are encoded by relatively large cDNAs that are at the limit of the transport capacity of AAV and LV, respectively. In theory, the size of Δ USE3 could be reduced further by removing the linker DNA sequences that flank the Δ USE enhancer. The size of Δ USEx3 without the linker sequence could be as small as 332 bp (3 x 60 bp + 152 bp for the minimal promoter).

4.6 *Conclusions*

Our data confirm our previous study performed with plasmid DNA showing that Δ USEx3 is a strong and robust muscle-specific promoter in the context of HD (cell culture and *in vivo*) and in the context of LV (in cell culture) (623). However, Δ USEx3 was less efficient in skeletal muscle *in vivo* after gene transfer with LV. In a culture of dividing myoblasts, gene expression from Δ USEx3 was stable for at least 2 months. It is therefore an excellent muscle-specific promoter for driving sustained gene expression in cell culture. Our data highlight the difficulty of predicting the behavior of a promoter in skeletal muscle based on cell culture data and in the context of different vectors.

4.7 *Acknowledgements*

We acknowledge the expert technical assistance of Carol Allen for the muscle histochemistry, Lucie Bourget for the flow cytometry analysis and Antoine Caron for the microscopy. Y.L. is a recipient of NRC-MOE Research and Postdoctoral Fellowship Program. J.N. is a National Scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec and a Killam Scholar. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP 81296) to R.G. The authors declare that they have no conflicts of interest. This is NRC publication number: 53183.

Chapitre 5

5 Un retour sur les articles

Pour la thérapie génique, l'un des défis actuels est de développer des vecteurs efficaces et sécuritaires qui permettront de rétablir l'expression de la dystrophine dans les muscles des patients DMD. Des nouvelles stratégies doivent être explorées pour éventuellement être capable de traiter des patients. Parmi les vecteurs viraux les plus prometteurs, mes travaux se focalisent principalement sur le HD. Son avantage principal est qu'il peut transporter la séquence codante entière pour la dystrophine, contrairement à d'autres vecteurs viraux comme l'AAV et le LV. Le HD a été utilisé avec succès chez la souris *mdx* pour rétablir l'expression de la dystrophine (468) ou de l'utrophine (469). Malgré la capacité du HD à mitiger la pathologie après l'injection, l'expression des transgènes s'estompe progressivement après plusieurs mois, de même que son effet thérapeutique.

Mon projet explore deux approches qui pourraient potentiellement être utilisées pour stabiliser l'expression de la dystrophine dans les muscles. La première consiste à protéger l'ADN du HD de l'élimination en l'intégrant dans les chromosomes cellulaires. Le premier article (*Chapitre 3*) est en lien avec cette approche et se concentre sur une caractérisation de l'intégration du HD en présence de l'intégrase du phage Φ C31. La deuxième approche consiste à utiliser un puissant promoteur musculospécifique (Δ USEx3) pour réduire la réponse immunitaire en exprimant le transgène uniquement dans les cellules musculaires et limiter les effets du *silencing*. La deuxième étude (*Chapitre 4*) explore la régulation du promoteur en déterminant l'effet du contexte viral sur son activité. Dans les prochaines sous-sections, je vais récapituler brièvement les éléments importants tirés de ces deux articles qui explorent ces approches.

5.1 *Intégration site-spécifique du HD à l'aide de l'intégrase du phage ΦC31*

Dans les cellules en division active (comme dans les myoblastes), le HD ne permet pas l'expression durable du transgène parce que son ADN n'est pas répliqué. L'intégration de son ADN dans les chromosomes pourrait alors permettre sa réplication et conduire à l'expression stable d'un transgène. Une intégrase, celle du phage ΦC31, a été employée pour intégrer spécifiquement l'ADN du HD dans les chromosomes. L'intégrase du phage ΦC31 fait partie de la famille des larges recombinases à sérine (580). Dans son environnement normal, elle recombine ensemble les séquences (~50-pb) *attB* et *attP* présentes dans les chromosomes bactériens et chez l'ADN circulaire du phage respectivement (581). Chez les mammifères, on retrouve plusieurs centaines de sites *pseudo-attP* endogènes toujours actifs qui sont répartis sur les chromosomes (574, 576). Un ADN quelconque transportant un site *attB* peut alors être intégré par l'intégrase. Jusqu'à présent, un seul article montre que l'intégrase peut être employée pour intégrer le HD. Son intégration augmente et stabilise l'expression du facteur IX dans les cellules hépatiques (572). Par contre, seulement un portrait partiel de l'activité de l'intégrase a été dressé. Une étude plus approfondie s'imposait afin de mieux connaître le potentiel de l'intégrase pour des applications avec le HD. Mes travaux présentés dans le premier article (*Chapitre 3*) sont réalisés dans un contexte *in vitro*. Les débouchés seront utiles pour la thérapie cellulaire, mais aussi en prévision d'études pour l'injection directe de vecteurs chez les animaux. Pour investiguer le potentiel de l'intégrase, j'ai produit un HD contenant le gène de résistance à la puromycine et un site *attB*. Le gène de résistance permet de mesurer avec précision le nombre d'événements d'intégration du HD parmi une population de cellules données. La sélection permet aussi de générer des clones pour l'étude d'événements uniques d'intégration. Par conséquent, un tel HD m'a permis de mesurer l'efficacité d'intégration, mais aussi d'étudier les sites d'intégration dans les cellules humaines et dans les cellules musculaires de souris.

Voici une liste des *points saillants* rapportés dans mon étude.

- 1) Le HD n'a pas besoin d'être circularisé pour être intégré par l'intégrase et l'intégration est plus efficace en absence de circularisation.
- 2) L'intégrase augmente jusqu'à 18 fois le niveau d'intégration du HD.
- 3) Un maximum absolu d'efficacité d'intégration de 0,5 % a été obtenu dans les cellules humaines et de 0,1 % dans les cellules musculaires de souris.
- 4) Jusqu'à 76 % des événements d'intégration étudiés ont eu lieu dans un site *pseudo-attP*.
- 5) Certains sites dans le génome sont plus propices pour l'intégration du HD.
- 6) Le quart des sites choisis par l'intégrase ont également été rapportés dans d'autres études réalisées avec des plasmides.
- 7) Une seule copie du HD est intégrée chez 70 % des clones étudiés. Des délétions dans les extrémités du HD ont été observées chez la plupart de ces clones.
- 8) L'expression de l'intégrase dans les myoblastes entraîne une faible augmentation du nombre de brisures double-brin (de 2 à 3 fois) par rapport au contrôle sans intégrase.

En conclusion, le système que j'ai développé est efficace, peu génotoxique et permet à la majorité du HD d'être spécifiquement intégré selon un profil d'intégration prévisible. L'intégration du HD, à l'aide de l'intégrase du phage Φ C31, est une alternative intéressante aux plasmides pour plusieurs applications *in vitro*.

5.2 *Étude contextuelle du HD et du LV sur l'activité du promoteur Δ USEx3*

La régulation de l'expression génique d'un promoteur peut être modulée par l'environnement cellulaire et extracellulaire (621). Une baisse d'activité du promoteur sous le seuil thérapeutique peut entraîner une perte d'efficacité du traitement. Des promoteurs ubiquitaires très puissants et très utilisés (comme le CMV) peuvent éventuellement s'atténuer *in vitro* ou *in vivo* par le phénomène de *silencing* (618, 692). Il a été démontré que l'utilisation de

promoteurs tissu-spécifiques stabilisaient l'expression d'un transgène *in vivo* (493, 646). Des membres de mon laboratoire ont publié une étude (623) et déposé un brevet (640) à propos d'un nouveau promoteur musculospécifique, le Δ USEx3 dérivé du gène de la troponine I lente. Afin d'approfondir nos connaissances sur la régulation de ce promoteur pour un emploi futur dans des vecteurs thérapeutiques, j'ai investigué l'influence du contexte de deux vecteurs viraux sur les propriétés de Δ USEx3. Pour ce faire, nous avons construit un HD transportant un gène rapporteur et nous avons étudié l'activité de Δ USEx3 dans le contexte de ce vecteur. L'ADN du HD demeure majoritairement épisomique. Nous avons également produit un vecteur lentiviral, transportant le même promoteur et un gène rapporteur. Les LV possèdent la capacité de s'intégrer efficacement, ce qui nous permet d'étudier l'activité du promoteur dans l'environnement chromosomique. Avec le HD et le LV, nous avons étudié le comportement de Δ USEx3 *in vitro* et *in vivo*.

Voici une liste des *points saillants* rapportés dans notre étude.

- 1) **Δ USEx3 est peu actif dans les cultures de cellules non musculaires et musculaires (myoblastes) non différenciées peu importe le vecteur, mais il devient aussi puissant que le promoteur CMV après la différenciation des myoblastes.**
- 2) **Le traitement de myoblastes en culture par des LV montre que Δ USEx3 est plus stable et plus puissant que le promoteur CMV à 60 jours post-transduction.**
- 3) **L'activité de Δ USEx3 est faible dans les cellules non musculaires après la livraison d'un LV. L'activité est puissante et comparable à un autre promoteur musculospécifique (SPc Δ 5-12) dans les cellules musculaires différenciées.**
- 4) **Lorsque livré par HD via la voie systémique, Δ USEx3 est faiblement actif dans les tissus non musculaires, mais l'injection intramusculaire conduit à une forte expression dans plus du quart des fibres du muscle traité.**
- 5) **L'injection intramusculaire du LV permet une bonne transduction du muscle. Cependant, l'activité de Δ USEx3 est relativement faible par rapport au SPc Δ 5-12.**

Globalement, le promoteur Δ USEx3 est puissant et robuste lorsque transporté par le LV (sauf *in vivo*) et aussi par le HD. Après la transduction de myoblastes avec le LV, l'expression d'un transgène régulée par le promoteur Δ USEx3 est plus stable et plus puissante que le promoteur ubiquitaire CMV après 60 jours de culture. Δ USEx3 est comparable en puissance et plus spécifique que le promoteur musculospécifique (SPc Δ 5-12) en culture cellulaire. Toutefois, lorsque les promoteurs sont comparés dans l'environnement musculaire, le SPc Δ 5-12 est plus actif que le Δ USEx3 suite à l'injection d'un LV. La régulation de l'activité des promoteurs est donc différente *in vitro* et *in vivo*. En plus de l'environnement musculaire, le contexte du vecteur pourrait également influencer l'activité relative de Δ USEx3, puisque dans le cas du HD (contrairement au LV), elle était très élevée. Par conséquent, l'environnement musculaire et le contexte du vecteur influencent l'activité de Δ USEx3.

Chapitre 6

6 Discussion générale, les perspectives et conclusion

L'intégrase du phage Φ C31 présente beaucoup d'intérêt pour la manipulation génétique, car elle peut s'avérer utile pour plusieurs applications *ex vivo* et *in vivo* pour la thérapie génique. Elle agit de façon site-spécifique. L'intégrase peut intégrer de longs fragments d'ADN efficacement en opérant de façon unidirectionnelle lorsque ses cofacteurs sont absents (587, 697). L'intégrase du phage Φ C31 est couramment utilisée pour intégrer des plasmides et plus récemment, le HD (572). L'intégrase s'inscrit dans une liste d'outils moléculaires capables de modifier génétiquement le génome. Certaines transposases, recombinases et nucléases peuvent augmenter de plusieurs fois l'intégration d'un vecteur. La **Table 6-1** dresse un portrait de ces outils. L'intégrase se classe à peu près à mi-chemin entre les transposases et les nucléases pour la spécificité.

En termes d'efficacité, tous les systèmes présentés sont comparables, bien que certains soient plus ou moins efficaces selon les conditions expérimentales employées lors des études. Plusieurs caractéristiques, incluant l'efficacité d'intégration, la spécificité d'intégration et l'innocuité de l'intégrase seront discutées, car elles sont essentielles à considérer pour les applications en thérapie génique (thérapie cellulaire et injection directe *in vivo*).

Table 6-I. Comparaison des outils moléculaires les plus prometteurs pour la thérapie génique

CARACTÉRISTIQUES	TRANSPOSASE			LARGE RECOM- BINASE À SÉRINE	<i>TALEN</i> (713, 714, 715)	ENDONUCLÉASES	
	Tol1/Tol2 (698, 699, 700)	Sleeping Beauty(583, 596, 701, 702, 703, 704, 705, 706)	Piggybac (703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710)	Intégrase Φ C31 (576, 583, 597, 598, 601, 703, 711, 712)		Nucléases à doigts de zinc (ZFN) (703, 716, 717, 718, 719)	Méganucléases (719, 720, 721)
Organisme	Poisson medaka	Salmonidés	Fausse arpendeuse du chou	Bactériophage phiC31	Synthétique	Synthétique	Synthétique ou <i>S.cerevisiae</i> , organismes divers
Efficacité	++ / ?	+++	+++	++ ½	+++	+++	+++
Spécificité	++	+	+	++++	+++++	+++++	+++++
Reconnaissance	~ 8 pb	2 pb	4 pb	30 - 40 pb	1 - pbDR *dimère ~30-50 pb	3 - pbd * dimère ~18-24 pb	14 - 40 pb
Intégration	Réversible, laisse des traces	Réversible, laisse des traces	Réversible, sans trace laissée	Irréversible sans cofacteur (gp3 [RDF])	Irréversible	Irréversible	Irréversible
Mécanisme	Couper / coller	Couper / coller	Couper / coller	Recombinaison	RH	RH	RH
Taille transgène	2,1 - 22,1 kb / 11 - 70 kb	6 kb	> 18 - 100 kb	> 7 - 100 kb	> 2,7 kb	> 8 kb	> 5,5 kb
Améliorations	-	SB100x	7pB, hPB et autres mutants hyperactifs	Plusieurs mutants hyperactifs NLS	NLS	Domaine de dimérisation, NLS	NLS
Sécurité (innocuité)	+	+	+	+++	++++	++++	++++½
Activation oncogénique	++++	++++	++++	++	+	+	+
Brisures double-brin	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
Translocations	Possible	Possible	Possible	Oui, variable	Voir ZFN	Très faible	Voir ZFN
Préférence intégration	Unités de transcription , îlots CpG	Introns ou aléatoire	Unités de transcription, îlots CpG	Régions dense en gènes, introns	Site choisi, possibilité hors cible	Site choisi, possibilité hors cible	Site choisi, possibilité hors cible
Essais cliniques	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non

RH : Recombinaison homologue

pbd : paires de bases par doigt ; pDDR : paire de base par domaine répété

kb et pb : kilo paire de base, paire de base respectivement

+ : classification relative selon l'information disponible

6.1 *Efficacité d'intégration*

Un bon outil moléculaire devra être efficace de sorte qu'un maximum de cellules traitées puisse intégrer le transgène. Une bonne efficacité d'intégration en thérapie cellulaire réduit le nombre d'amplifications nécessaires avant de réaliser une greffe. C'est un avantage double puisque qu'il est possible d'obtenir rapidement beaucoup de matériel et d'éviter de cultiver trop longtemps les cellules. La culture prolongée de myoblastes réduit leur efficacité à être greffés (126) (pour revue, (38)). Pour l'injection directe d'un HD *in vivo*, l'intégration d'une grande quantité de vecteurs permettrait de mieux protéger son ADN contre l'élimination et donc, de prolonger l'expression du transgène (c'est le but de mon projet).

Un défi majeur en thérapie cellulaire est d'intégrer assez efficacement le transgène sans recourir à la sélection pour enrichir les intégrants (cellules ayant intégré le transgène). Les agents de sélection peuvent modifier les cellules et leur comportement (722). *In vivo*, un gène de sélection peut aussi s'avérer immunogénique (723). L'efficacité du système d'intégration que j'ai développé atteint 0,5 % et se compare à d'autres employant les plasmides (361, 574, 583, 596, 663). Toutefois, l'efficacité d'intégration de l'intégrase est trop faible pour ne pas recourir à la sélection. Des mutants hyperactifs de l'intégrase sont maintenant disponibles permettant des niveaux impressionnant d'intégration atteignant jusqu'à 18,5 % dans les hépatocytes *in vivo* (597, 601). Toutefois, ces intégrases sont au maximum 2 fois plus actives que celle de type sauvage. Par conséquent, ce sont des évidences qui suggèrent que les mutations ne sont pas seules responsables de ces efficacités élevées rapportées précisément dans ces études (principalement dans (601)). Il se pourrait que les hépatocytes soient plus permissifs à l'intégration comparativement à d'autres types de cellules comme les myoblastes (voir **Table 1-I**). D'autres cellules au potentielle myogénique (voir la section 2.3), mais dont l'on ignore leur permissivité à l'intégration, seraient intéressantes à étudier.

La grande variation des efficacités d'intégration selon les types de cellules est mal comprise. Il est connu que l'intégrase du phage Φ C31 a un partenaire dans les cellules de mammifères, DAXX qui inhibe son activité. On ignore le niveau d'expression dans le muscle, mais DAXX interagit avec un court motif sur l'intégrase et inhibe sa capacité à lier l'ADN (588, 589, 724). Il a été démontré dans quelques lignées cellulaires que l'activité de l'intégrase corrélait avec le niveau d'expression de DAXX (589). La suppression de DAXX n'est pas vraiment envisageable, car la protéine joue un rôle important dans l'apoptose et la régulation de la transcription via des interactions avec un grand nombre de partenaires (725). Des expériences réalisées avec une intégrase chimère arborant un domaine de liaison à l'ADN en doigts de zinc montrent que ce domaine est remplaçable (726), donc il serait possible de supprimer l'effet de DAXX sur l'intégrase.

6.2 *Spécificité de la manipulation du génome*

L'intégration aléatoire d'un transgène est risquée si elle se produit près de proto-oncogènes (284). Le ciblage de l'intégration vers un nombre limité des sites réduirait les risques associés à l'activation de proto-oncogène (609). L'étude des sites permet de générer un patron d'intégration, dont la fréquence de chacun permettrait d'évaluer le risque d'un traitement génique. Il y a donc un besoin criant de développer des outils moléculaires capables de diriger l'intégration vers des sites précis plutôt qu'aléatoirement dans le génome. Les connaissances au niveau de l'intégrase du phage Φ C31 se limitent principalement aux expériences effectuées à l'aide de plasmides. Ces expériences ont montré que l'intégrase peut diriger l'intégration à l'intérieur d'un groupe restreint de sites sur le génome (576). D'après mes résultats, l'intégration de l'ADN du HD se produit dans les mêmes sites que les plasmides. C'est un avantage considérable, car les sites identifiés avec les plasmides sont transposables dans le contexte du HD. J'ai révélé la présence de points chauds dans le génome qui sont également partagés avec les plasmides. Puisque ces sites ressortent à fréquence élevée, l'intégration a une probabilité élevée de se produire à ces endroits. Si l'on traite des cellules ou un organisme de

cette façon, il est capital d'évaluer quels sont les dangers liés à ces événements d'intégration (qui sont les plus probables d'arriver). L'impact de l'intégration sur l'activation de l'environnement génomique immédiat a été évalué dans une seule étude. Dans une lignée multipotente de cordon ombilical, l'intégration a peu d'impact puisque moins de 5 % des événements d'intégration entraînent des changements mineurs d'expression des gènes à proximité du site intégré (585). Deux sites 19q13.31 et 7p14.1 ont été rapportés revenant à haute fréquence dans mon étude sur les cellules HeLa. Heureusement, l'intégration n'entraînait pas de changement d'expression des gènes à proximité. Cela suggère que l'intégration a peu de risque d'activer un proto-oncogène. Toutefois, il faudrait plus d'études du genre, car il existe plusieurs autres points chauds qui se retrouvent dans d'autres lignées cellulaires, mais dont on ignore l'impact d'intégration sur l'environnement génomique immédiat. De plus, l'impact de l'intégration pourrait également avoir des effets différents d'une lignée à l'autre même si l'intégration avait lieu au même site. Par conséquent, il serait important de conduire une étude similaire avec mon système dans les cellules musculaires.

Pour les myoblastes de souris, le site mpsL1 est ressorti dans mon étude de même que dans à peu près toutes les études chez la souris. Chez un modèle murin susceptible de développer des tumeurs, l'usage de l'intégrase (livré par plasmide dans la circulation systémique et non de façon intramusculaire) ne précipite pas leur développement. Ces résultats suggèrent que les sites choisis par l'intégrase n'active pas de proto-oncogène (609). Du côté des myoblastes humain, peu de sites ont été trouvés et aucun profil d'intégration n'a été dressé, mais tout de même un site fréquent (8p22) a été trouvé (361, 574). Il faudrait évidemment mieux connaître ce site d'intégration et évaluer son potentiel oncogénique.

Il n'est pas encore clair ce qui dirige l'intégrase vers certains sites plutôt que d'autres. Possiblement que l'homologie des sites *pseudo-attP* avec celui de type sauvage y joue un rôle. L'étude de mutants de l'intégrase a permis de trouver des candidats plus spécifiques pour certains sites (611, 726). Pour qu'il y ait liaison de l'intégrase, l'ADN doit être accessible. Le

degré d'ouverture de la chromatine influencerait le choix des sites par l'intégrase (592). En effet, l'observation des sites d'intégration révèle un biais modeste pour les unités de transcription des gènes et fort pour les régions denses en gènes (576). Le degré d'ouverture de la chromatine pourrait également expliquer des différences entre les patrons d'intégration retrouvés chez les différents types de cellules.

Dans la plupart des études sur l'intégrase (incluant mon étude), une sélection est appliquée pour enrichir les clones (ayant intégrés le transgène) afin de repêcher les sites d'intégration. La sélection pourrait biaiser le repêchage des sites d'intégration vers ceux les plus actifs transcriptionnellement. L'expression accrue du gène de résistance donne un avantage de viabilité à ces cellules et elles sont plus susceptibles d'être repêchées. En éliminant les sites, où l'expression est plus faible, des sites intéressants pourraient passer inaperçus. Par exemple, certains de ces sites pourraient fournir une répression suffisante pour éviter l'expression non spécifique de notre transgène. Ces sites pourraient réduire l'activité basale d'un promoteur tissu-spécifique, mais sans empêcher son activation dans le bon type cellulaire.

Les patrons de sites d'intégration obtenus *in vitro* (sous sélection) doivent être forcément différents de ceux obtenus *in vivo* puisque la sélection dans ce dernier cas est peu envisageable. La prédiction des sites d'intégration *in vivo* à partir d'essais *in vitro* n'est peut-être pas fiable due à l'absence de sélection. Des méthodes récentes permettent d'évaluer de façon non biaisée des centaines de sites d'intégration d'un seul coup. Des *pools* de cellules transduites, comportant des milliers d'événements d'intégration, constituent une banque d'ADN. La banque est criblée par PCR à l'aide d'une technique de PCR à partir d'amplification linéaire (nrLAM-PCR, *non-restrictive Linear Amplification Mediated PCR*) et combinée au séquençage haut débit (727).

6.3 *Génotoxicité liée à l'intégrase*

Les outils moléculaires doivent induire des brisures dans l'ADN pour permettre l'insertion d'un transgène dans le génome. Souvent dans le cas d'un échec d'insertion, ils laissent des lésions sur l'ADN qui doivent être réparées. La cellule utilise deux mécanismes principaux pour colmater une brèche dans l'ADN : un mécanisme fidèle par recombinaison homologue ou une façon grossière, par la NHEJ (*non-homologous end joining*). Cette dernière altère le génome en causant des mutations pouvant être transmises aux générations cellulaires suivantes. Lorsque l'intégrase, procède à la recombinaison, elle doit couper 4 brins d'ADN (2 pour l'*attB* et le *pseudo-attP*) (581) générant ainsi 2 brisures double-brin. La phosphorylation de l'histone H2AX (γ H2AX) suite à l'expression de l'intégrase confirme que des brisures double-brin se sont formées (613).

Nous avons observé que l'expression de l'intégrase augmentait de 2 à 3 fois le nombre de brisures double-brin par cellule dans les myoblastes C2C12. Ce nombre était largement inférieur à celui induit par les UV-C (~254 nm) à la dose de 10 J/m² (plus de 24 brisures double-brin par cellule), la plus faible dose employée dans nos tests. Toutefois, plusieurs évidences indiquent que les UV-C ne causent pas directement des brisures double-brin. Les rayons UV-C sont directement absorbés par les bases de l'ADN conduisant à la formation de dimères de thymine. La réparation par l'excision des nucléotides génère des brisures simple-brin. Si elles ne sont pas réparées, leur conversion en brisure double-brin se produit durant la phase S par une topoisomérase (pour revue, (728, 729, 730)). Des brisures à l'ADN sont également produits par des espèces réactives en provenance des cellules elles-mêmes ou via la communication cellulaire en réponse à un stress aux UV-C (731, 732). Dans le cas de l'intégrase, il est probable qu'un événement d'intégration qui a échoué génère aussi des brisures simple-brin. Par conséquent, il faut tenir compte de la possibilité que les brisures double-brin à l'ADN peuvent être issues d'un phénomène indirecte. Toutefois, le marquage de γ H2AX est utile, car il constitue une mesure globale des dommages à l'ADN et permet

d'évaluer la génotoxicité de l'intégrase. Le peu de dommages causés par l'activité de l'intégrase à l'ADN pourrait être expliquée par sa faible activité dans les myoblastes. L'efficacité d'intégration dans les myoblastes était environ 5 fois plus faible que dans les HeLa.

6.4 *Caractérisation de l'intégration in vivo (perspectives)*

Pour déterminer l'efficacité d'intégration et la faisabilité d'un traitement *in vivo*, les deux HD (encodant l'intégrase et celui intégratif) pourront être étudiés chez la souris *mdx*. Après l'injection dans le muscle, il est possible que des cellules satellites, les acteurs principaux de la réparation musculaire, soient transduites par les HD. Les CS, stimulées à se diviser, deviennent des myoblastes qui peuvent être isolés et amplifiés *in vitro*. Puisque notre HD contient un marqueur de sélection, il serait possible de sélectionner les cellules ayant intégrées le transgène. L'efficacité d'intégration et les sites d'intégration pourraient être déterminés (voir les sections de **3.3.6** et **3.3.8**). En isolant des myoblastes à différents temps ou en analysant l'expression du transgène dans le muscle, on évaluerait la persistance du HD intégré. Notre HD possède également le gène rapporteur de la GFP, donc il serait possible de suivre l'expression à long terme dans le muscle.

6.5 *Activité du promoteur Δ USEx3 selon le contexte du vecteur*

L'une des stratégies pour contourner la réponse immunitaire est l'utilisation d'un promoteur musculospécifique, ce qui permet de restreindre l'expression du transgène aux cellules musculaires. La réponse immunitaire peut diminuer l'expression d'un transgène et réduire son effet thérapeutique (671). Une batterie de promoteurs musculospécifiques (comparables en puissance au CMV) ont été développés et testés dans plusieurs vecteurs viraux pour la thérapie génique (voir la section **1.8.2**). Nous avons développé le promoteur Δ USEx3 (623), dont

l'activité a été caractérisée *in vitro* et *in vivo* à l'aide des plasmides. Dans mon étude sur Δ USEx3, j'ai approfondi nos connaissances sur ce promoteur en étudiant sa spécificité, sa force et sa stabilité et ce, lorsqu'employé dans deux vecteurs viraux (HD et LV). Cette étude est particulièrement intéressante, car ces deux vecteurs sont très différents. L'une des différences fondamentales est dans l'organisation de leur génome, l'ADN du HD reste majoritairement épisomique, alors que le proADN du LV s'intègre. Les connaissances acquises sur Δ USEx3 seront utiles, car éventuellement, le promoteur pourrait être employé dans un HD intégratif pour rétablir l'expression de la dystrophine dans les muscles dystrophiques. De plus, l'intégration de Δ USEx3 à partir du LV a fourni des informations sur son comportement dans les chromosomes.

La spécificité de Δ USEx3 a été évaluée dans un panel de cellules non musculaires. Les résultats montrent que le promoteur est maintenu inactif et que son activité basale est très faible dans ces cellules. L'activité de Δ USEx3, étant similaire pour le HD et le LV, il semble que le choix du vecteur a peu d'effet. Le promoteur est également peu actif dans plusieurs tissus (foie, poumons et rate) après l'injection systémique du HD. Il est intéressant de constater que l'expression dans la rate est faible, un organe lymphoïde secondaire, suggérant que Δ USEx3 pourrait être peu actif dans ces cellules immunitaires. Évidemment, des études plus raffinées devront déterminer si Δ USEx3 est actif spécifiquement dans les cellules professionnelles présentatrices d'antigènes, susceptibles de déclencher une réponse immunitaire dirigée contre le transgène. Il serait relativement aisé de déterminer le niveau d'activité de Δ USEx3 ou bien SP Δ c5-12 dans les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques peuvent être isolées de plusieurs organes lymphoïdes, du sang ou ailleurs à l'aide de troupes disponibles commercialement. L'activité du promoteur pourrait alors être évaluée à partir du gène rapporteur qu'il régule.

Dans les cellules musculaires non différenciées, l'activité de Δ USEx3 est très faible avec le HD et environ le tiers de l'activité du CMV et du promoteur musculospécifique SP Δ c5-12,

dans le cas du LV. La capacité du promoteur à maintenir une activité basale basse dans les myoblastes avant leur différenciation est certainement un avantage, car l'expression trop précoce de la dystrophine peut être toxique pour les myoblastes (361). Après la différenciation des myoblastes en myotubes, l'activité relative du promoteur augmente de plusieurs fois par rapport à un promoteur ubiquitaire. Cette activation est requise pour employer le promoteur dans le muscle.

La stabilité du promoteur Δ USEx3 a également été investiguée dans les myoblastes et dans les myotubes à l'aide du LV. Nous avons démontré que Δ USEx3 était plus stable que le promoteur CMV pendant 2 mois dans les myoblastes et après leur différenciation. Ce dernier est connu pour subir des effets du *silencing* (693, 733, 734). Il a été démontré que les cytosines des CpG pouvaient être méthylées sur l'*enhancer* du CMV. La méthylation de l'ADN est généralement associée à la répression génique (735). La composition en CpG du promoteur Δ USEx3 (16 CpG, sans l'intron de SV40), étant plus faible que le CMV (33 CpG), pourrait expliquer sa plus grande stabilité. L'étude de la stabilité de Δ USEx3 a été réalisée en dehors de l'environnement musculaire et en absence de système immunitaire. Des essais *in vivo* permettront de déterminer si le promoteur permet l'expression stable d'un transgène.

L'efficacité de livraison du transgène est cruciale pour arriver à traiter tout un muscle *in vivo*. Des doses de $3,5$ et $4,6 \times 10^8$ particules infectieuses de HD ont été injectées dans le *tibialis anterior* (TA) de souris *mdx*. Une seule injection a permis l'expression du transgène dans jusqu'à 28 % du muscle traité par le HD- Δ USEx3, comparativement à environ 40 % pour le HD-CAG. Ces niveaux de transduction sont comparables à ce qui a déjà été obtenu avec un HD double cassette, dont l'effet thérapeutique était notable (467, 468). Dans des extraits de muscles, l'expression du gène rapporteur sous le contrôle de Δ USEx3 atteignait jusqu'à 20 % de la puissance du promoteur CAG. Il reste à déterminer si l'expression de la dystrophine à un tel niveau a un effet thérapeutique.

Pour déterminer l'efficacité du promoteur dans le LV, des doses élevées de LV (environ 2×10^7 particules infectieuses) ont été injectées dans le TA de la souris *mdx*. L'observation de plusieurs tranches du muscle au microscope a permis de détecter l'expression un peu diffuse du gène rapporteur. L'expression fut confirmée par buvardage *Western*. Pour comparer l'activité de Δ USEx3 à un autre promoteur musculospécifique, un autre LV a été injecté transportant une version écourtée du promoteur SPc5-12 (appelé SP Δ c5-12) (624). L'activité musculaire de SP Δ c5-12 était 5 fois supérieure par buvardage *Western*, malgré un nombre comparable de copies de vecteurs livrés dans le muscle. Dans les sections de muscles visualisées par fluorescence, l'expression de la GFP était évidente et l'un des muscles avait près de la moitié de ces fibres transduites. La forte activité de SP Δ c5-12 était inattendue puisque celle-ci était comparable à Δ USEx3 *in vitro*. Mes résultats indiquent que des différences importantes existent entre la culture cellulaire et les muscles *in vivo* lorsqu'on étudie l'activité d'un promoteur musculospécifique. Étant donné que le promoteur SP Δ c5-12 est très puissant *in vivo*, il faudrait également le tester dans un HD, car il sera peut-être meilleur que le Δ USEx3.

6.6 Vers une thérapie génique pour la dystrophie musculaire de Duchenne

La stabilisation de l'ADN du HD et l'expression musculospécifique du transgène pourraient freiner l'élimination du vecteur rencontrée dans les muscles des souris *mdx* suite à l'injection (467). Nous avons déjà entamé la construction d'un HD, dont Δ USEx3 régule l'expression de la dystrophine murine. Ce HD contient un site *attB* reconnu par l'intégrase et nécessaire à l'intégration. Pour traiter les muscles, le HD pourrait soit être injecté directement *in vivo*, soit être employé pour traiter des cellules myogéniques *ex vivo*. Pour la deuxième méthode, il faudrait d'abord établir les meilleures conditions d'intégration pour les myoblastes primaires ou autres cellules myogéniques. Par la suite, il suffirait d'utiliser ces conditions et de greffer les cellules traitées chez des souris *mdx*. L'expression de la dystrophine dans les fibres serait évaluée par immunomarquage (ainsi que ses partenaires) et quantifiée par buvardage de type

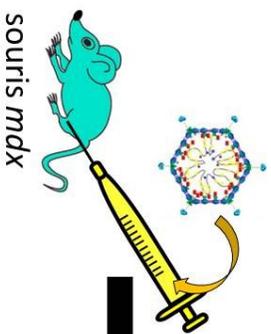
Western. Évidemment, ces essais seraient menés à long terme pour apprécier le bénéfice de l'intégration du HD et du promoteur muscle spécifique sur la stabilité d'expression. Les paramètres physiologiques (force et endurance) et histologiques (infiltration monocytes, résistance aux dommages et noyaux centraux) seront également surveillés à long terme. Pour la deuxième approche, les mêmes évaluations seraient réalisées dans le muscle suite à l'injection du HD et ce, dans le but de déterminer le potentiel de la thérapie génique. Puisque les souris *mdx* adultes sont immunocompétentes, on pourrait déterminer si le traitement induit une réponse immunitaire. Deux composantes de la réponse immunitaire seraient évaluées: la présence d'anticorps dans le sérum contre la dystrophine et la réponse cytotoxique (présence de monocytes dans les muscles).

La déficience en dystrophine peut être étudiée chez le *golden retriever*, un modèle plus fidèle de la DMD que la souris *mdx*. Chez le chien dystrophique et le patient humain, les muscles, incluant le coeur, les muscles squelettiques des membres et le diaphragme présentent tous des signes sévères de la pathologie (110). Le chien dystrophique présente aussi des problèmes ambulateurs majeurs tout comme les humains. Il faudrait d'abord s'assurer que le traitement, à partir du HD soit sécuritaire (et chez le macaque) et efficace chez le chien (en effectuant les mêmes tests que chez la souris *mdx*) avant de mener des essais cliniques chez l'homme.

Chez la souris *mdx*, les effets sévères de la déficience apparaissent durant la vieillesse à l'exception pour le diaphragme (736), même si la régénération est encore active chez l'adulte (109) (section 1.2.6.1 et pour revue, (108)). La dégénérescence plus lente et la régénération efficace sont deux facteurs qui peuvent améliorer les effets d'un traitement et allonger la période à laquelle les souris peuvent récupérer. Il a été démontré chez les souris de tous les groupes d'âge que la thérapie génique pouvait avoir des effets bénéfiques (194, 468, 675, 737). Chez l'humain et le chien, le moment du traitement pourrait s'avérer crucial pour espérer mitiger la pathologie. Un traitement précoce serait avantageux à cause de la présence de tissus musculaires sains et de cellules satellites. Si les patients sont traités jeunes, développer un HD

capable d'exprimer la dystrophine pendant toute la vie du patient serait très utile. Les cellules satellites sont une cible intéressante pour un HD qui aurait la capacité de s'intégrer. Suite à la division cellulaire, l'ADN du HD serait conservé. L'expression de la dystrophine pourrait être régulée par un promoteur musculospécifique pour contourner la réponse immunitaire et le *silencing* du promoteur. L'expression précoce de la dystrophine pourrait également favoriser une sélection des fibres positives à la dystrophine et empêcher la dégénérescence musculaire (103).

La *Figure 6-1* résume mon projet dans son ensemble. D'abord les évidences qui m'ont permis de proposer certaines solutions (hypothèses) pour stabiliser l'expression de la dystrophine dans les muscles. Les progrès scientifiques (ou objectifs atteints) accomplis dans la thèse sont présentés ainsi que plusieurs perspectives.



- Evidences observées**
- Expression efficace de la dystrophine complète
 - Améliore l'histologie et la physiologie (effet thérapeutique)
 - Transduction de la moitié du muscle en une seule injection
- Éléments susceptibles à être améliorés**
- Perte progressive de l'ADN du vecteur
 - Instabilité de l'expression musculaire de la dystrophine après 6 mois
 - Réponse immunitaire contre le transgène

Solutions examinées pour améliorer la thérapie génique

- Intégration de l'ADN du HD
- Régulation de l'expression du transgène par un promoteur musculospécifique

Progrès scientifiques accomplis dans la thèse

Développement d'un système permettant d'intégrer l'ADN du HD avec l'intégrase du phage ϕ C31 (*in vitro*)

- Capacité à modifier génétiquement des myoblastes de souris et de cellules humaines
- Intégration site-spécifique de l'ADN du HD et faible génotoxicité
- Capacité d'intégrer des fragments d'ADN assez longs pour l'intégration de l'ADNc de la dystrophine complète
- Efficacité d'intégration comparable aux autres outils moléculaires

Mise au point du promoteur Δ USEX3 pour l'expression d'un transgène dans le muscle à partir de vecteurs viraux

- Activité puissante, robuste et musculospécifique via le HD (*in vitro* et *in vivo*) et via un LV (*in vitro* seulement)
- Résistant au *silencing* après l'intégration du LV (*in vitro*)

Perspectives (chez la souris *mdx*)

- Caractériser le potentiel du HD intégratif pour la thérapie génique (injection intramusculaire ou thérapie cellulaire)
- Évaluer les effets thérapeutiques à long terme (histologie et physiologie) de l'expression musculospécifique de la dystrophine complète
- Évaluer les effets du promoteur musculospécifique sur la réponse immunitaire et la stabilité de l'expression de la dystrophine complète

Figure 6-1. Optimisation du vecteur adénoviral pour la thérapie génique de la DMD

6.7 Conclusion

Pour terminer cette étude scientifique, je peux affirmer que mes travaux de doctorat ont fait progresser nos connaissances dans le domaine de la thérapie génique. J'ai développé un vecteur HD ayant la nouvelle capacité de s'intégrer via l'expression de l'intégrase du bactériophage Φ C31. L'intégration est spécifique, relativement efficace et plusieurs évidences suggèrent qu'elle est sécuritaire. Ce nouveau vecteur offre une alternative intéressante pour les systèmes déjà en place visant à faire de la thérapie cellulaire. La caractérisation *in vitro* de l'intégration que j'ai faite a permis de jeter les bases solides pour entamer de futurs essais précliniques de thérapie génique pour la DMD. Quant à l'étude sur l'activité du promoteur Δ USEx3, j'ai montré que le promoteur conservait sa puissance et sa spécificité lorsque transporté par deux vecteurs viraux différents (LV et HD), sauf dans le cas du LV *in vivo*. Présentement, on ignore pourquoi Δ USEx3 est aussi faible après l'injection du LV dans le muscle lorsqu'on le compare avec un autre promoteur musculospécifique SP Δ c5-12 (pourtant aussi puissant que Δ USEx3 *in vitro*). Étant donné que SP Δ c5-12 est aussi puissant *in vivo*, il faudrait également le tester dans le HD. La stabilisation de l'ADN du HD par son intégration dans le génome et l'utilisation d'un promoteur musculospécifique sont deux stratégies faciles à combiner et très prometteuses pour prolonger l'expression dans les muscles. Dans le laboratoire, nous avons développé un HD intégratif transportant la dystrophine de souris, dont l'expression est sous le contrôle du promoteur Δ USEx3. La suite du projet serait d'évaluer l'efficacité et le bénéfice d'un tel vecteur chez la souris *mdx in vivo*.

6.8 *Références*

1. Tortora, G. J., & Grabowski, S. R. (1994). *Principes d'anatomie et de physiologie*. (Nouv. éd. éd.). Centre éducatif et culturel. Anjou, Québec.
2. Mendell, J. R., Rodino-Klapac, L. R., Rosales, X. Q., Coley, B. D., Galloway, G., Lewis, S., ... Clark, K. R. (2010). Sustained alpha-sarcoglycan gene expression after gene transfer in limb-girdle muscular dystrophy, type 2D. *Ann Neurol*, *68*(5), 629-638.doi:10.1002/ana.22251
3. Maguire, A. M., Simonelli, F., Pierce, E. A., Pugh, E. N., Jr., Mingozzi, F., Bennicelli, J., ... Bennett, J. (2008). Safety and efficacy of gene transfer for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, *358*(21), 2240-2248.doi:10.1056/NEJMoa0802315
4. Simonelli, F., Maguire, A. M., Testa, F., Pierce, E. A., Mingozzi, F., Bennicelli, J. L., ... Auricchio, A. (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther*, *18*(3), 643-650.doi:10.1038/mt.2009.277
5. Bainbridge, J. W., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., ... Ali, R. R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, *358*(21), 2231-2239.doi:10.1056/NEJMoa0802268
6. Cideciyan, A. V., Hauswirth, W. W., Aleman, T. S., Kaushal, S., Schwartz, S. B., Boye, S. L., ... Jacobson, S. G. (2009). Vision 1 year after gene therapy for Leber's congenital amaurosis. *N Engl J Med*, *361*(7), 725-727.doi:10.1056/NEJMc0903652
7. Fischer, A., Hacein-Bey-Abina, S., & Cavazzana-Calvo, M. (2011). Gene therapy for primary adaptive immune deficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, *127*(6), 1356-1359.doi:10.1016/j.jaci.2011.04.030
8. Ferrua, F., Brigida, I., & Aiuti, A. (2010). Update on gene therapy for adenosine deaminase-deficient severe combined immunodeficiency. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, *10*(6), 551-556.doi:10.1097/ACI.0b013e32833fea85

9. Cartier, N., & Aubourg, P. (2010). Hematopoietic stem cell transplantation and hematopoietic stem cell gene therapy in X-linked adrenoleukodystrophy. *Brain Pathol*, 20(4), 857-862.doi:10.1111/j.1750-3639.2010.00394.x
10. LeWitt, P. A., Rezai, A. R., Leehey, M. A., Ojemann, S. G., Flaherty, A. W., Eskandar, E. N., ... Feigin, A. (2011). AAV2-GAD gene therapy for advanced Parkinson's disease: a double-blind, sham-surgery controlled, randomised trial. *Lancet Neurol*, 10(4), 309-319.doi:10.1016/S1474-4422(11)70039-4
11. Goemans, N. M., Tulinius, M., van den Akker, J. T., Burm, B. E., Ekhart, P. F., Heuvelmans, N., ... van Deutekom, J. C. (2011). Systemic administration of PRO051 in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 364(16), 1513-1522.doi:10.1056/NEJMoa1011367
12. Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., ... Muntoni, F. (2011). Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet*, 378(9791), 595-605.doi:10.1016/S0140-6736(11)60756-3
13. Mendell, J. R., Campbell, K., Rodino-Klapac, L., Sahenk, Z., Shilling, C., Lewis, S., ... Walker, C. M. (2010). Dystrophin immunity in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 363(15), 1429-1437.doi:10.1056/NEJMoa1000228
14. Bowles, D. E., McPhee, S. W., Li, C., Gray, S. J., Samulski, J. J., Camp, A. S., ... Samulski, R. J. (2012). Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. *Mol Ther*, 20(2), 443-455.doi:10.1038/mt.2011.237
15. Borel, J.-P. (1997). *Biochimie dynamique*. (2e éd.). DeBoeck Université. Bruxelles.
16. Ervasti, J. M., & Campbell, K. P. (1993). A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, 122(4), 809-823
17. Nishikawa, K. C., Monroy, J. A., Uyeno, T. E., Yeo, S. H., Pai, D. K., & Lindstedt, S. L. (2012). Is titin a 'winding filament'? A new twist on muscle contraction. *Proc Biol Sci*, 279(1730), 981-990.doi:10.1098/rspb.2011.1304

18. Labeit, S., Ottenheijm, C. A., & Granzier, H. (2011). Nebulin, a major player in muscle health and disease. *FASEB J*, 25(3), 822-829.doi:10.1096/fj.10-157412
19. Harridge, S. D. (2007). Plasticity of human skeletal muscle: gene expression to in vivo function. *Exp Physiol*, 92(5), 783-797.doi:10.1113/expphysiol.2006.036525
20. Ordway, G. A., & Garry, D. J. (2004). Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol*, 207(Pt 20), 3441-3446.doi:10.1242/jeb.01172
21. Westerblad, H., Bruton, J. D., & Katz, A. (2010). Skeletal muscle: energy metabolism, fiber types, fatigue and adaptability. *Exp Cell Res*, 316(18), 3093-3099.doi:10.1016/j.yexcr.2010.05.019
22. Biral, D., Jakubiec-Puka, A., Ciechomska, I., Sandri, M., Rossini, K., Carraro, U., & Betto, R. (2000). Loss of dystrophin and some dystrophin-associated proteins with concomitant signs of apoptosis in rat leg muscle overworked in extension. *Acta Neuropathol*, 100(6), 618-626
23. Belcastro, A. N. (1993). Skeletal muscle calcium-activated neutral protease (calpain) with exercise. *J Appl Physiol*, 74(3), 1381-1386
24. Belcastro, A. N., Arthur, G. D., Albisser, T. A., & Raj, D. A. (1996). Heart, liver, and skeletal muscle myeloperoxidase activity during exercise. *J Appl Physiol*, 80(4), 1331-1335
25. Tidball, J. G. (2005). Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 288(2), R345-353.doi:10.1152/ajpregu.00454.2004
26. Paulsen, G., Egner, I. M., Drange, M., Langberg, H., Benestad, H. B., Fjeld, J. G., ... Raastad, T. (2010). A COX-2 inhibitor reduces muscle soreness, but does not influence recovery and adaptation after eccentric exercise. *Scand J Med Sci Sports*, 20(1), e195-207.doi:10.1111/j.1600-0838.2009.00947.x
27. Nguyen, H. X., & Tidball, J. G. (2003). Interactions between neutrophils and macrophages promote macrophage killing of rat muscle cells in vitro. *J Physiol*, 547(Pt 1), 125-132.doi:10.1113/jphysiol.2002.031450
28. Cannon, J. G., & St Pierre, B. A. (1998). Cytokines in exertion-induced skeletal muscle injury. *Mol Cell Biochem*, 179(1-2), 159-167

29. Philippou, A., Bogdanis, G., Maridaki, M., Halapas, A., Sourla, A., & Koutsilieris, M. (2009). Systemic cytokine response following exercise-induced muscle damage in humans. *Clin Chem Lab Med*, 47(6), 777-782.doi:10.1515/CCLM.2009.163
30. Tidball, J. G., & Wehling-Henricks, M. (2007). Macrophages promote muscle membrane repair and muscle fibre growth and regeneration during modified muscle loading in mice in vivo. *J Physiol*, 578(Pt 1), 327-336.doi:10.1113/jphysiol.2006.118265
31. Lu, H., Huang, D., Saederup, N., Charo, I. F., Ransohoff, R. M., & Zhou, L. (2011). Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury. *FASEB J*, 25(1), 358-369.doi:10.1096/fj.10-171579
32. Mauro, A. (1961). Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9, 493-495
33. Daughters, R. S., Chen, Y., & Slack, J. M. (2011). Origin of muscle satellite cells in the *Xenopus* embryo. *Development*, 138(5), 821-830.doi:10.1242/dev.056481
34. Schienda, J., Engleka, K. A., Jun, S., Hansen, M. S., Epstein, J. A., Tabin, C. J., ... Kardon, G. (2006). Somitic origin of limb muscle satellite and side population cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(4), 945-950.doi:10.1073/pnas.0510164103
35. Biressi, S., & Rando, T. A. (2010). Heterogeneity in the muscle satellite cell population. *Semin Cell Dev Biol*, 21(8), 845-854.doi:10.1016/j.semcdb.2010.09.003
36. Du, S. J., Devoto, S. H., Westerfield, M., & Moon, R. T. (1997). Positive and negative regulation of muscle cell identity by members of the hedgehog and TGF-beta gene families. *J Cell Biol*, 139(1), 145-156
37. Bryson-Richardson, R. J., & Currie, P. D. (2008). The genetics of vertebrate myogenesis. *Nat Rev Genet*, 9(8), 632-646.doi:10.1038/nrg2369
38. Boldrin, L., Muntoni, F., & Morgan, J. E. (2010). Are human and mouse satellite cells really the same? *J Histochem Cytochem*, 58(11), 941-955.doi:10.1369/jhc.2010.956201
39. Allen, R. E., Sheehan, S. M., Taylor, R. G., Kendall, T. L., & Rice, G. M. (1995). Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J Cell Physiol*, 165(2), 307-312.doi:10.1002/jcp.1041650211

40. Le Grand, F., Jones, A. E., Seale, V., Scime, A., & Rudnicki, M. A. (2009). Wnt7a activates the planar cell polarity pathway to drive the symmetric expansion of satellite stem cells. *Cell Stem Cell*, 4(6), 535-547.doi:10.1016/j.stem.2009.03.013
41. Conboy, I. M., Conboy, M. J., Wagers, A. J., Girma, E. R., Weissman, I. L., & Rando, T. A. (2005). Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature*, 433(7027), 760-764.doi:10.1038/nature03260
42. Hill, M., Wernig, A., & Goldspink, G. (2003). Muscle satellite (stem) cell activation during local tissue injury and repair. *J Anat*, 203(1), 89-99
43. DiMario, J., Buffinger, N., Yamada, S., & Strohman, R. C. (1989). Fibroblast growth factor in the extracellular matrix of dystrophic (mdx) mouse muscle. *Science*, 244(4905), 688-690
44. DiMario, J., & Strohman, R. C. (1988). Satellite cells from dystrophic (mdx) mouse muscle are stimulated by fibroblast growth factor in vitro. *Differentiation*, 39(1), 42-49
45. Leiter, J. R., Peeler, J., & Anderson, J. E. (2011). Exercise-induced muscle growth is muscle-specific and age-dependent. *Muscle Nerve*, 43(6), 828-838.doi:10.1002/mus.21965
46. Brack, A. S., Conboy, M. J., Roy, S., Lee, M., Kuo, C. J., Keller, C., & Rando, T. A. (2007). Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*, 317(5839), 807-810.doi:10.1126/science.1144090
47. Kuang, S., Charge, S. B., Seale, P., Huh, M., & Rudnicki, M. A. (2006). Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. *J Cell Biol*, 172(1), 103-113.doi:10.1083/jcb.200508001
48. Seale, P., Sabourin, L. A., Girgis-Gabardo, A., Mansouri, A., Gruss, P., & Rudnicki, M. A. (2000). Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, 102(6), 777-786
49. Le Grand, F., & Rudnicki, M. A. (2007). Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 19(6), 628-633.doi:10.1016/j.ceb.2007.09.012
50. Relaix, F., & Marcelle, C. (2009). Muscle stem cells. *Curr Opin Cell Biol*, 21(6), 748-753.doi:10.1016/j.ceb.2009.10.002

51. Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., & Kunkel, L. M. (1987). Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, *51*(6), 919-928
52. Kunkel, L. M. (2005). 2004 William Allan Award address. Cloning of the DMD gene. *Am J Hum Genet*, *76*(2), 205-214
53. Tennyson, C. N., Klamut, H. J., & Worton, R. G. (1995). The human dystrophin gene requires 16 hours to be transcribed and is cotranscriptionally spliced. *Nat Genet*, *9*(2), 184-190.doi:10.1038/ng0295-184
54. Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., & Kunkel, L. M. (1987). Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, *50*(3), 509-517
55. Greener, M. J., Sewry, C. A., Muntoni, F., & Roberts, R. G. (2002). The 3'-untranslated region of the dystrophin gene - conservation and consequences of loss. *Eur J Hum Genet*, *10*(7), 413-420.doi:10.1038/sj.ejhg.5200822
56. Koenig, M., Monaco, A. P., & Kunkel, L. M. (1988). The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, *53*(2), 219-228
57. Feener, C. A., Koenig, M., & Kunkel, L. M. (1989). Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*, *338*(6215), 509-511.doi:10.1038/338509a0
58. Sadoulet-Puccio, H. M., & Kunkel, L. M. (1996). Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol*, *6*(1), 25-35
59. Blake, D. J., Weir, A., Newey, S. E., & Davies, K. E. (2002). Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. *Physiol Rev*, *82*(2), 291-329.doi:10.1152/physrev.00028.2001
60. Ervasti, J. M. (2007). Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta*, *1772*(2), 108-117.doi:10.1016/j.bbadis.2006.05.010
61. Tinsley, J., Deconinck, N., Fisher, R., Kahn, D., Phelps, S., Gillis, J. M., & Davies, K. (1998). Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. *Nat Med*, *4*(12), 1441-1444.doi:10.1038/4033

62. Emery, A. E. (1991). Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord*, 1(1), 19-29
63. Caskey, C. T., Nussbaum, R. L., Cohan, L. C., & Pollack, L. (1980). Sporadic occurrence of Duchenne muscular dystrophy: evidence for new mutation. *Clin Genet*, 18(5), 329-341
64. Grimm, T., Meng, G., Liechti-Gallati, S., Bettecken, T., Muller, C. R., & Muller, B. (1994). On the origin of deletions and point mutations in Duchenne muscular dystrophy: most deletions arise in oogenesis and most point mutations result from events in spermatogenesis. *J Med Genet*, 31(3), 183-186
65. Flanigan, K. M., Dunn, D. M., von Niederhausern, A., Soltanzadeh, P., Gappmaier, E., Howard, M. T., ... Weiss, R. B. (2009). Mutational spectrum of DMD mutations in dystrophinopathy patients: application of modern diagnostic techniques to a large cohort. *Hum Mutat*, 30(12), 1657-1666.doi:10.1002/humu.21114
66. Rando, T. A. (2007). Non-viral gene therapy for Duchenne muscular dystrophy: progress and challenges. *Biochim Biophys Acta*, 1772(2), 263-271.doi:10.1016/j.bbadis.2006.07.009
67. Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Karpati, G., Burghes, A. H., Belfall, B., Klamut, H. J., ... Worton, R. G. (1988). The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature*, 333(6172), 466-469.doi:10.1038/333466a0
68. Norwood, F. L., Sutherland-Smith, A. J., Keep, N. H., & Kendrick-Jones, J. (2000). The structure of the N-terminal actin-binding domain of human dystrophin and how mutations in this domain may cause Duchenne or Becker muscular dystrophy. *Structure*, 8(5), 481-491
69. Renley, B. A., Rybakova, I. N., Amann, K. J., & Ervasti, J. M. (1998). Dystrophin binding to nonmuscle actin. *Cell Motil Cytoskeleton*, 41(3), 264-270.doi:10.1002/(SICI)1097-0169(1998)41:3<264::AID-CM7>3.0.CO;2-Z
70. Lloyd, C. M., Berendse, M., Lloyd, D. G., Schevzov, G., & Grounds, M. D. (2004). A novel role for non-muscle gamma-actin in skeletal muscle sarcomere assembly. *Exp Cell Res*, 297(1), 82-96.doi:10.1016/j.yexcr.2004.02.012

71. Nakata, T., Nishina, Y., & Yorifuji, H. (2001). Cytoplasmic gamma actin as a Z-disc protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 286(1), 156-163.doi:10.1006/bbrc.2001.5353
72. Rybakova, I. N., Amann, K. J., & Ervasti, J. M. (1996). A new model for the interaction of dystrophin with F-actin. *J Cell Biol*, 135(3), 661-672
73. Koenig, M., & Kunkel, L. M. (1990). Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*, 265(8), 4560-4566
74. Bork, P., & Sudol, M. (1994). The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci*, 19(12), 531-533
75. Huang, X., Poy, F., Zhang, R., Joachimiak, A., Sudol, M., & Eck, M. J. (2000). Structure of a WW domain containing fragment of dystrophin in complex with beta-dystroglycan. *Nat Struct Biol*, 7(8), 634-638.doi:10.1038/77923
76. Ponting, C. P., Blake, D. J., Davies, K. E., Kendrick-Jones, J., & Winder, S. J. (1996). ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci*, 21(1), 11-13
77. Ishikawa-Sakurai, M., Yoshida, M., Imamura, M., Davies, K. E., & Ozawa, E. (2004). ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan. *Hum Mol Genet*, 13(7), 693-702.doi:10.1093/hmg/ddh087
78. Chung, W., & Campanelli, J. T. (1999). WW and EF hand domains of dystrophin-family proteins mediate dystroglycan binding. *Mol Cell Biol Res Commun*, 2(3), 162-171.doi:10.1006/mcbr.1999.0168
79. Hnia, K., Zouiten, D., Cantel, S., Chazalette, D., Hugon, G., Fehrentz, J. A., ... Winder, S. J. (2007). ZZ domain of dystrophin and utrophin: topology and mapping of a beta-dystroglycan interaction site. *Biochem J*, 401(3), 667-677.doi:10.1042/BJ20061051
80. Cote, P. D., Moukhles, H., Lindenbaum, M., & Carbonetto, S. (1999). Chimaeric mice deficient in dystroglycans develop muscular dystrophy and have disrupted myoneural synapses. *Nat Genet*, 23(3), 338-342.doi:10.1038/15519
81. Nakamori, M., & Takahashi, M. P. (2011). The role of alpha-dystrobrevin in striated muscle. *Int J Mol Sci*, 12(3), 1660-1671.doi:10.3390/ijms12031660

82. Yang, B., Jung, D., Rafael, J. A., Chamberlain, J. S., & Campbell, K. P. (1995). Identification of alpha-syntrophin binding to syntrophin triplet, dystrophin, and utrophin. *J Biol Chem*, 270(10), 4975-4978
83. Peters, M. F., Adams, M. E., & Froehner, S. C. (1997). Differential association of syntrophin pairs with the dystrophin complex. *J Cell Biol*, 138(1), 81-93
84. Sutherland-Smith, A. J., Moores, C. A., Norwood, F. L., Hatch, V., Craig, R., Kendrick-Jones, J., & Lehman, W. (2003). An atomic model for actin binding by the CH domains and spectrin-repeat modules of utrophin and dystrophin. *J Mol Biol*, 329(1), 15-33
85. Petrof, B. J., Shrager, J. B., Stedman, H. H., Kelly, A. M., & Sweeney, H. L. (1993). Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(8), 3710-3714
86. Ibraghimov-Beskrovnaya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., & Campbell, K. P. (1992). Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355(6362), 696-702. doi:10.1038/355696a0
87. Gee, S. H., Blacher, R. W., Douville, P. J., Provost, P. R., Yurchenco, P. D., & Carbonetto, S. (1993). Laminin-binding protein 120 from brain is closely related to the dystrophin-associated glycoprotein, dystroglycan, and binds with high affinity to the major heparin binding domain of laminin. *J Biol Chem*, 268(20), 14972-14980
88. Talts, J. F., & Timpl, R. (1999). Mutation of a basic sequence in the laminin alpha2LG3 module leads to a lack of proteolytic processing and has different effects on beta1 integrin-mediated cell adhesion and alpha-dystroglycan binding. *FEBS Lett*, 458(3), 319-323
89. Campanelli, J. T., Roberds, S. L., Campbell, K. P., & Scheller, R. H. (1994). A role for dystrophin-associated glycoproteins and utrophin in agrin-induced AChR clustering. *Cell*, 77(5), 663-674
90. Kameya, S., Miyagoe, Y., Nonaka, I., Ikemoto, T., Endo, M., Hanaoka, K., ... Takeda, S. (1999). alpha1-syntrophin gene disruption results in the absence of neuronal-type

- nitric-oxide synthase at the sarcolemma but does not induce muscle degeneration. *J Biol Chem*, 274(4), 2193-2200
91. Bhatnagar, S., & Kumar, A. (2010). Therapeutic targeting of signaling pathways in muscular dystrophy. *J Mol Med (Berl)*, 88(2), 155-166.doi:10.1007/s00109-009-0550-4
 92. Dalkilic, I., & Kunkel, L. M. (2003). Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 13(3), 231-238
 93. Rando, T. A. (2001). Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a "two hit" hypothesis of the cause of muscle necrosis. *Microsc Res Tech*, 55(4), 223-235.doi:10.1002/jemt.1172
 94. Wehling-Henricks, M., & Tidball, J. G. (2011). Neuronal nitric oxide synthase-rescue of dystrophin/utrophin double knockout mice does not require nNOS localization to the cell membrane. *PLoS One*, 6(10), e25071.doi:10.1371/journal.pone.0025071
 95. Totsuka, T., Watanabe, K., Uramoto, I., Sakuma, K., & Mizutani, T. (1998). Muscular dystrophy: centronucleation may reflect a compensatory activation of defective myonuclei. *J Biomed Sci*, 5(1), 54-61
 96. Desguerre, I., Christov, C., Mayer, M., Zeller, R., Becane, H. M., Bastuji-Garin, S., ... Gherardi, R. K. (2009). Clinical heterogeneity of duchenne muscular dystrophy (DMD): definition of sub-phenotypes and predictive criteria by long-term follow-up. *PLoS One*, 4(2), e4347.doi:10.1371/journal.pone.0004347
 97. Emery, A. E. (2002). The muscular dystrophies. *Lancet*, 359(9307), 687-695.doi:10.1016/S0140-6736(02)07815-7
 98. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., & Moore, K. J. (1984). X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(4), 1189-1192
 99. Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., & Barnard, P. J. (1989). The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244(4912), 1578-1580
 100. Coulton, G. R., Morgan, J. E., Partridge, T. A., & Sloper, J. C. (1988). The mdx mouse skeletal muscle myopathy: I. A histological, morphometric and biochemical investigation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 14(1), 53-70

101. Chamberlain, J. S., Metzger, J., Reyes, M., Townsend, D., & Faulkner, J. A. (2007). Dystrophin-deficient mdx mice display a reduced life span and are susceptible to spontaneous rhabdomyosarcoma. *FASEB J*, *21*(9), 2195-2204.doi:10.1096/fj.06-7353com
102. Stedman, H. H., Sweeney, H. L., Shrager, J. B., Maguire, H. C., Panettieri, R. A., Petrof, B., ... Kelly, A. M. (1991). The mdx mouse diaphragm reproduces the degenerative changes of Duchenne muscular dystrophy. *Nature*, *352*(6335), 536-539.doi:10.1038/352536a0
103. Crawford, G. E., Lu, Q. L., Partridge, T. A., & Chamberlain, J. S. (2001). Suppression of revertant fibers in mdx mice by expression of a functional dystrophin. *Hum Mol Genet*, *10*(24), 2745-2750
104. Muller, J., Vayssiere, N., Royuela, M., Leger, M. E., Muller, A., Bacou, F., ... Mornet, D. (2001). Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male mdx mice. *J Muscle Res Cell Motil*, *22*(2), 133-139
105. Collins, C. A., & Morgan, J. E. (2003). Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. *Int J Exp Pathol*, *84*(4), 165-172
106. Deconinck, A. E., Rafael, J. A., Skinner, J. A., Brown, S. C., Potter, A. C., Metzinger, L., ... Davies, K. E. (1997). Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, *90*(4), 717-727
107. Decary, S., Hamida, C. B., Mouly, V., Barbet, J. P., Hentati, F., & Butler-Browne, G. S. (2000). Shorter telomeres in dystrophic muscle consistent with extensive regeneration in young children. *Neuromuscul Disord*, *10*(2), 113-120
108. Chamberlain, J. S. (2010). Duchenne muscular dystrophy models show their age. *Cell*, *143*(7), 1040-1042.doi:10.1016/j.cell.2010.12.005
109. Sacco, A., Mourkioti, F., Tran, R., Choi, J., Llewellyn, M., Kraft, P., ... Blau, H. M. (2010). Short telomeres and stem cell exhaustion model Duchenne muscular dystrophy in mdx/mTR mice. *Cell*, *143*(7), 1059-1071.doi:10.1016/j.cell.2010.11.039

110. Howell, J. M., Fletcher, S., Kakulas, B. A., O'Hara, M., Lochmuller, H., & Karpati, G. (1997). Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul Disord*, 7(5), 325-328
111. Yugeta, N., Urasawa, N., Fujii, Y., Yoshimura, M., Yuasa, K., Wada, M. R., ... Takeda, S. (2006). Cardiac involvement in Beagle-based canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ): electrocardiographic, echocardiographic, and morphologic studies. *BMC Cardiovasc Disord*, 6, 47. doi:10.1186/1471-2261-6-47
112. Jones, B. R., Brennan, S., Mooney, C. T., Callanan, J. J., McAllister, H., Guo, L. T., ... Shelton, G. D. (2004). Muscular dystrophy with truncated dystrophin in a family of Japanese Spitz dogs. *J Neurol Sci*, 217(2), 143-149
113. Winand, N. J., Edwards, M., Pradhan, D., Berian, C. A., & Cooper, B. J. (1994). Deletion of the dystrophin muscle promoter in feline muscular dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 4(5-6), 433-445
114. Bassett, D. I., Bryson-Richardson, R. J., Daggett, D. F., Gautier, P., Keenan, D. G., & Currie, P. D. (2003). Dystrophin is required for the formation of stable muscle attachments in the zebrafish embryo. *Development*, 130(23), 5851-5860. doi:10.1242/dev.00799
115. Renault, V., Thornell, L. E., Eriksson, P. O., Butler-Browne, G., & Mouly, V. (2002). Regenerative potential of human skeletal muscle during aging. *Aging Cell*, 1(2), 132-139
116. Morgan, J. E., & Partridge, T. A. (2003). Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 35(8), 1151-1156
117. Allbrook, D. B., Han, M. F., & Hellmuth, A. E. (1971). Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology*, 3(3), 223-243
118. Cooper, R. N., Thiesson, D., Furling, D., Di Santo, J. P., Butler-Browne, G. S., & Mouly, V. (2003). Extended amplification in vitro and replicative senescence: key factors implicated in the success of human myoblast transplantation. *Hum Gene Ther*, 14(12), 1169-1179. doi:10.1089/104303403322168000

119. Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R., Tagliafico, E., Sacchetti, B., Perani, L., ... Cossu, G. (2007). Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol*, 9(3), 255-267.doi:10.1038/ncb1542
120. Moens, P. D., Van-Schoor, M. C., & Marechal, G. (1996). Lack of myoblasts migration between transplanted and host muscles of mdx and normal mice. *J Muscle Res Cell Motil*, 17(1), 37-43
121. Caron, N. J., Asselin, I., Morel, G., & Tremblay, J. P. (1999). Increased myogenic potential and fusion of matrilysin-expressing myoblasts transplanted in mice. *Cell Transplant*, 8(5), 465-476
122. El Fahime, E., Mills, P., Lafreniere, J. F., Torrente, Y., & Tremblay, J. P. (2002). The urokinase plasminogen activator: an interesting way to improve myoblast migration following their transplantation. *Exp Cell Res*, 280(2), 169-178
123. Skuk, D., Goulet, M., & Tremblay, J. P. (2011). Transplanted myoblasts can migrate several millimeters to fuse with damaged myofibers in nonhuman primate skeletal muscle. *J Neuropathol Exp Neurol*, 70(9), 770-778.doi:10.1097/NEN.0b013e31822a6baa
124. Skuk, D., Goulet, M., & Tremblay, J. P. (2006). Use of repeating dispensers to increase the efficiency of the intramuscular myogenic cell injection procedure. *Cell Transplant*, 15(7), 659-663
125. Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Cote, C. H., Chapdelaine, P., ... Tremblay, J. P. (2007). 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*, 17(1), 38-46.doi:10.1016/j.nmd.2006.10.003
126. Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., ... Buckingham, M. (2005). Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science*, 309(5743), 2064-2067.doi:10.1126/science.1114758
127. Cerletti, M., Jurga, S., Witczak, C. A., Hirshman, M. F., Shadrach, J. L., Goodyear, L. J., & Wagers, A. J. (2008). Highly efficient, functional engraftment of skeletal muscle stem cells in dystrophic muscles. *Cell*, 134(1), 37-47.doi:10.1016/j.cell.2008.05.049

128. Sacco, A., Doyonnas, R., Kraft, P., Vitorovic, S., & Blau, H. M. (2008). Self-renewal and expansion of single transplanted muscle stem cells. *Nature*, *456*(7221), 502-506.doi:10.1038/nature07384
129. Tanaka, K. K., Hall, J. K., Troy, A. A., Cornelison, D. D., Majka, S. M., & Olwin, B. B. (2009). Syndecan-4-expressing muscle progenitor cells in the SP engraft as satellite cells during muscle regeneration. *Cell Stem Cell*, *4*(3), 217-225.doi:10.1016/j.stem.2009.01.016
130. Collins, C. A., Olsen, I., Zammit, P. S., Heslop, L., Petrie, A., Partridge, T. A., & Morgan, J. E. (2005). Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, *122*(2), 289-301.doi:10.1016/j.cell.2005.05.010
131. Negroni, E., Vallese, D., Vilquin, J. T., Butler-Browne, G., Mouly, V., & Trollet, C. (2011). Current advances in cell therapy strategies for muscular dystrophies. *Expert Opin Biol Ther*, *11*(2), 157-176.doi:10.1517/14712598.2011.542748
132. Gussoni, E., Bennett, R. R., Muskiewicz, K. R., Meyerrose, T., Nolte, J. A., Gilgoff, I., ... Weinberg, K. (2002). Long-term persistence of donor nuclei in a Duchenne muscular dystrophy patient receiving bone marrow transplantation. *J Clin Invest*, *110*(6), 807-814.doi:10.1172/JCI16098
133. Dell'Agnola, C., Wang, Z., Storb, R., Tapscott, S. J., Kuhr, C. S., Hauschka, S. D., ... Little, M. T. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood*, *104*(13), 4311-4318.doi:10.1182/blood-2004-06-2247
134. Yu, M., Zhang, C., Zhang, Y., Feng, S., Yao, X., & Lu, X. (2007). BM stem cell transplantation rescues pathophysiologic features of aged dystrophic mdx muscle. *Cytotherapy*, *9*(1), 44-52.doi:10.1080/14653240601114815
135. Wakitani, S., Saito, T., & Caplan, A. I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*, *18*(12), 1417-1426.doi:10.1002/mus.880181212

136. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, *284*(5411), 143-147
137. Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Okada, H., Wada-Maeda, M., Nakamura, A., ... Takeda, S. (2012). Long-term engraftment of multipotent mesenchymal stromal cells that differentiate to form myogenic cells in dogs with Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, *20*(1), 168-177. doi:10.1038/mt.2011.181
138. Feng, S. W., Lu, X. L., Liu, Z. S., Zhang, Y. N., Liu, T. Y., Li, J. L., ... Zhang, C. (2008). Dynamic distribution of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells and change of pathology after infusing into mdx mice. *Cytotherapy*, *10*(3), 254-264. doi:10.1080/14653240802020381
139. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., ... Peault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, *3*(3), 301-313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003
140. Crisan, M., Huard, J., Zheng, B., Sun, B., Yap, S., Logar, A., ... Peault, B. (2008). Purification and culture of human blood vessel-associated progenitor cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol, Chapter 2, Unit 2B 2 1-2B 2 13*. doi:10.1002/9780470151808.sc02b02s4
141. Crisan, M., Deasy, B., Gavina, M., Zheng, B., Huard, J., Lazzari, L., & Peault, B. (2008). Purification and long-term culture of multipotent progenitor cells affiliated with the walls of human blood vessels: myoendothelial cells and pericytes. *Methods Cell Biol*, *86*, 295-309. doi:10.1016/S0091-679X(08)00013-7
142. Yin, A. H., Miraglia, S., Zanjani, E. D., Almeida-Porada, G., Ogawa, M., Leary, A. G., ... Buck, D. W. (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, *90*(12), 5002-5012
143. Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., ... Bresolin, N. (2004). Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest*, *114*(2), 182-195. doi:10.1172/JCI20325

144. Benchaouir, R., Meregalli, M., Farini, A., D'Antona, G., Belicchi, M., Goyenvalle, A., ... Torrente, Y. (2007). Restoration of human dystrophin following transplantation of exon-skipping-engineered DMD patient stem cells into dystrophic mice. *Cell Stem Cell*, *1*(6), 646-657.doi:10.1016/j.stem.2007.09.016
145. Shi, M., Ishikawa, M., Kamei, N., Nakasa, T., Adachi, N., Deie, M., ... Ochi, M. (2009). Acceleration of skeletal muscle regeneration in a rat skeletal muscle injury model by local injection of human peripheral blood-derived CD133-positive cells. *Stem Cells*, *27*(4), 949-960.doi:10.1002/stem.4
146. Vauchez, K., Marolleau, J. P., Schmid, M., Khattar, P., Chapel, A., Catelain, C., ... Vilquin, J. T. (2009). Aldehyde dehydrogenase activity identifies a population of human skeletal muscle cells with high myogenic capacities. *Mol Ther*, *17*(11), 1948-1958.doi:10.1038/mt.2009.204
147. De Angelis, L., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Cusella-De Angelis, M. G., ... Cossu, G. (1999). Skeletal myogenic progenitors originating from embryonic dorsal aorta coexpress endothelial and myogenic markers and contribute to postnatal muscle growth and regeneration. *J Cell Biol*, *147*(4), 869-878
148. Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., ... Cossu, G. (2006). Mesoangioblast stem cells ameliorate muscle function in dystrophic dogs. *Nature*, *444*(7119), 574-579.doi:10.1038/nature05282
149. Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676.doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
150. Mizuno, Y., Chang, H., Umeda, K., Niwa, A., Iwasa, T., Awaya, T., ... Heike, T. (2010). Generation of skeletal muscle stem/progenitor cells from murine induced pluripotent stem cells. *FASEB J*, *24*(7), 2245-2253.doi:10.1096/fj.09-137174
151. Tremblay, J. P., Malouin, F., Roy, R., Huard, J., Bouchard, J. P., Satoh, A., & Richards, C. L. (1993). Results of a triple blind clinical study of myoblast transplantations without immunosuppressive treatment in young boys with Duchenne muscular dystrophy. *Cell Transplant*, *2*(2), 99-112

152. Srinivas, T. R., & Meier-Kriesche, H. U. (2008). Minimizing immunosuppression, an alternative approach to reducing side effects: objectives and interim result. *Clin J Am Soc Nephrol*, 3 Suppl 2, S101-116.doi:10.2215/CJN.03510807
153. Timpe, J., Bevington, J., Casper, J., Dignam, J. D., & Trempe, J. P. (2005). Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Curr Gene Ther*, 5(3), 273-284
154. Agbandje-McKenna, M., & Kleinschmidt, J. (2011). AAV capsid structure and cell interactions. *Methods Mol Biol*, 807, 47-92.doi:10.1007/978-1-61779-370-7_3
155. Wu, Z., Asokan, A., & Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther*, 14(3), 316-327.doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.009
156. Schmidt, M., Voutetakis, A., Afione, S., Zheng, C., Mandikian, D., & Chiorini, J. A. (2008). Adeno-associated virus type 12 (AAV12): a novel AAV serotype with sialic acid- and heparan sulfate proteoglycan-independent transduction activity. *J Virol*, 82(3), 1399-1406.doi:10.1128/JVI.02012-07
157. Miyagoe-Suzuki, Y., & Takeda, S. (2010). Gene therapy for muscle disease. *Exp Cell Res*, 316(18), 3087-3092.doi:10.1016/j.yexcr.2010.05.022
158. Coura Rdos, S., & Nardi, N. B. (2007). The state of the art of adeno-associated virus-based vectors in gene therapy. *Virol J*, 4, 99.doi:10.1186/1743-422X-4-99
159. Summerford, C., & Samulski, R. J. (1998). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol*, 72(2), 1438-1445
160. Kaminsky, P. M., Keiser, N. W., Yan, Z., Lei-Butters, D. C., & Engelhardt, J. F. (2012). Directing integrin-linked endocytosis of recombinant AAV enhances productive FAK-dependent transduction. *Mol Ther*, 20(5), 972-983.doi:10.1038/mt.2011.295
161. Xiao, W., Warrington, K. H., Jr., Hearing, P., Hughes, J., & Muzyczka, N. (2002). Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2. *J Virol*, 76(22), 11505-11517
162. Pereira, D. J., McCarty, D. M., & Muzyczka, N. (1997). The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection. *J Virol*, 71(2), 1079-1088

163. Dyall, J., Szabo, P., & Berns, K. I. (1999). Adeno-associated virus (AAV) site-specific integration: formation of AAV-AAVS1 junctions in an in vitro system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22), 12849-12854
164. Geoffroy, M. C., & Salvetti, A. (2005). Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. *Curr Gene Ther*, 5(3), 265-271
165. Medicine, J. o. G. (2012). Vectors Used in Gene Therapy Clinicals Trials. Repéré le 27 décembre 2012 à <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
166. Templeton, N. S. (2009). *Gene and cell therapy : therapeutic mechanisms and strategies*. (3e éd.). CRC Press. Boca Raton.
167. McClure, C., Cole, K. L., Wulff, P., Klugmann, M., & Murray, A. J. (2011). Production and titring of recombinant adeno-associated viral vectors. *J Vis Exp*(57), e3348.doi:10.3791/3348
168. Yang, Q., Chen, F., & Trempe, J. P. (1994). Characterization of cell lines that inducibly express the adeno-associated virus Rep proteins. *J Virol*, 68(8), 4847-4856
169. Zhou, C., & Trempe, J. P. (1999). Induction of apoptosis by cadmium and the adeno-associated virus Rep proteins. *Virology*, 261(2), 280-287.doi:10.1006/viro.1999.9882
170. Clement, N., Knop, D. R., & Byrne, B. J. (2009). Large-scale adeno-associated viral vector production using a herpesvirus-based system enables manufacturing for clinical studies. *Hum Gene Ther*, 20(8), 796-806.doi:10.1089/hum.2009.094
171. Zolotukhin, S., Potter, M., Zolotukhin, I., Sakai, Y., Loiler, S., Fraites, T. J., Jr., ... Snyder, R. O. (2002). Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors. *Methods*, 28(2), 158-167
172. Gasmi, M. (2012). Improvements towards the industrialization of recombinant AAV vector manufacturing for clinical use Repéré le 5 mars 2013 à http://www.asgct.org/UserFiles/MG_ESGCT_CTsymposium_25Oct12.pdf
173. Zaiss, A. K., & Muruve, D. A. (2005). Immune responses to adeno-associated virus vectors. *Curr Gene Ther*, 5(3), 323-331
174. Zaiss, A. K., & Muruve, D. A. (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther*, 15(11), 808-816.doi:10.1038/gt.2008.54

175. Wang, Z., Allen, J. M., Riddell, S. R., Gregorevic, P., Storb, R., Tapscott, S. J., ... Kuhr, C. S. (2007). Immunity to adeno-associated virus-mediated gene transfer in a random-bred canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, *18*(1), 18-26. doi:10.1089/hum.2006.093
176. Wang, Z., Kuhr, C. S., Allen, J. M., Blankinship, M., Gregorevic, P., Chamberlain, J. S., ... 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*(6), 1160-1166. doi:10.1038/sj.mt.6300161
177. Rogers, G. L., Martino, A. T., Aslanidi, G. V., Jayandharan, G. R., Srivastava, A., & Herzog, R. W. (2011). Innate Immune Responses to AAV Vectors. *Front Microbiol*, *2*, 194. doi:10.3389/fmicb.2011.00194
178. Wang, Z., Tapscott, S. J., Chamberlain, J. S., & Storb, R. (2011). Immunity and AAV-Mediated Gene Therapy for Muscular Dystrophies in Large Animal Models and Human Trials. *Front Microbiol*, *2*, 201. doi:10.3389/fmicb.2011.00201
179. Yamamoto, K., Yuasa, K., Miyagoe, Y., Hosaka, Y., Tsukita, K., Yamamoto, H., ... Takeda, S. (2000). Immune response to adenovirus-delivered antigens upregulates utrophin and results in mitigation of muscle pathology in mdx mice. *Hum Gene Ther*, *11*(5), 669-680. doi:10.1089/10430340050015572
180. Yuasa, K., Yoshimura, M., Urasawa, N., Ohshima, S., Howell, J. M., Nakamura, A., ... Takeda, S. (2007). Injection of a recombinant AAV serotype 2 into canine skeletal muscles evokes strong immune responses against transgene products. *Gene Ther*, *14*(17), 1249-1260. doi:10.1038/sj.gt.3302984
181. Shin, J. H., Yue, Y., Srivastava, A., Smith, B., Lai, Y., & Duan, D. (2012). A simplified immune suppression scheme leads to persistent micro-dystrophin expression in duchenne muscular dystrophy dogs. *Hum Gene Ther*, *23*(2), 202-209. doi:10.1089/hum.2011.147
182. Adriouch, S., Franck, E., Drouot, L., Bonneau, C., Jolinon, N., Salvetti, A., & Boyer, O. (2011). Improved Immunological Tolerance Following Combination Therapy with CTLA-4/Ig and AAV-Mediated PD-L1/2 Muscle Gene Transfer. *Front Microbiol*, *2*, 199. doi:10.3389/fmicb.2011.00199

183. Haberman, R. P., McCown, T. J., & Samulski, R. J. (2000). Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol*, *74*(18), 8732-8739
184. Mingozzi, F., & High, K. A. (2011). Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther*, *11*(4), 321-330
185. Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., ... Xiao, X. (2005). Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol*, *23*(3), 321-328.doi:10.1038/nbt1073
186. Louboutin, J. P., Wang, L., & Wilson, J. M. (2005). Gene transfer into skeletal muscle using novel AAV serotypes. *J Gene Med*, *7*(4), 442-451.doi:10.1002/jgm.686
187. Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T. A., Gibson, G. A., McTiernan, C. F., Kay, M. A., & Nakai, H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*, *14*(1), 45-53.doi:10.1016/j.ymthe.2006.03.014
188. Blankinship, M. J., Gregorevic, P., Allen, J. M., Harper, S. Q., Harper, H., Halbert, C. L., ... Chamberlain, J. S. (2004). Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther*, *10*(4), 671-678.doi:10.1016/j.ymthe.2004.07.016
189. Gregorevic, P., Blankinship, M. J., Allen, J. M., Crawford, R. W., Meuse, L., Miller, D. G., ... Chamberlain, J. S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med*, *10*(8), 828-834.doi:10.1038/nm1085
190. Bish, L. T., Morine, K., Sleeper, M. M., Sanmiguel, J., Wu, D., Gao, G., ... Sweeney, H. L. (2008). Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum Gene Ther*, *19*(12), 1359-1368.doi:10.1089/hum.2008.123
191. Nishiyama, A., Ampong, B. N., Ohshima, S., Shin, J. H., Nakai, H., Imamura, M., ... Takeda, S. (2008). Recombinant adeno-associated virus type 8-mediated extensive therapeutic gene delivery into skeletal muscle of alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Hum Gene Ther*, *19*(7), 719-730.doi:10.1089/hum.2007.184

192. Bostick, B., Shin, J. H., Yue, Y., & Duan, D. (2011). AAV-microdystrophin therapy improves cardiac performance in aged female mdx mice. *Mol Ther*, *19*(10), 1826-1832.doi:10.1038/mt.2011.154
193. Pulicherla, N., Shen, S., Yadav, S., Debbink, K., Govindasamy, L., Agbandje-McKenna, M., & Asokan, A. (2011). Engineering liver-detargeted AAV9 vectors for cardiac and musculoskeletal gene transfer. *Mol Ther*, *19*(6), 1070-1078.doi:10.1038/mt.2011.22
194. Gregorevic, P., Blankinship, M. J., Allen, J. M., & Chamberlain, J. S. (2008). Systemic microdystrophin gene delivery improves skeletal muscle structure and function in old dystrophic mdx mice. *Mol Ther*, *16*(4), 657-664.doi:10.1038/mt.2008.28
195. Levine, B. A., Moir, A. J., Patchell, V. B., & Perry, S. V. (1990). The interaction of actin with dystrophin. *FEBS Lett*, *263*(1), 159-162
196. Jung, D., Yang, B., Meyer, J., Chamberlain, J. S., & Campbell, K. P. (1995). Identification and characterization of the dystrophin anchoring site on beta-dystroglycan. *J Biol Chem*, *270*(45), 27305-27310
197. Calvert, R., Kahana, E., & Gratzer, W. B. (1996). Stability of the dystrophin rod domain fold: evidence for nested repeating units. *Biophys J*, *71*(3), 1605-1610.doi:10.1016/S0006-3495(96)79363-3
198. Zhang, Y., & Duan, D. (2012). Novel mini-dystrophin gene dual adeno-associated virus vectors restore neuronal nitric oxide synthase expression at the sarcolemma. *Hum Gene Ther*, *23*(1), 98-103.doi:10.1089/hum.2011.131
199. Shin, J. H., Nitahara-Kasahara, Y., Hayashita-Kinoh, H., Ohshima-Hosoyama, S., Kinoshita, K., Chiyo, T., ... Takeda, S. (2011). Improvement of cardiac fibrosis in dystrophic mice by rAAV9-mediated microdystrophin transduction. *Gene Ther*, *18*(9), 910-919.doi:10.1038/gt.2011.36
200. Koo, T., Malerba, A., Athanasopoulos, T., Trollet, C., Boldrin, L., Ferry, A., ... Dickson, G. (2011). Delivery of AAV2/9-microdystrophin genes incorporating helix 1 of the coiled-coil motif in the C-terminal domain of dystrophin improves muscle pathology and restores the level of alpha1-syntrophin and alpha-dystrobrevin in skeletal muscles of mdx mice. *Hum Gene Ther*, *22*(11), 1379-1388.doi:10.1089/hum.2011.020

201. Koo, T., Okada, T., Athanasopoulos, T., Foster, H., Takeda, S., & Dickson, G. (2011). Long-term functional adeno-associated virus-microdystrophin expression in the dystrophic CXMDj dog. *J Gene Med*, *13*(9), 497-506.doi:10.1002/jgm.1602
202. Yue, Y., Liu, M., & Duan, D. (2006). C-terminal-truncated microdystrophin recruits dystrobrevin and syntrophin to the dystrophin-associated glycoprotein complex and reduces muscular dystrophy in symptomatic utrophin/dystrophin double-knockout mice. *Mol Ther*, *14*(1), 79-87.doi:10.1016/j.ymthe.2006.01.007
203. Gregorevic, P., Allen, J. M., Minami, E., Blankinship, M. J., Haraguchi, M., Meuse, L., ... Chamberlain, J. S. (2006). rAAV6-microdystrophin preserves muscle function and extends lifespan in severely dystrophic mice. *Nat Med*, *12*(7), 787-789.doi:10.1038/nm1439
204. Yue, Y., Ghosh, A., Long, C., Bostick, B., Smith, B. F., Kornegay, J. N., & Duan, D. (2008). A single intravenous injection of adeno-associated virus serotype-9 leads to whole body skeletal muscle transduction in dogs. *Mol Ther*, *16*(12), 1944-1952.doi:10.1038/mt.2008.207
205. Rodino-Klapac, L. R., Montgomery, C. L., Mendell, J. R., & Chicoine, L. G. (2011). AAV-mediated gene therapy to the isolated limb in rhesus macaques. *Methods Mol Biol*, *709*, 287-298.doi:10.1007/978-1-61737-982-6_19
206. Duan, D. (2011). Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? *Res Rep Biol*, *2011*(2), 31-42.doi:10.2147/RRB.S13463
207. Sahashi, K., Ibi, T., Suoh, H., Nakao, N., Tashiro, M., Marui, K., ... Sugita, H. (1994). Immunostaining of dystrophin and utrophin in skeletal muscle of dystrophinopathies. *Intern Med*, *33*(5), 277-283
208. Thanh, L. T., Nguyen, T. M., Helliwell, T. R., & Morris, G. E. (1995). Characterization of revertant muscle fibers in Duchenne muscular dystrophy, using exon-specific monoclonal antibodies against dystrophin. *Am J Hum Genet*, *56*(3), 725-731
209. Ahsan, M. F., & Gore, M. M. (2011). Comparative analysis of macrophage associated vectors for use in genetic vaccine. *Genet Vaccines Ther*, *9*(1), 10.doi:10.1186/1479-0556-9-10

210. Salva, M. Z., Himeda, C. L., Tai, P. W., Nishiuchi, E., Gregorevic, P., Allen, J. M., ... Hauschka, S. D. (2007). Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol Ther*, *15*(2), 320-329.doi:10.1038/sj.mt.6300027
211. Duan, D. (2006). From the smallest virus to the biggest gene: marching towards gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Discov Med*, *6*(33), 103-108
212. Ghosh, A., Yue, Y., & Duan, D. (2011). Efficient transgene reconstitution with hybrid dual AAV vectors carrying the minimized bridging sequences. *Hum Gene Ther*, *22*(1), 77-83.doi:10.1089/hum.2010.122
213. Lai, Y., Yue, Y., Liu, M., Ghosh, A., Engelhardt, J. F., Chamberlain, J. S., & Duan, D. (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol*, *23*(11), 1435-1439.doi:10.1038/nbt1153
214. Ghosh, A., Yue, Y., & Duan, D. (2006). Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral (AAV) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle. *J Gene Med*, *8*(3), 298-305.doi:10.1002/jgm.835
215. Lostal, W., Bartoli, M., Bourg, N., Roudaut, C., Bentaib, A., Miyake, K., ... Richard, I. (2010). Efficient recovery of dysferlin deficiency by dual adeno-associated vector-mediated gene transfer. *Hum Mol Genet*, *19*(10), 1897-1907.doi:10.1093/hmg/ddq065
216. Lawler, J. M. (2011). Exacerbation of pathology by oxidative stress in respiratory and locomotor muscles with Duchenne muscular dystrophy. *J Physiol*, *589*(Pt 9), 2161-2170.doi:10.1113/jphysiol.2011.207456
217. Harper, S. Q., Hauser, M. A., DelloRusso, C., Duan, D., Crawford, R. W., Phelps, S. F., ... Chamberlain, J. S. (2002). Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. *Nat Med*, *8*(3), 253-261.doi:10.1038/nm0302-253
218. Odom, G. L., Gregorevic, P., Allen, J. M., & Chamberlain, J. S. (2011). Gene therapy of mdx mice with large truncated dystrophins generated by recombination using rAAV6. *Mol Ther*, *19*(1), 36-45.doi:10.1038/mt.2010.205

219. ONUSIDA. (2012). FICHE D'INFORMATION MONDIALE. Repéré le 27 décembre 2012 à http://www.unaids.org/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2012/gr2012/20121120_FactSheet_Global_fr.pdf
220. Fields, B. N., Knipe, D. M., & Howley, P. M. (2007). *Fields virology*. (5e éd.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.
221. Ganser-Pornillos, B. K., Yeager, M., & Pornillos, O. (2012). Assembly and architecture of HIV. *Adv Exp Med Biol*, 726, 441-465.doi:10.1007/978-1-4614-0980-9_20
222. Arhel, N. (2010). Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology*, 7, 96.doi:10.1186/1742-4690-7-96
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., Varmus, H., & National Center for Biotechnology Information (U.S.) (1997). *Retroviruses at the National Center for Biotechnology Information*. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=rv.TOC&depth=2>
224. Gan, X., & Gould, S. J. (2012). HIV Pol inhibits HIV budding and mediates the severe budding defect of Gag-Pol. *PLoS One*, 7(1), e29421.doi:10.1371/journal.pone.0029421
225. Jager, S., Cimermancic, P., Gulbahce, N., Johnson, J. R., McGovern, K. E., Clarke, S. C., ... Krogan, N. J. (2012). Global landscape of HIV-human protein complexes. *Nature*, 481(7381), 365-370.doi:10.1038/nature10719
226. Nisole, S., & Saib, A. (2004). Early steps of retrovirus replicative cycle. *Retrovirology*, 1, 9.doi:10.1186/1742-4690-1-9
227. Miyauchi, K., Kim, Y., Latinovic, O., Morozov, V., & Melikyan, G. B. (2009). HIV enters cells via endocytosis and dynamin-dependent fusion with endosomes. *Cell*, 137(3), 433-444.doi:10.1016/j.cell.2009.02.046
228. Daecke, J., Fackler, O. T., Dittmar, M. T., & Krausslich, H. G. (2005). Involvement of clathrin-mediated endocytosis in human immunodeficiency virus type 1 entry. *J Virol*, 79(3), 1581-1594.doi:10.1128/JVI.79.3.1581-1594.2005
229. Unutmaz, D., KewalRamani, V. N., Marmon, S., & Littman, D. R. (1999). Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes. *J Exp Med*, 189(11), 1735-1746

230. McDonald, D., Vodicka, M. A., Lucero, G., Svitkina, T. M., Borisy, G. G., Emerman, M., & Hope, T. J. (2002). Visualization of the intracellular behavior of HIV in living cells. *J Cell Biol*, *159*(3), 441-452.doi:10.1083/jcb.200203150
231. Arhel, N. J., Souquere-Besse, S., Munier, S., Souque, P., Guadagnini, S., Rutherford, S., ... Charneau, P. (2007). HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore. *EMBO J*, *26*(12), 3025-3037.doi:10.1038/sj.emboj.7601740
232. Kim, S. Y., Byrn, R., Groopman, J., & Baltimore, D. (1989). Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. *J Virol*, *63*(9), 3708-3713
233. Levin, J. G., Mitra, M., Mascarenhas, A., & Musier-Forsyth, K. (2010). Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA Biol*, *7*(6), 754-774
234. Zennou, V., Petit, C., Guetard, D., Nerhbass, U., Montagnier, L., & Charneau, P. (2000). HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. *Cell*, *101*(2), 173-185.doi:10.1016/S0092-8674(00)80828-4
235. Riviere, L., Darlix, J. L., & Cimarelli, A. (2010). Analysis of the viral elements required in the nuclear import of HIV-1 DNA. *J Virol*, *84*(2), 729-739.doi:10.1128/JVI.01952-09
236. Farnet, C. M., & Haseltine, W. A. (1991). Determination of viral proteins present in the human immunodeficiency virus type 1 preintegration complex. *J Virol*, *65*(4), 1910-1915
237. Miller, M. D., Farnet, C. M., & Bushman, F. D. (1997). Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J Virol*, *71*(7), 5382-5390
238. Pante, N., & Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*, *13*(2), 425-434.doi:10.1091/mbc.01-06-0308
239. Zhou, L., Sokolskaja, E., Jolly, C., James, W., Cowley, S. A., & Fassati, A. (2011). Transportin 3 promotes a nuclear maturation step required for efficient HIV-1 integration. *PLoS Pathog*, *7*(8), e1002194.doi:10.1371/journal.ppat.1002194

240. Fassati, A., Gorlich, D., Harrison, I., Zaytseva, L., & Mingot, J. M. (2003). Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *EMBO J*, 22(14), 3675-3685.doi:10.1093/emboj/cdg357
241. Monette, A., Pante, N., & Mouland, A. J. (2011). Examining the requirements for nucleoporins by HIV-1. *Future Microbiol*, 6(11), 1247-1250.doi:10.2217/fmb.11.111
242. Fassati, A. (2012). Multiple roles of the capsid protein in the early steps of HIV-1 infection. *Virus Res*.doi:10.1016/j.virusres.2012.09.012
243. Yamashita, M., & Emerman, M. (2005). The cell cycle independence of HIV infections is not determined by known karyophilic viral elements. *PLoS Pathog*, 1(3), e18.doi:10.1371/journal.ppat.0010018
244. Bukrinsky, M. I., Haggerty, S., Dempsey, M. P., Sharova, N., Adzhubel, A., Spitz, L., ... Stevenson, M. (1993). A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells. *Nature*, 365(6447), 666-669.doi:10.1038/365666a0
245. Suzuki, Y., & Craigie, R. (2007). The road to chromatin - nuclear entry of retroviruses. *Nat Rev Microbiol*, 5(3), 187-196.doi:10.1038/nrmicro1579
246. Woodward, C. L., Prakobwanakit, S., Mosessian, S., & Chow, S. A. (2009). Integrase interacts with nucleoporin NUP153 to mediate the nuclear import of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 83(13), 6522-6533.doi:10.1128/JVI.02061-08
247. Woodward, C. L., & Chow, S. A. (2010). The nuclear pore complex: a new dynamic in HIV-1 replication. *Nucleus*, 1(1), 18-22.doi:10.4161/nucl.1.1.10571
248. Logue, E. C., Taylor, K. T., Goff, P. H., & Landau, N. R. (2011). The cargo-binding domain of transportin 3 is required for lentivirus nuclear import. *J Virol*, 85(24), 12950-12961.doi:10.1128/JVI.05384-11
249. Brass, A. L., Dykxhoorn, D. M., Benita, Y., Yan, N., Engelman, A., Xavier, R. J., ... Elledge, S. J. (2008). Identification of host proteins required for HIV infection through a functional genomic screen. *Science*, 319(5865), 921-926.doi:10.1126/science.1152725

250. Konig, R., Zhou, Y., Elleder, D., Diamond, T. L., Bonamy, G. M., Ireland, J. T., ... Chanda, S. K. (2008). Global analysis of host-pathogen interactions that regulate early-stage HIV-1 replication. *Cell*, *135*(1), 49-60.doi:10.1016/j.cell.2008.07.032
251. Cribier, A., Segeral, E., Delelis, O., Parissi, V., Simon, A., Ruff, M., ... Emiliani, S. (2011). Mutations affecting interaction of integrase with TNPO3 do not prevent HIV-1 cDNA nuclear import. *Retrovirology*, *8*, 104.doi:10.1186/1742-4690-8-104
252. Sloan, R. D., & Wainberg, M. A. (2011). The role of unintegrated DNA in HIV infection. *Retrovirology*, *8*, 52.doi:10.1186/1742-4690-8-52
253. Sakai, H., Kawamura, M., Sakuragi, J., Sakuragi, S., Shibata, R., Ishimoto, A., ... Adachi, A. (1993). Integration is essential for efficient gene expression of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, *67*(3), 1169-1174
254. Taddeo, B., Haseltine, W. A., & Farnet, C. M. (1994). Integrase mutants of human immunodeficiency virus type 1 with a specific defect in integration. *J Virol*, *68*(12), 8401-8405
255. Engelman, A., Englund, G., Orenstein, J. M., Martin, M. A., & Craigie, R. (1995). Multiple effects of mutations in human immunodeficiency virus type 1 integrase on viral replication. *J Virol*, *69*(5), 2729-2736
256. Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C., Ecker, J. R., & Bushman, F. (2002). HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*, *110*(4), 521-529
257. Lewinski, M. K., Bisgrove, D., Shinn, P., Chen, H., Hoffmann, C., Hannehalli, S., ... Bushman, F. D. (2005). Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription. *J Virol*, *79*(11), 6610-6619.doi:10.1128/JVI.79.11.6610-6619.2005
258. Ciuffi, A., Llano, M., Poeschla, E., Hoffmann, C., Leipzig, J., Shinn, P., ... Bushman, F. (2005). A role for LEDGF/p75 in targeting HIV DNA integration. *Nat Med*, *11*(12), 1287-1289.doi:10.1038/nm1329
259. Kulkarni, A., Pavithra, L., Rampalli, S., Mogare, D., Babu, K., Shiekh, G., ... Chattopadhyay, S. (2004). HIV-1 integration sites are flanked by potential MARs that

- alone can act as promoters. *Biochem Biophys Res Commun*, 322(2), 672-677.doi:10.1016/j.bbrc.2004.07.170
260. Kessler, J. J., Li, M., Ignatov, M., Shkriabai, N., Eidahl, J. O., Feng, L., ... Kvaratskhelia, M. (2011). FRET analysis reveals distinct conformations of IN tetramers in the presence of viral DNA or LEDGF/p75. *Nucleic Acids Res*, 39(20), 9009-9022.doi:10.1093/nar/gkr581
261. Llano, M., Delgado, S., Vanegas, M., & Poeschla, E. M. (2004). Lens epithelium-derived growth factor/p75 prevents proteasomal degradation of HIV-1 integrase. *J Biol Chem*, 279(53), 55570-55577.doi:10.1074/jbc.M408508200
262. Llano, M., Saenz, D. T., Meehan, A., Wongthida, P., Peretz, M., Walker, W. H., ... Poeschla, E. M. (2006). An essential role for LEDGF/p75 in HIV integration. *Science*, 314(5798), 461-464.doi:10.1126/science.1132319
263. Llano, M., Vanegas, M., Hutchins, N., Thompson, D., Delgado, S., & Poeschla, E. M. (2006). Identification and characterization of the chromatin-binding domains of the HIV-1 integrase interactor LEDGF/p75. *J Mol Biol*, 360(4), 760-773.doi:10.1016/j.jmb.2006.04.073
264. Engelman, A., & Cherepanov, P. (2008). The lentiviral integrase binding protein LEDGF/p75 and HIV-1 replication. *PLoS Pathog*, 4(3), e1000046.doi:10.1371/journal.ppat.1000046
265. Shun, M. C., Raghavendra, N. K., Vandegraaff, N., Daigle, J. E., Hughes, S., Kellam, P., ... Engelman, A. (2007). LEDGF/p75 functions downstream from preintegration complex formation to effect gene-specific HIV-1 integration. *Genes Dev*, 21(14), 1767-1778.doi:10.1101/gad.1565107
266. Henderson, A., Holloway, A., Reeves, R., & Tremethick, D. J. (2004). Recruitment of SWI/SNF to the human immunodeficiency virus type 1 promoter. *Mol Cell Biol*, 24(1), 389-397
267. Soto-Giron, M. J., & Garcia-Vallejo, F. (2012). Changes in the topology of gene expression networks by human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) integration in macrophages. *Virus Res*, 163(1), 91-97.doi:10.1016/j.virusres.2011.08.015

268. Nagel, J., Gross, B., Meggendorfer, M., Preiss, C., Grez, M., Brack-Werner, R., & Dietzel, S. (2012). Stably integrated and expressed retroviral sequences can influence nuclear location and chromatin condensation of the integration locus. *Chromosoma*.doi:10.1007/s00412-012-0366-9
269. Felber, B. K., Hadzopoulou-Cladaras, M., Cladaras, C., Copeland, T., & Pavlakis, G. N. (1989). rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(5), 1495-1499
270. Daly, T. J., Cook, K. S., Gray, G. S., Maione, T. E., & Rusche, J. R. (1989). Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. *Nature*, 342(6251), 816-819.doi:10.1038/342816a0
271. Heaphy, S., Dingwall, C., Ernberg, I., Gait, M. J., Green, S. M., Karn, J., ... Skinner, M. A. (1990). HIV-1 regulator of virion expression (Rev) protein binds to an RNA stem-loop structure located within the Rev response element region. *Cell*, 60(4), 685-693
272. Olsen, H. S., Nelbock, P., Cochrane, A. W., & Rosen, C. A. (1990). Secondary structure is the major determinant for interaction of HIV rev protein with RNA. *Science*, 247(4944), 845-848
273. Yedavalli, V. S., & Jeang, K. T. (2011). MatrIn 3 is a co-factor for HIV-1 Rev in regulating post-transcriptional viral gene expression. *Retrovirology*, 8, 61.doi:10.1186/1742-4690-8-61
274. Kula, A., Guerra, J., Knezevich, A., Kleva, D., Myers, M. P., & Marcello, A. (2011). Characterization of the HIV-1 RNA associated proteome identifies MatrIn 3 as a nuclear cofactor of Rev function. *Retrovirology*, 8, 60.doi:10.1186/1742-4690-8-60
275. Cochrane, A., Murley, L. L., Gao, M., Wong, R., Clayton, K., Brufatto, N., ... Frappier, L. (2009). Stable complex formation between HIV Rev and the nucleosome assembly protein, NAP1, affects Rev function. *Virology*, 388(1), 103-111.doi:10.1016/j.virol.2009.03.005
276. Yedavalli, V. S., Neuveut, C., Chi, Y. H., Kleiman, L., & Jeang, K. T. (2004). Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell*, 119(3), 381-392.doi:10.1016/j.cell.2004.09.029

277. Yedavalli, V. S., & Jeang, K. T. (2010). Trimethylguanosine capping selectively promotes expression of Rev-dependent HIV-1 RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(33), 14787-14792.doi:10.1073/pnas.1009490107
278. Mautino, M. R., & Morgan, R. A. (2002). Inhibition of HIV-1 replication by novel lentiviral vectors expressing transdominant Rev and HIV-1 env antisense. *Gene Ther*, *9*(7), 421-431.doi:10.1038/sj.gt.3301674
279. Haraguchi, H., Sudo, S., Noda, T., Momose, F., Kawaoka, Y., & Morikawa, Y. (2010). Intracellular localization of human immunodeficiency virus type 1 Gag and GagPol products and virus particle release: relationship with the Gag-to-GagPol ratio. *Microbiol Immunol*, *54*(12), 734-746.doi:10.1111/j.1348-0421.2010.00276.x
280. Mann, R., Mulligan, R. C., & Baltimore, D. (1983). Construction of a retrovirus packaging mutant and its use to produce helper-free defective retrovirus. *Cell*, *33*(1), 153-159
281. Anderson, W. F., Blaese, R. M., & Culver, K. (1990). The ADA human gene therapy clinical protocol: Points to Consider response with clinical protocol, July 6, 1990. *Hum Gene Ther*, *1*(3), 331-362.doi:10.1089/hum.1990.1.3-331
282. Blaese, R. M., Culver, K. W., Chang, L., Anderson, W. F., Mullen, C., Nienhuis, A., ... et al. (1993). Treatment of severe combined immunodeficiency disease (SCID) due to adenosine deaminase deficiency with CD34+ selected autologous peripheral blood cells transduced with a human ADA gene. Amendment to clinical research project, Project 90-C-195, January 10, 1992. *Hum Gene Ther*, *4*(4), 521-527.doi:10.1089/hum.1993.4.4-521
283. Blaese, R. M., Culver, K. W., Miller, A. D., Carter, C. S., Fleisher, T., Clerici, M., ... Anderson, W. F. (1995). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, *270*(5235), 475-480
284. Gaspar, H. B., & Thrasher, A. J. (2005). Gene therapy for severe combined immunodeficiencies. *Expert Opin Biol Ther*, *5*(9), 1175-1182.doi:10.1517/14712598.5.9.1175
285. Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., ... Cavazzana-Calvo, M. (2003). LMO2-associated clonal T cell

- proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 302(5644), 415-419.doi:10.1126/science.1088547
286. Hwang, J. J., Li, L., & Anderson, W. F. (1997). A conditional self-inactivating retrovirus vector that uses a tetracycline-responsive expression system. *J Virol*, 71(9), 7128-7131
287. Naldini, L., Blomer, U., Gally, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., ... Trono, D. (1996). In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272(5259), 263-267
288. Kobinger, G. P., Louboutin, J. P., Barton, E. R., Sweeney, H. L., & Wilson, J. M. (2003). Correction of the dystrophic phenotype by in vivo targeting of muscle progenitor cells. *Hum Gene Ther*, 14(15), 1441-1449.doi:10.1089/104303403769211655
289. Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C. C., Ranzani, M., ... Naldini, L. (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *J Clin Invest*, 119(4), 964-975.doi:10.1172/JCI37630
290. Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Ponzoni, M., Bartholomae, C., ... Naldini, L. (2006). Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol*, 24(6), 687-696.doi:10.1038/nbt1216
291. Modlich, U., Navarro, S., Zychlinski, D., Maetzig, T., Knoess, S., Brugman, M. H., ... Baum, C. (2009). Insertional transformation of hematopoietic cells by self-inactivating lentiviral and gammaretroviral vectors. *Mol Ther*, 17(11), 1919-1928.doi:10.1038/mt.2009.179
292. Mok, H. P., Javed, S., & Lever, A. (2007). Stable gene expression occurs from a minority of integrated HIV-1-based vectors: transcriptional silencing is present in the majority. *Gene Ther*, 14(9), 741-751.doi:10.1038/sj.gt.3302923
293. Iwakuma, T., Cui, Y., & Chang, L. J. (1999). Self-inactivating lentiviral vectors with U3 and U5 modifications. *Virology*, 261(1), 120-132.doi:10.1006/viro.1999.9850
294. Sakuma, T., Barry, M. A., & Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J*, 443(3), 603-618.doi:10.1042/BJ20120146

295. Logan, A. C., Haas, D. L., Kafri, T., & Kohn, D. B. (2004). Integrated self-inactivating lentiviral vectors produce full-length genomic transcripts competent for encapsidation and integration. *J Virol*, *78*(16), 8421-8436.doi:10.1128/JVI.78.16.8421-8436.2004
296. Rivella, S., Callegari, J. A., May, C., Tan, C. W., & Sadelain, M. (2000). The cHS4 insulator increases the probability of retroviral expression at random chromosomal integration sites. *J Virol*, *74*(10), 4679-4687
297. Emery, D. W., Yannaki, E., Tubb, J., Nishino, T., Li, Q., & Stamatoyannopoulos, G. (2002). Development of virus vectors for gene therapy of beta chain hemoglobinopathies: flanking with a chromatin insulator reduces gamma-globin gene silencing in vivo. *Blood*, *100*(6), 2012-2019.doi:10.1182/blood-2002-01-0219
298. Ramezani, A., Hawley, T. S., & Hawley, R. G. (2003). Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. *Blood*, *101*(12), 4717-4724.doi:10.1182/blood-2002-09-2991
299. Arumugam, P. I., Scholes, J., Perelman, N., Xia, P., Yee, J. K., & Malik, P. (2007). Improved human beta-globin expression from self-inactivating lentiviral vectors carrying the chicken hypersensitive site-4 (cHS4) insulator element. *Mol Ther*, *15*(10), 1863-1871.doi:10.1038/sj.mt.6300259
300. Puthenveetil, G., Scholes, J., Carbonell, D., Qureshi, N., Xia, P., Zeng, L., ... Malik, P. (2004). Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. *Blood*, *104*(12), 3445-3453.doi:10.1182/blood-2004-04-1427
301. Evans-Galea, M. V., Wielgosz, M. M., Hanawa, H., Srivastava, D. K., & Nienhuis, A. W. (2007). Suppression of clonal dominance in cultured human lymphoid cells by addition of the cHS4 insulator to a lentiviral vector. *Mol Ther*, *15*(4), 801-809.doi:10.1038/sj.mt.6300103
302. Ryu, B. Y., Evans-Galea, M. V., Gray, J. T., Bodine, D. M., Persons, D. A., & Nienhuis, A. W. (2008). An experimental system for the evaluation of retroviral vector design to diminish the risk for proto-oncogene activation. *Blood*, *111*(4), 1866-1875.doi:10.1182/blood-2007-04-085506

303. Urbinati, F., Arumugam, P., Higashimoto, T., Perumbeti, A., Mitts, K., Xia, P., & Malik, P. (2009). Mechanism of reduction in titers from lentivirus vectors carrying large inserts in the 3'LTR. *Mol Ther*, *17*(9), 1527-1536.doi:10.1038/mt.2009.89
304. Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M., & Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet*, *25*(2), 217-222.doi:10.1038/76095
305. Zennou, V., Serguera, C., Sarkis, C., Colin, P., Perret, E., Mallet, J., & Charneau, P. (2001). The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vector-mediated cell transduction in the brain. *Nat Biotechnol*, *19*(5), 446-450.doi:10.1038/88115
306. Sirven, A., Pflumio, F., Zennou, V., Titeux, M., Vainchenker, W., Coulombel, L., ... Charneau, P. (2000). 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*, *96*(13), 4103-4110
307. Baekelandt, V., Claeys, A., Eggermont, K., Lauwers, E., De Strooper, B., Nuttin, B., & Debyser, Z. (2002). Characterization of lentiviral vector-mediated gene transfer in adult mouse brain. *Hum Gene Ther*, *13*(7), 841-853.doi:10.1089/10430340252899019
308. Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., & Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol*, *73*(4), 2886-2892
309. Oh, T., Bajwa, A., Jia, G., & Park, F. (2007). Lentiviral vector design using alternative RNA export elements. *Retrovirology*, *4*, 38.doi:10.1186/1742-4690-4-38
310. Grandchamp, N., Henriot, D., Philippe, S., Amar, L., Ursulet, S., Serguera, C., ... Sarkis, C. (2011). Influence of insulators on transgene expression from integrating and non-integrating lentiviral vectors. *Genet Vaccines Ther*, *9*(1), 1.doi:10.1186/1479-0556-9-1
311. Kumar, M., Keller, B., Makalou, N., & Sutton, R. E. (2001). Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, *12*(15), 1893-1905.doi:10.1089/104303401753153947
312. al Yacoub, N., Romanowska, M., Haritonova, N., & Foerster, J. (2007). Optimized production and concentration of lentiviral vectors containing large inserts. *J Gene Med*, *9*(7), 579-584.doi:10.1002/jgm.1052

313. Park, F. (2007). Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? *Physiol Genomics*, 31(2), 159-173.doi:10.1152/physiolgenomics.00069.2007
314. Broussau, S., Jabbour, N., Lachapelle, G., Durocher, Y., Tom, R., Transfiguracion, J., ... Massie, B. (2008). Inducible packaging cells for large-scale production of lentiviral vectors in serum-free suspension culture. *Mol Ther*, 16(3), 500-507.doi:10.1038/sj.mt.6300383
315. Dull, T., Zufferey, R., Kelly, M., Mandel, R. J., Nguyen, M., Trono, D., & Naldini, L. (1998). A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, 72(11), 8463-8471
316. Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D., & Verma, I. M. (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(21), 11382-11388
317. Escors, D., & Breckpot, K. (2010). Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 58(2), 107-119.doi:10.1007/s00005-010-0063-4
318. Koldej, R., Cmielewski, P., Stocker, A., Parsons, D. W., & Anson, D. S. (2005). Optimisation of a multipartite human immunodeficiency virus based vector system; control of virus infectivity and large-scale production. *J Gene Med*, 7(11), 1390-1399.doi:10.1002/jgm.803
319. Cornetta, K., Yao, J., Jasti, A., Koop, S., Douglas, M., Hsu, D., ... Duffy, L. (2011). Replication-competent lentivirus analysis of clinical grade vector products. *Mol Ther*, 19(3), 557-566.doi:10.1038/mt.2010.278
320. Ansoerge, S., Lanthier, S., Transfiguracion, J., Durocher, Y., Henry, O., & Kamen, A. (2009). Development of a scalable process for high-yield lentiviral vector production by transient transfection of HEK293 suspension cultures. *J Gene Med*, 11(10), 868-876.doi:10.1002/jgm.1370
321. Westerman, K. A., Ao, Z., Cohen, E. A., & Le Boulch, P. (2007). Design of a trans protease lentiviral packaging system that produces high titer virus. *Retrovirology*, 4, 96.doi:10.1186/1742-4690-4-96

322. Cooper, A. R., Patel, S., Senadheera, S., Plath, K., Kohn, D. B., & Hollis, R. P. (2011). Highly efficient large-scale lentiviral vector concentration by tandem tangential flow filtration. *J Virol Methods*, 177(1), 1-9.doi:10.1016/j.jviromet.2011.06.019
323. Kutner, R. H., Zhang, X. Y., & Reiser, J. (2009). Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors. *Nat Protoc*, 4(4), 495-505.doi:10.1038/nprot.2009.22
324. Cronin, J., Zhang, X. Y., & Reiser, J. (2005). Altering the tropism of lentiviral vectors through pseudotyping. *Curr Gene Ther*, 5(4), 387-398
325. Coil, D. A., & Miller, A. D. (2004). Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus. *J Virol*, 78(20), 10920-10926.doi:10.1128/JVI.78.20.10920-10926.2004
326. Talbot, G. E., Waddington, S. N., Bales, O., Tchen, R. C., & Antoniou, M. N. (2010). Desmin-regulated lentiviral vectors for skeletal muscle gene transfer. *Mol Ther*, 18(3), 601-608.doi:10.1038/mt.2009.267
327. Ouyang, J., & Alway, S. E. (2004). Transgene expression in hypertrophied and aged skeletal muscle in vivo by lentivirus delivery. *J Gene Med*, 6(3), 278-287.doi:10.1002/jgm.518
328. Burns, J. C., Friedmann, T., Driever, W., Burrascano, M., & Yee, J. K. (1993). Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(17), 8033-8037
329. Higashikawa, F., & Chang, L. (2001). Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors. *Virology*, 280(1), 124-131.doi:10.1006/viro.2000.0743
330. Carmo, M., Alves, A., Rodrigues, A. F., Coroadinha, A. S., Carrondo, M. J., Alves, P. M., & Cruz, P. E. (2009). Stabilization of gammaretroviral and lentiviral vectors: from production to gene transfer. *J Gene Med*, 11(8), 670-678.doi:10.1002/jgm.1353
331. Mitta, B., Rimann, M., & Fussenegger, M. (2005). Detailed design and comparative analysis of protocols for optimized production of high-performance HIV-1-derived lentiviral particles. *Metab Eng*, 7(5-6), 426-436.doi:10.1016/j.ymben.2005.06.006

332. Kumar, M., Bradow, B. P., & Zimmerberg, J. (2003). Large-scale production of pseudotyped lentiviral vectors using baculovirus GP64. *Hum Gene Ther*, *14*(1), 67-77.doi:10.1089/10430340360464723
333. Kaikkonen, M. U., Raty, J. K., Airene, K. J., Wirth, T., Heikura, T., & Yla-Herttuala, S. (2006). Truncated vesicular stomatitis virus G protein improves baculovirus transduction efficiency in vitro and in vivo. *Gene Ther*, *13*(4), 304-312.doi:10.1038/sj.gt.3302657
334. MacKenzie, T. C., Kobinger, G. P., Louboutin, J. P., Radu, A., Javazon, E. H., Sena-Esteves, M., ... Flake, A. W. (2005). Transduction of satellite cells after prenatal intramuscular administration of lentiviral vectors. *J Gene Med*, *7*(1), 50-58.doi:10.1002/jgm.649
335. MacKenzie, T. C., Kobinger, G. P., Kootstra, N. A., Radu, A., Sena-Esteves, M., Bouchard, S., ... Flake, A. W. (2002). Efficient transduction of liver and muscle after in utero injection of lentiviral vectors with different pseudotypes. *Mol Ther*, *6*(3), 349-358
336. Munch, R. C., Muhlebach, M. D., Schaser, T., Kneissl, S., Jost, C., Pluckthun, A., ... Buchholz, C. J. (2011). DARPins: an efficient targeting domain for lentiviral vectors. *Mol Ther*, *19*(4), 686-693.doi:10.1038/mt.2010.298
337. Lei, Y., Joo, K. I., Zarzar, J., Wong, C., & Wang, P. (2010). Targeting lentiviral vector to specific cell types through surface displayed single chain antibody and fusogenic molecule. *Virol J*, *7*, 35.doi:10.1186/1743-422X-7-35
338. Funke, S., Maisner, A., Muhlebach, M. D., Koehl, U., Grez, M., Cattaneo, R., ... Buchholz, C. J. (2008). Targeted cell entry of lentiviral vectors. *Mol Ther*, *16*(8), 1427-1436.doi:10.1038/mt.2008.128
339. Kaplan, A. H., & Swanstrom, R. (1991). The HIV-1 gag precursor is processed via two pathways: implications for cytotoxicity. *Biomed Biochim Acta*, *50*(4-6), 647-653
340. Nie, Z., Phenix, B. N., Lum, J. J., Alam, A., Lynch, D. H., Beckett, B., ... Badley, A. D. (2002). HIV-1 protease processes procaspase 8 to cause mitochondrial release of cytochrome c, caspase cleavage and nuclear fragmentation. *Cell Death Differ*, *9*(11), 1172-1184.doi:10.1038/sj.cdd.4401094

341. Chen, S. T., Iida, A., Guo, L., Friedmann, T., & Yee, J. K. (1996). Generation of packaging cell lines for pseudotyped retroviral vectors of the G protein of vesicular stomatitis virus by using a modified tetracycline inducible system. *Proc Natl Acad Sci USA*, *93*(19), 10057-10062
342. Kafri, T., van Praag, H., Ouyang, L., Gage, F. H., & Verma, I. M. (1999). A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol*, *73*(1), 576-584
343. Klages, N., Zufferey, R., & Trono, D. (2000). A stable system for the high-titer production of multiply attenuated lentiviral vectors. *Mol Ther*, *2*(2), 170-176.doi:10.1006/mthe.2000.0103
344. Farson, D., Witt, R., McGuinness, R., Dull, T., Kelly, M., Song, J., ... Naldini, L. (2001). A new-generation stable inducible packaging cell line for lentiviral vectors. *Hum Gene Ther*, *12*(8), 981-997.doi:10.1089/104303401750195935
345. Ni, Y., Sun, S., Oparaocha, I., Humeau, L., Davis, B., Cohen, R., ... Dropulic, B. (2005). Generation of a packaging cell line for prolonged large-scale production of high-titer HIV-1-based lentiviral vector. *J Gene Med*, *7*(6), 818-834.doi:10.1002/jgm.726
346. Cockrell, A. S., Ma, H., Fu, K., McCown, T. J., & Kafri, T. (2006). A trans-lentiviral packaging cell line for high-titer conditional self-inactivating HIV-1 vectors. *Mol Ther*, *14*(2), 276-284.doi:10.1016/j.yymthe.2005.12.015
347. Kaul, M., Yu, H., Ron, Y., & Dougherty, J. P. (1998). Regulated lentiviral packaging cell line devoid of most viral cis-acting sequences. *Virology*, *249*(1), 167-174.doi:10.1006/viro.1998.9327
348. Xu, K., Ma, H., McCown, T. J., Verma, I. M., & Kafri, T. (2001). Generation of a stable cell line producing high-titer self-inactivating lentiviral vectors. *Mol Ther*, *3*(1), 97-104.doi:10.1006/mthe.2000.0238
349. Throm, R. E., Ouma, A. A., Zhou, S., Chandrasekaran, A., Lockey, T., Greene, M., ... Gray, J. T. (2009). Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1 gene therapy by concatemeric array transfection. *Blood*, *113*(21), 5104-5110.doi:10.1182/blood-2008-11-191049

350. Stewart, H. J., Leroux-Carlucci, M. A., Sion, C. J., Mitrophanous, K. A., & Radcliffe, P. A. (2009). Development of inducible EIAV-based lentiviral vector packaging and producer cell lines. *Gene Ther*, *16*(6), 805-814.doi:10.1038/gt.2009.20
351. Pacchia, A. L., Adelson, M. E., Kaul, M., Ron, Y., & Dougherty, J. P. (2001). An inducible packaging cell system for safe, efficient lentiviral vector production in the absence of HIV-1 accessory proteins. *Virology*, *282*(1), 77-86.doi:10.1006/viro.2000.0787
352. Sparacio, S., Pfeiffer, T., Schaal, H., & Bosch, V. (2001). Generation of a flexible cell line with regulatable, high-level expression of HIV Gag/Pol particles capable of packaging HIV-derived vectors. *Mol Ther*, *3*(4), 602-612.doi:10.1006/mthe.2001.0296
353. Cox, G. A., Cole, N. M., Matsumura, K., Phelps, S. F., Hauschka, S. D., Campbell, K. P., ... Chamberlain, J. S. (1993). Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature*, *364*(6439), 725-729.doi:10.1038/364725a0
354. Kimura, E., Li, S., Gregorevic, P., Fall, B. M., & Chamberlain, J. S. (2010). Dystrophin delivery to muscles of mdx mice using lentiviral vectors leads to myogenic progenitor targeting and stable gene expression. *Mol Ther*, *18*(1), 206-213.doi:10.1038/mt.2009.253
355. Li, S., Kimura, E., Fall, B. M., Reyes, M., Angello, J. C., Welikson, R., ... Chamberlain, J. S. (2005). Stable transduction of myogenic cells with lentiviral vectors expressing a minidystrophin. *Gene Ther*, *12*(14), 1099-1108.doi:10.1038/sj.gt.3302505
356. Gregory, L. G., Waddington, S. N., Holder, M. V., Mitrophanous, K. A., Buckley, S. M., Mosley, K. L., ... Themis, M. (2004). Highly efficient EIAV-mediated in utero gene transfer and expression in the major muscle groups affected by Duchenne muscular dystrophy. *Gene Ther*, *11*(14), 1117-1125.doi:10.1038/sj.gt.3302268
357. O'Rourke, J. P., Hilaragi, H., Urban, K., Patel, M., Olsen, J. C., & Bunnell, B. A. (2003). Analysis of gene transfer and expression in skeletal muscle using enhanced EIAV lentivirus vectors. *Mol Ther*, *7*(5 Pt 1), 632-639

358. Quenneville, S. P., Chapdelaine, P., Rousseau, J., & Tremblay, J. P. (2007). Dystrophin expression in host muscle following transplantation of muscle precursor cells modified with the phiC31 integrase. *Gene Ther*, *14*(6), 514-522.doi:10.1038/sj.gt.3302887
359. Goudenege, S., Pisani, D. F., Wdziekonski, B., Di Santo, J. P., Bagnis, C., Dani, C., & Dechesne, C. A. (2009). Enhancement of myogenic and muscle repair capacities of human adipose-derived stem cells with forced expression of MyoD. *Mol Ther*, *17*(6), 1064-1072.doi:10.1038/mt.2009.67
360. Pichavant, C., & Tremblay, J. P. (2012). Generation of lentiviral vectors for use in skeletal muscle research. *Methods Mol Biol*, *798*, 285-295.doi:10.1007/978-1-61779-343-1_16
361. Quenneville, S. P., Chapdelaine, P., Rousseau, J., Beaulieu, J., Caron, N. J., Skuk, D., ... Tremblay, J. P. (2004). Nucleofection of muscle-derived stem cells and myoblasts with phiC31 integrase: stable expression of a full-length-dystrophin fusion gene by human myoblasts. *Mol Ther*, *10*(4), 679-687.doi:10.1016/j.ymthe.2004.05.034
362. Bachrach, E., Li, S., Perez, A. L., Schienda, J., Liadaki, K., Volinski, J., ... Kunkel, L. M. (2004). Systemic delivery of human microdystrophin to regenerating mouse dystrophic muscle by muscle progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(10), 3581-3586.doi:10.1073/pnas.0400373101
363. Bachrach, E., Perez, A. L., Choi, Y. H., Illigens, B. M., Jun, S. J., del Nido, P., ... Kunkel, L. M. (2006). Muscle engraftment of myogenic progenitor cells following intraarterial transplantation. *Muscle Nerve*, *34*(1), 44-52.doi:10.1002/mus.20560
364. Ikemoto, M., Fukada, S., Uezumi, A., Masuda, S., Miyoshi, H., Yamamoto, H., ... Takeda, S. (2007). Autologous transplantation of SM/C-2.6(+) satellite cells transduced with micro-dystrophin CS1 cDNA by lentiviral vector into mdx mice. *Mol Ther*, *15*(12), 2178-2185.doi:10.1038/sj.mt.6300295
365. Kimura, E., Han, J. J., Li, S., Fall, B., Ra, J., Haraguchi, M., ... Chamberlain, J. S. (2008). Cell-lineage regulated myogenesis for dystrophin replacement: a novel therapeutic approach for treatment of muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, *17*(16), 2507-2517.doi:10.1093/hmg/ddn151

366. Rowe, W. P., Huebner, R. J., Gilmore, L. K., Parrott, R. H., & Ward, T. G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med*, 84(3), 570-573
367. Smith, J. G., Silvestry, M., Lindert, S., Lu, W., Nemerow, G. R., & Stewart, P. L. (2010). Insight into the mechanisms of adenovirus capsid disassembly from studies of defensin neutralization. *PLoS Pathog*, 6(6), e1000959.doi:10.1371/journal.ppat.1000959
368. Kaufman, H. E. (2011). Adenovirus advances: new diagnostic and therapeutic options. *Curr Opin Ophthalmol*, 22(4), 290-293.doi:10.1097/ICU.0b013e3283477cb5
369. Roy, S., Medina-Jaszek, A., Wilson, M. J., Sandhu, A., Calcedo, R., Lin, J., & Wilson, J. M. (2011). Creation of a panel of vectors based on ape adenovirus isolates. *J Gene Med*, 13(1), 17-25.doi:10.1002/jgm.1530
370. Lehmberg, E., Traina, J. A., Chakel, J. A., Chang, R. J., Parkman, M., McCaman, M. T., ... Pungor, E., Jr. (1999). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the adenovirus type 5 proteome. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 732(2), 411-423
371. Stewart, P. L., Fuller, S. D., & Burnett, R. M. (1993). Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between X-ray crystallography and electron microscopy. *EMBO J*, 12(7), 2589-2599
372. Russell, W. C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, 81(Pt 11), 2573-2604
373. Davison, A. J., Benko, M., & Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol*, 84(Pt 11), 2895-2908
374. Liu, H., Jin, L., Koh, S. B., Atanasov, I., Schein, S., Wu, L., & Zhou, Z. H. (2010). Atomic structure of human adenovirus by cryo-EM reveals interactions among protein networks. *Science*, 329(5995), 1038-1043.doi:10.1126/science.1187433
375. Medina-Kauwe, L. K. (2003). Endocytosis of adenovirus and adenovirus capsid proteins. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(11), 1485-1496
376. Sharma, A., Li, X., Bangari, D. S., & Mittal, S. K. (2009). Adenovirus receptors and their implications in gene delivery. *Virus Res*, 143(2), 184-194.doi:10.1016/j.virusres.2009.02.010

377. Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., ... Finberg, R. W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science*, 275(5304), 1320-1323
378. Roelvink, P. W., Lizonova, A., Lee, J. G., Li, Y., Bergelson, J. M., Finberg, R. W., ... Wickham, T. J. (1998). The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol*, 72(10), 7909-7915
379. Bai, M., Harfe, B., & Freimuth, P. (1993). Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells. *J Virol*, 67(9), 5198-5205
380. Li, E., Brown, S. L., Stupack, D. G., Puente, X. S., Cheresch, D. A., & Nemerow, G. R. (2001). Integrin alpha(v)beta1 is an adenovirus coreceptor. *J Virol*, 75(11), 5405-5409. doi:10.1128/JVI.75.11.5405-5409.2001
381. Cuzange, A., Chroboczek, J., & Jacrot, B. (1994). The penton base of human adenovirus type 3 has the RGD motif. *Gene*, 146(2), 257-259
382. Nakano, M. Y., Boucke, K., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., & Greber, U. F. (2000). The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape to the cytosol. *J Virol*, 74(15), 7085-7095
383. Maxfield, F. R., & McGraw, T. E. (2004). Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(2), 121-132. doi:10.1038/nrm1315
384. Zhang, F., Andreassen, P., Fender, P., Geissler, E., Hernandez, J. F., & Chroboczek, J. (1999). A transfecting peptide derived from adenovirus fiber protein. *Gene Ther*, 6(2), 171-181. doi:10.1038/sj.gt.3300801
385. Seth, P. (1994). Mechanism of adenovirus-mediated endosome lysis: role of the intact adenovirus capsid structure. *Biochem Biophys Res Commun*, 205(2), 1318-1324. doi:10.1006/bbrc.1994.2809
386. Wiethoff, C. M., Wodrich, H., Gerace, L., & Nemerow, G. R. (2005). Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol*, 79(4), 1992-2000. doi:10.1128/JVI.79.4.1992-2000.2005

387. Greber, U. F., Webster, P., Weber, J., & Helenius, A. (1996). The role of the adenovirus protease on virus entry into cells. *EMBO J*, *15*(8), 1766-1777
388. Imelli, N., Ruzsics, Z., Puntener, D., Gastaldelli, M., & Greber, U. F. (2009). Genetic reconstitution of the human adenovirus type 2 temperature-sensitive 1 mutant defective in endosomal escape. *Virology*, *6*, 174. doi:10.1186/1743-422X-6-174
389. Luby-Phelps, K. (2000). Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int Rev Cytol*, *192*, 189-221
390. Greber, U. F., & Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell*, *124*(4), 741-754. doi:10.1016/j.cell.2006.02.018
391. Dohner, K., & Sodeik, B. (2005). The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, *285*, 67-108
392. Bremner, K. H., Scherer, J., Yi, J., Vershinin, M., Gross, S. P., & Vallee, R. B. (2009). Adenovirus transport via direct interaction of cytoplasmic dynein with the viral capsid hexon subunit. *Cell Host Microbe*, *6*(6), 523-535. doi:10.1016/j.chom.2009.11.006
393. Leopold, P. L., Kreitzer, G., Miyazawa, N., Rempel, S., Pfister, K. K., Rodriguez-Boulan, E., & Crystal, R. G. (2000). Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum Gene Ther*, *11*(1), 151-165. doi:10.1089/10430340050016238
394. Suomalainen, M., Nakano, M. Y., Keller, S., Boucke, K., Stidwill, R. P., & Greber, U. F. (1999). Microtubule-dependent plus- and minus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol*, *144*(4), 657-672
395. Greber, U. F., Suomalainen, M., Stidwill, R. P., Boucke, K., Ebersold, M. W., & Helenius, A. (1997). The role of the nuclear pore complex in adenovirus DNA entry. *EMBO J*, *16*(19), 5998-6007. doi:10.1093/emboj/16.19.5998
396. Trotman, L. C., Mosberger, N., Fornerod, M., Stidwill, R. P., & Greber, U. F. (2001). Import of adenovirus DNA involves the nuclear pore complex receptor CAN/Nup214 and histone H1. *Nat Cell Biol*, *3*(12), 1092-1100. doi:10.1038/ncb1201-1092
397. Sapphire, A. C., Guan, T., Schirmer, E. C., Nemerow, G. R., & Gerace, L. (2000). Nuclear import of adenovirus DNA in vitro involves the nuclear protein import pathway and hsc70. *J Biol Chem*, *275*(6), 4298-4304

398. Alba, R., Bosch, A., & Chillon, M. (2005). Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther*, *12 Suppl 1*, S18-27.doi:10.1038/sj.gt.3302612
399. Pelka, P., Ablack, J. N., Fonseca, G. J., Yousef, A. F., & Mymryk, J. S. (2008). Intrinsic structural disorder in adenovirus E1A: a viral molecular hub linking multiple diverse processes. *J Virol*, *82*(15), 7252-7263.doi:10.1128/JVI.00104-08
400. Harlow, E., Whyte, P., Franza, B. R., Jr., & Schley, C. (1986). Association of adenovirus early-region 1A proteins with cellular polypeptides. *Mol Cell Biol*, *6*(5), 1579-1589
401. Yee, S. P., & Branton, P. E. (1985). Detection of cellular proteins associated with human adenovirus type 5 early region 1A polypeptides. *Virology*, *147*(1), 142-153
402. Bandara, L. R., & La Thangue, N. B. (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature*, *351*(6326), 494-497.doi:10.1038/351494a0
403. Trimarchi, J. M., & Lees, J. A. (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3*(1), 11-20.doi:10.1038/nrm714
404. Steegenga, W. T., Riteco, N., Jochemsen, A. G., Fallaux, F. J., & Bos, J. L. (1998). The large E1B protein together with the E4orf6 protein target p53 for active degradation in adenovirus infected cells. *Oncogene*, *16*(3), 349-357.doi:10.1038/sj.onc.1201540
405. Querido, E., Blanchette, P., Yan, Q., Kamura, T., Morrison, M., Boivin, D., ... Branton, P. E. (2001). Degradation of p53 by adenovirus E4orf6 and E1B55K proteins occurs via a novel mechanism involving a Cullin-containing complex. *Genes Dev*, *15*(23), 3104-3117.doi:10.1101/gad.926401
406. Stracker, T. H., Carson, C. T., & Weitzman, M. D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11-Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature*, *418*(6895), 348-352.doi:10.1038/nature00863
407. Parker, E. J., Botting, C. H., Webster, A., & Hay, R. T. (1998). Adenovirus DNA polymerase: domain organisation and interaction with preterminal protein. *Nucleic Acids Res*, *26*(5), 1240-1247
408. Lechner, R. L., & Kelly, T. J., Jr. (1977). The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *Cell*, *12*(4), 1007-1020

409. Parks, C. L., & Shenk, T. (1997). Activation of the adenovirus major late promoter by transcription factors MAZ and Sp1. *J Virol*, *71*(12), 9600-9607
410. Wodrich, H., Guan, T., Cingolani, G., Von Seggern, D., Nemerow, G., & Gerace, L. (2003). Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *EMBO J*, *22*(23), 6245-6255.doi:10.1093/emboj/cdg614
411. Hong, S. S., Szolajska, E., Schoehn, G., Franqueville, L., Myhre, S., Lindholm, L., ... Chroboczek, J. (2005). The 100K-chaperone protein from adenovirus serotype 2 (Subgroup C) assists in trimerization and nuclear localization of hexons from subgroups C and B adenoviruses. *J Mol Biol*, *352*(1), 125-138.doi:10.1016/j.jmb.2005.06.070
412. Ostapchuk, P., Yang, J., Auffarth, E., & Hearing, P. (2005). Functional interaction of the adenovirus IVa2 protein with adenovirus type 5 packaging sequences. *J Virol*, *79*(5), 2831-2838.doi:10.1128/JVI.79.5.2831-2838.2005
413. Perez-Romero, P., Tyler, R. E., Abend, J. R., Dus, M., & Imperiale, M. J. (2005). Analysis of the interaction of the adenovirus L1 52/55-kilodalton and IVa2 proteins with the packaging sequence in vivo and in vitro. *J Virol*, *79*(4), 2366-2374.doi:10.1128/JVI.79.4.2366-2374.2005
414. Wu, K., Orozco, D., & Hearing, P. (2012). The adenovirus L4-22K protein is multifunctional and is an integral component of crucial aspects of infection. *J Virol*, *86*(19), 10474-10483.doi:10.1128/JVI.01463-12
415. Ostapchuk, P., & Hearing, P. (2005). Control of adenovirus packaging. *J Cell Biochem*, *96*(1), 25-35.doi:10.1002/jcb.20523
416. Ruzindana-Umunyana, A., Imbeault, L., & Weber, J. M. (2002). Substrate specificity of adenovirus protease. *Virus Res*, *89*(1), 41-52
417. Perez-Berna, A. J., Marabini, R., Scheres, S. H., Menendez-Conejero, R., Dmitriev, I. P., Curiel, D. T., ... San Martin, C. (2009). Structure and uncoating of immature adenovirus. *J Mol Biol*, *392*(2), 547-557.doi:10.1016/j.jmb.2009.06.057
418. Dobbstein, M., Roth, J., Kimberly, W. T., Levine, A. J., & Shenk, T. (1997). Nuclear export of the E1B 55-kDa and E4 34-kDa adenoviral oncoproteins mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J*, *16*(14), 4276-4284

419. Dosch, T., Horn, F., Schneider, G., Kratzer, F., Dobner, T., Hauber, J., & Stauber, R. H. (2001). The adenovirus type 5 E1B-55K oncoprotein actively shuttles in virus-infected cells, whereas transport of E4orf6 is mediated by a CRM1-independent mechanism. *J Virol*, *75*(12), 5677-5683. doi:10.1128/JVI.75.12.5677-5683.2001
420. Gabler, S., Schutt, H., Groitl, P., Wolf, H., Shenk, T., & Dobner, T. (1998). E1B 55-kilodalton-associated protein: a cellular protein with RNA-binding activity implicated in nucleocytoplasmic transport of adenovirus and cellular mRNAs. *J Virol*, *72*(10), 7960-7971
421. Tal, J., Craig, E. A., & Raskas, H. J. (1975). Sequence relationships between adenovirus 2 early RNA and viral RNA size classes synthesized at 18 hours after infection. *J Virol*, *15*(1), 137-144
422. Cuesta, R., Xi, Q., & Schneider, R. J. (2000). Adenovirus-specific translation by displacement of kinase Mnk1 from cap-initiation complex eIF4F. *EMBO J*, *19*(13), 3465-3474. doi:10.1093/emboj/19.13.3465
423. Cuesta, R., Xi, Q., & Schneider, R. J. (2004). Structural basis for competitive inhibition of eIF4G-Mnk1 interaction by the adenovirus 100-kilodalton protein. *J Virol*, *78*(14), 7707-7716. doi:10.1128/JVI.78.14.7707-7716.2004
424. Yueh, A., & Schneider, R. J. (1996). Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev*, *10*(12), 1557-1567
425. Xi, Q., Cuesta, R., & Schneider, R. J. (2004). Tethering of eIF4G to adenoviral mRNAs by viral 100k protein drives ribosome shunting. *Genes Dev*, *18*(16), 1997-2009. doi:10.1101/gad.1212504
426. Zhang, Y., & Schneider, R. J. (1994). Adenovirus inhibition of cell translation facilitates release of virus particles and enhances degradation of the cytokeratin network. *J Virol*, *68*(4), 2544-2555
427. Doronin, K., Toth, K., Kuppaswamy, M., Krajcsi, P., Tollefson, A. E., & Wold, W. S. (2003). Overexpression of the ADP (E3-11.6K) protein increases cell lysis and spread of adenovirus. *Virology*, *305*(2), 378-387
428. Tollefson, A. E., Scaria, A., Hermiston, T. W., Ryerse, J. S., Wold, L. J., & Wold, W. S. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of

- infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J Virol*, 70(4), 2296-2306
429. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36(1), 59-74
430. Louis, N., Eveleigh, C., & Graham, F. L. (1997). Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology*, 233(2), 423-429.doi:10.1006/viro.1997.8597
431. BRMAC. (2000). BRMAC MEETING #30: Adenovirus Titer Measurements and RCA Levels. Repéré le 27 décembre 2012 à http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/01/briefing/3768b1_01.pdf
432. Marzio, G., Kerkvliet, E., Bogaards, J. A., Koelewijn, S., De Groot, A., Gijsbers, L., ... Goudsmit, J. (2007). A replication-competent adenovirus assay for E1-deleted Ad35 vectors produced in PER.C6 cells. *Vaccine*, 25(12), 2228-2237.doi:10.1016/j.vaccine.2006.12.011
433. Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., ... Hoeben, R. C. (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther*, 9(13), 1909-1917.doi:10.1089/hum.1998.9.13-1909
434. Suzuki, T., Sasaki, T., Yano, K., Sakurai, F., Kawabata, K., Kondoh, M., ... Mizuguchi, H. (2011). Development of a recombinant adenovirus vector production system free of replication-competent adenovirus by utilizing a packaging size limit of the viral genome. *Virus Res*, 158(1-2), 154-160.doi:10.1016/j.virusres.2011.03.026
435. Amalfitano, A., Hauser, M. A., Hu, H., Serra, D., Begy, C. R., & Chamberlain, J. S. (1998). Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol*, 72(2), 926-933
436. Raper, S. E., Yudkoff, M., Chirmule, N., Gao, G. P., Nunes, F., Haskal, Z. J., ... Batshaw, M. L. (2002). A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum Gene Ther*, 13(1), 163-175.doi:10.1089/10430340152712719

437. Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., ... Batshaw, M. L. (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab*, *80*(1-2), 148-158
438. Raper, S. E., Haskal, Z. J., Ye, X., Pugh, C., Furth, E. E., Gao, G. P., & Wilson, J. M. (1998). Selective gene transfer into the liver of non-human primates with E1-deleted, E2A-defective, or E1-E4 deleted recombinant adenoviruses. *Hum Gene Ther*, *9*(5), 671-679.doi:10.1089/hum.1998.9.5-671
439. Nunes, F. A., Furth, E. E., Wilson, J. M., & Raper, S. E. (1999). Gene transfer into the liver of nonhuman primates with E1-deleted recombinant adenoviral vectors: safety of readministration. *Hum Gene Ther*, *10*(15), 2515-2526.doi:10.1089/10430349950016852
440. Alemany, R., Dai, Y., Lou, Y. C., Sethi, E., Prokopenko, E., Josephs, S. F., & Zhang, W. W. (1997). Complementation of helper-dependent adenoviral vectors: size effects and titer fluctuations. *J Virol Methods*, *68*(2), 147-159
441. Bett, A. J., Prevec, L., & Graham, F. L. (1993). Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol*, *67*(10), 5911-5921
442. Parks, R. J., & Graham, F. L. (1997). A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *J Virol*, *71*(4), 3293-3298
443. Parks, R. J., Bramson, J. L., Wan, Y., Addison, C. L., & Graham, F. L. (1999). Effects of stuffer DNA on transgene expression from helper-dependent adenovirus vectors. *J Virol*, *73*(10), 8027-8034
444. Ross, P. J., Kennedy, M. A., & Parks, R. J. (2009). Host cell detection of noncoding stuffer DNA contained in helper-dependent adenovirus vectors leads to epigenetic repression of transgene expression. *J Virol*, *83*(17), 8409-8417.doi:10.1128/JVI.00796-09
445. Bauer, A. P., Leikam, D., Krinner, S., Notka, F., Ludwig, C., Langst, G., & Wagner, R. (2010). The impact of intragenic CpG content on gene expression. *Nucleic Acids Res*, *38*(12), 3891-3908.doi:10.1093/nar/gkq115

446. Schiedner, G., Hertel, S., Johnston, M., Biermann, V., Dries, V., & Kochanek, S. (2002). Variables affecting in vivo performance of high-capacity adenovirus vectors. *J Virol*, 76(4), 1600-1609
447. Sandig, V., Youil, R., Bett, A. J., Franlin, L. L., Oshima, M., Maione, D., ... Caskey, C. T. (2000). Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(3), 1002-1007
448. Parks, R. J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M. A., & Graham, F. L. (1996). A helper-dependent adenovirus vector system: removal of helper virus by Cre-mediated excision of the viral packaging signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(24), 13565-13570
449. Ng, P., Beauchamp, C., Eveleigh, C., Parks, R., & Graham, F. L. (2001). Development of a FLP/frt system for generating helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther*, 3(5 Pt 1), 809-815.doi:10.1006/mthe.2001.0323
450. Umana, P., Gerdes, C. A., Stone, D., Davis, J. R., Ward, D., Castro, M. G., & Lowenstein, P. R. (2001). Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol*, 19(6), 582-585.doi:10.1038/89349
451. Alba, R., Hearing, P., Bosch, A., & Chillon, M. (2007). Differential amplification of adenovirus vectors by flanking the packaging signal with attB/attP-PhiC31 sequences: implications for helper-dependent adenovirus production. *Virology*, 367(1), 51-58.doi:10.1016/j.virol.2007.05.014
452. Ng, P., Eveleigh, C., Cummings, D., & Graham, F. L. (2002). Cre levels limit packaging signal excision efficiency in the Cre/loxP helper-dependent adenoviral vector system. *J Virol*, 76(9), 4181-4189
453. Sakhuja, K., Reddy, P. S., Ganesh, S., Cantaniag, F., Pattison, S., Limbach, P., ... Connelly, S. (2003). Optimization of the generation and propagation of gutless adenoviral vectors. *Hum Gene Ther*, 14(3), 243-254.doi:10.1089/10430340360535797
454. Palmer, D., & Ng, P. (2003). Improved system for helper-dependent adenoviral vector production. *Mol Ther*, 8(5), 846-852

455. Zhou, H. S., Zhao, T., Rao, X. M., & Beaudet, A. L. (2002). Production of helper-dependent adenovirus vector relies on helper virus structure and complementing. *J Gene Med*, 4(5), 498-509.doi:10.1002/jgm.301
456. Barcia, C., Jimenez-Dalmaroni, M., Kroeger, K. M., Puntel, M., Rapaport, A. J., Larocque, D., ... Lowenstein, P. R. (2007). One-year expression from high-capacity adenoviral vectors in the brains of animals with pre-existing anti-adenoviral immunity: clinical implications. *Mol Ther*, 15(12), 2154-2163.doi:10.1038/sj.mt.6300305
457. Brunetti-Pierri, N., & Ng, P. (2008). Progress and prospects: gene therapy for genetic diseases with helper-dependent adenoviral vectors. *Gene Ther*, 15(8), 553-560.doi:10.1038/gt.2008.14
458. Campeau, P., Chapdelaine, P., Seigneurin-Venin, S., Massie, B., & Tremblay, J. P. (2001). Transfection of large plasmids in primary human myoblasts. *Gene Ther*, 8(18), 1387-1394.doi:10.1038/sj.gt.3301532
459. Ou, M., Kim, T. I., Yockman, J. W., Borden, B. A., Bull, D. A., & Kim, S. W. (2010). Polymer transfected primary myoblasts mediated efficient gene expression and angiogenic proliferation. *J Control Release*, 142(1), 61-69.doi:10.1016/j.jconrel.2009.09.021
460. Goncalves, M. A., Holkers, M., Cudre-Mauroux, C., van Nierop, G. P., Knaan-Shanzer, S., van der Velde, I., ... de Vries, A. A. (2006). Transduction of myogenic cells by retargeted dual high-capacity hybrid viral vectors: robust dystrophin synthesis in duchenne muscular dystrophy muscle cells. *Mol Ther*, 13(5), 976-986.doi:10.1016/j.ymthe.2005.11.018
461. Kochanek, S., Clemens, P. R., Mitani, K., Chen, H. H., Chan, S., & Caskey, C. T. (1996). A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length dystrophin and beta-galactosidase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(12), 5731-5736
462. Acsadi, G., Lochmuller, H., Jani, A., Huard, J., Massie, B., Prescott, S., ... Karpati, G. (1996). Dystrophin expression in muscles of mdx mice after adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther*, 7(2), 129-140.doi:10.1089/hum.1996.7.2-129

463. Yan, J., Tang, G. L., Wang, R., & Messina, L. M. (2005). Optimization of adenovirus-mediated endothelial nitric oxide synthase delivery in rat hindlimb ischemia. *Gene Ther*, *12*(22), 1640-1650.doi:10.1038/sj.gt.3302563
464. Bilbao, R., Reay, D. P., Wu, E., Zheng, H., Biermann, V., Kochanek, S., & Clemens, P. R. (2005). Comparison of high-capacity and first-generation adenoviral vector gene delivery to murine muscle in utero. *Gene Ther*, *12*(1), 39-47.doi:10.1038/sj.gt.3302392
465. Anderson, J. E., Garrett, K., Moor, A., McIntosh, L., & Penner, K. (1998). Dystrophy and myogenesis in mdx diaphragm muscle. *Muscle Nerve*, *21*(9), 1153-1165
466. Matecki, S., Dudley, R. W., Divangahi, M., Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Karpati, G., & Petrof, B. J. (2004). Therapeutic gene transfer to dystrophic diaphragm by an adenoviral vector deleted of all viral genes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, *287*(3), L569-576.doi:10.1152/ajplung.00117.2004
467. Dudley, R. W., Lu, Y., Gilbert, R., Matecki, S., Nalbantoglu, J., Petrof, B. J., & Karpati, G. (2004). Sustained improvement of muscle function one year after full-length dystrophin gene transfer into mdx mice by a gutted helper-dependent adenoviral vector. *Hum Gene Ther*, *15*(2), 145-156.doi:10.1089/104303404772679959
468. Gilbert, R., Dudley, R. W., Liu, A. B., Petrof, B. J., Nalbantoglu, J., & Karpati, G. (2003). Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (gutted) adenovirus-encoding murine dystrophin. *Hum Mol Genet*, *12*(11), 1287-1299
469. Deol, J. R., Danialou, G., Larochele, N., Bourget, M., Moon, J. S., Liu, A. B., ... Karpati, G. (2007). Successful compensation for dystrophin deficiency by a helper-dependent adenovirus expressing full-length utrophin. *Mol Ther*, *15*(10), 1767-1774.doi:10.1038/sj.mt.6300260
470. Feero, W. G., Rosenblatt, J. D., Huard, J., Watkins, S. C., Epperly, M., Clemens, P. R., ... Hoffman, E. P. (1997). Viral gene delivery to skeletal muscle: insights on maturation-dependent loss of fiber infectivity for adenovirus and herpes simplex type 1 viral vectors. *Hum Gene Ther*, *8*(4), 371-380.doi:10.1089/hum.1997.8.4-371
471. Bouri, K., Feero, W. G., Myerburg, M. M., Wickham, T. J., Kovesdi, I., Hoffman, E. P., & Clemens, P. R. (1999). Polylysine modification of adenoviral fiber protein enhances

- muscle cell transduction. *Hum Gene Ther*, 10(10), 1633-1640.doi:10.1089/10430349950017635
472. Cho, W. K., Ebihara, S., Nalbantoglu, J., Gilbert, R., Massie, B., Holland, P., ... Petrof, B. J. (2000). Modulation of Starling forces and muscle fiber maturity permits adenovirus-mediated gene transfer to adult dystrophic (mdx) mice by the intravascular route. *Hum Gene Ther*, 11(5), 701-714.doi:10.1089/10430340050015608
473. Nalbantoglu, J., Larochele, N., Wolf, E., Karpati, G., Lochmuller, H., & Holland, P. C. (2001). Muscle-specific overexpression of the adenovirus primary receptor CAR overcomes low efficiency of gene transfer to mature skeletal muscle. *J Virol*, 75(9), 4276-4282.doi:10.1128/JVI.75.9.4276-4282.2001
474. Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpati, G., & Holland, P. C. (1999). Expression of the primary coxsackie and adenovirus receptor is downregulated during skeletal muscle maturation and limits the efficacy of adenovirus-mediated gene delivery to muscle cells. *Hum Gene Ther*, 10(6), 1009-1019.doi:10.1089/10430349950018409
475. Bramson, J. L., Grinshtein, N., Meulenbroek, R. A., Lunde, J., Kottachchi, D., Lorimer, I. A., ... Parks, R. J. (2004). Helper-dependent adenoviral vectors containing modified fiber for improved transduction of developing and mature muscle cells. *Hum Gene Ther*, 15(2), 179-188.doi:10.1089/104303404772679986
476. Uchida, Y., Maeda, Y., Kimura, E., Yamashita, S., Nishida, Y., Arima, T., ... Uchino, M. (2005). Effective repetitive dystrophin gene transfer into skeletal muscle of adult mdx mice using a helper-dependent adenovirus vector expressing the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) and dystrophin. *J Gene Med*, 7(8), 1010-1022.doi:10.1002/jgm.745
477. Yang, L., Lochmuller, H., Luo, J., Massie, B., Nalbantoglu, J., Karpati, G., & Petrof, B. J. (1998). Adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer improves muscle strength in adult dystrophic (MDX) mice. *Gene Ther*, 5(3), 369-379.doi:10.1038/sj.gt.3300600
478. Neri, M., Torelli, S., Brown, S., Ugo, I., Sabatelli, P., Merlini, L., ... Muntoni, F. (2007). Dystrophin levels as low as 30% are sufficient to avoid muscular dystrophy in the human. *Neuromuscul Disord*, 17(11-12), 913-918.doi:10.1016/j.nmd.2007.07.005

479. Ahmad, A., Brinson, M., Hodges, B. L., Chamberlain, J. S., & Amalfitano, A. (2000). Mdx mice inducibly expressing dystrophin provide insights into the potential of gene therapy for duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet*, *9*(17), 2507-2515
480. Ghahramani Seno, M. M., Graham, I. R., Athanasopoulos, T., Trollet, C., Pohlschmidt, M., Crompton, M. R., & Dickson, G. (2008). RNAi-mediated knockdown of dystrophin expression in adult mice does not lead to overt muscular dystrophy pathology. *Hum Mol Genet*, *17*(17), 2622-2632.doi:10.1093/hmg/ddn162
481. Rauschhuber, C., Noske, N., & Ehrhardt, A. (2012). New insights into stability of recombinant adenovirus vector genomes in mammalian cells. *Eur J Cell Biol*, *91*(1), 2-9.doi:10.1016/j.ejcb.2011.01.006
482. Li, D., Bareja, A., Judge, L., Yue, Y., Lai, Y., Fairclough, R., ... Duan, D. (2010). Sarcolemmal nNOS anchoring reveals a qualitative difference between dystrophin and utrophin. *J Cell Sci*, *123*(Pt 12), 2008-2013.doi:10.1242/jcs.064808
483. Appledorn, D. M., Patial, S., McBride, A., Godbehere, S., Van Rooijen, N., Parameswaran, N., & Amalfitano, A. (2008). Adenovirus vector-induced innate inflammatory mediators, MAPK signaling, as well as adaptive immune responses are dependent upon both TLR2 and TLR9 in vivo. *J Immunol*, *181*(3), 2134-2144
484. Doronin, K., Flatt, J. W., Di Paolo, N. C., Khare, R., Kalyuzhniy, O., Acchione, M., ... Shayakhmetov, D. M. (2012). Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science*, *338*(6108), 795-798.doi:10.1126/science.1226625
485. Latz, E., Schoenemeyer, A., Visintin, A., Fitzgerald, K. A., Monks, B. G., Knetter, C. F., ... Golenbock, D. T. (2004). TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol*, *5*(2), 190-198.doi:10.1038/ni1028
486. Rutz, M., Metzger, J., Gellert, T., Luppa, P., Lipford, G. B., Wagner, H., & Bauer, S. (2004). Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol*, *34*(9), 2541-2550.doi:10.1002/eji.200425218
487. Cerullo, V., Seiler, M. P., Mane, V., Brunetti-Pierri, N., Clarke, C., Bertin, T. K., ... Lee, B. (2007). Toll-like receptor 9 triggers an innate immune response to helper-dependent adenoviral vectors. *Mol Ther*, *15*(2), 378-385.doi:10.1038/sj.mt.6300031

488. Wienhues, U., & Doerfler, W. (1985). Lack of evidence for methylation of parental and newly synthesized adenovirus type 2 DNA in productive infections. *J Virol*, *56*(1), 320-324
489. Kaisho, T. (2012). Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine*.doi:10.1016/j.vaccine.2012.10.043
490. Muruve, D. A., Cotter, M. J., Zaiss, A. K., White, L. R., Liu, Q., Chan, T., ... Parks, R. J. (2004). Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *J Virol*, *78*(11), 5966-5972.doi:10.1128/JVI.78.11.5966-5972.2004
491. Brunetti-Pierri, N., Palmer, D. J., Beaudet, A. L., Carey, K. D., Finegold, M., & Ng, P. (2004). Acute toxicity after high-dose systemic injection of helper-dependent adenoviral vectors into nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, *15*(1), 35-46.doi:10.1089/10430340460732445
492. Suzuki, M., Cela, R., Bertin, T. K., Sule, G., Cerullo, V., Rodgers, J. R., & Lee, B. (2011). NOD2 signaling contributes to the innate immune response against helper-dependent adenovirus vectors independently of MyD88 in vivo. *Hum Gene Ther*, *22*(9), 1071-1082.doi:10.1089/hum.2011.002
493. Hartigan-O'Connor, D., Kirk, C. J., Crawford, R., Mule, J. J., & Chamberlain, J. S. (2001). Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol Ther*, *4*(6), 525-533.doi:10.1006/mthe.2001.0496
494. Cichon, G., Boeckh-Herwig, S., Schmidt, H. H., Wehnes, E., Muller, T., Pring-Akerblom, P., & Burger, R. (2001). Complement activation by recombinant adenoviruses. *Gene Ther*, *8*(23), 1794-1800.doi:10.1038/sj.gt.3301611
495. Carlisle, R. C., Benjamin, R., Briggs, S. S., Sumner-Jones, S., McIntosh, J., Gill, D., ... Fisher, K. D. (2008). Coating of adeno-associated virus with reactive polymers can ablate virus tropism, enable retargeting and provide resistance to neutralising antisera. *J Gene Med*, *10*(4), 400-411.doi:10.1002/jgm.1161
496. Fisher, K. D., Stallwood, Y., Green, N. K., Ulbrich, K., Mautner, V., & Seymour, L. W. (2001). Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene Ther*, *8*(5), 341-348.doi:10.1038/sj.gt.3301389

497. Gilbert, R., Liu, A., Petrof, B., Nalbantoglu, J., & Karpati, G. (2002). Improved performance of a fully gutted adenovirus vector containing two full-length dystrophin cDNAs regulated by a strong promoter. *Mol Ther*, 6(4), 501-509
498. Lochmuller, H., Petrof, B. J., Pari, G., Larochelle, N., Dodelet, V., Wang, Q., ... Karpati, G. (1996). Transient immunosuppression by FK506 permits a sustained high-level dystrophin expression after adenovirus-mediated dystrophin minigene transfer to skeletal muscles of adult dystrophic (mdx) mice. *Gene Ther*, 3(8), 706-716
499. Jiang, Z. L., Reay, D., Kreppel, F., Gambotto, A., Feingold, E., Kochanek, S., ... Clemens, P. R. (2001). Local high-capacity adenovirus-mediated mCTLA4Ig and mCD40Ig expression prolongs recombinant gene expression in skeletal muscle. *Mol Ther*, 3(6), 892-900.doi:10.1006/mthe.2001.0331
500. Jiang, Z., Schiedner, G., van Rooijen, N., Liu, C. C., Kochanek, S., & Clemens, P. R. (2004). Sustained muscle expression of dystrophin from a high-capacity adenoviral vector with systemic gene transfer of T cell costimulatory blockade. *Mol Ther*, 10(4), 688-696.doi:10.1016/j.ymthe.2004.07.020
501. Weiden, M. D., & Ginsberg, H. S. (1994). Deletion of the E4 region of the genome produces adenovirus DNA concatemers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(1), 153-157
502. Jager, L., & Ehrhardt, A. (2009). Persistence of high-capacity adenoviral vectors as replication-defective monomeric genomes in vitro and in murine liver. *Hum Gene Ther*, 20(8), 883-896.doi:10.1089/hum.2009.020
503. Walkiewicz, M. P., Morral, N., & Engel, D. A. (2009). Accurate single-day titration of adenovirus vectors based on equivalence of protein VII nuclear dots and infectious particles. *J Virol Methods*, 159(2), 251-258.doi:10.1016/j.jviromet.2009.04.010
504. Chen, J., Morral, N., & Engel, D. A. (2007). Transcription releases protein VII from adenovirus chromatin. *Virology*, 369(2), 411-422.doi:10.1016/j.virol.2007.08.012
505. Ross, P. J., Kennedy, M. A., Christou, C., Risco Quiroz, M., Poulin, K. L., & Parks, R. J. (2011). Assembly of helper-dependent adenovirus DNA into chromatin promotes efficient gene expression. *J Virol*, 85(8), 3950-3958.doi:10.1128/JVI.01787-10

506. Schaack, J., Ho, W. Y., Freimuth, P., & Shenk, T. (1990). Adenovirus terminal protein mediates both nuclear matrix association and efficient transcription of adenovirus DNA. *Genes Dev*, 4(7), 1197-1208
507. Ehrhardt, A., Xu, H., & Kay, M. A. (2003). Episomal persistence of recombinant adenoviral vector genomes during the cell cycle in vivo. *J Virol*, 77(13), 7689-7695
508. Kreppel, F., & Kochanek, S. (2004). Long-term transgene expression in proliferating cells mediated by episomally maintained high-capacity adenovirus vectors. *J Virol*, 78(1), 9-22
509. Raab, J. R., & Kamakaka, R. T. (2010). Insulators and promoters: closer than we think. *Nat Rev Genet*, 11(6), 439-446.doi:10.1038/nrg2765
510. Macarthur, C. C., Xue, H., Van Hoof, D., Lieu, P. T., Dudas, M., Fontes, A., ... Liu, Y. (2012). Chromatin insulator elements block transgene silencing in engineered human embryonic stem cell lines at a defined chromosome 13 locus. *Stem Cells Dev*, 21(2), 191-205.doi:10.1089/scd.2011.0163
511. Gaszner, M., & Felsenfeld, G. (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet*, 7(9), 703-713.doi:10.1038/nrg1925
512. Zhang, F., Frost, A. R., Blundell, M. P., Bales, O., Antoniou, M. N., & Thrasher, A. J. (2010). A ubiquitous chromatin opening element (UCOE) confers resistance to DNA methylation-mediated silencing of lentiviral vectors. *Mol Ther*, 18(9), 1640-1649.doi:10.1038/mt.2010.132
513. Lindahl Allen, M., & Antoniou, M. (2007). Correlation of DNA methylation with histone modifications across the HNRPA2B1-CBX3 ubiquitously-acting chromatin open element (UCOE). *Epigenetics*, 2(4), 227-236
514. Williams, S., Mustoe, T., Mulcahy, T., Griffiths, M., Simpson, D., Antoniou, M., ... Crombie, R. (2005). CpG-island fragments from the HNRPA2B1/CBX3 genomic locus reduce silencing and enhance transgene expression from the hCMV promoter/enhancer in mammalian cells. *BMC Biotechnol*, 5, 17.doi:10.1186/1472-6750-5-17
515. de Poorter, J. J., Lipinski, K. S., Nelissen, R. G., Huizinga, T. W., & Hoeben, R. C. (2007). Optimization of short-term transgene expression by sodium butyrate and

- ubiquitous chromatin opening elements (UCOEs). *J Gene Med*, 9(8), 639-648.doi:10.1002/jgm.1057
516. Brown, B. D., Cantore, A., Annoni, A., Sergi, L. S., Lombardo, A., Della Valle, P., ... Naldini, L. (2007). A microRNA-regulated lentiviral vector mediates stable correction of hemophilia B mice. *Blood*, 110(13), 4144-4152.doi:10.1182/blood-2007-03-078493
517. Sun, T. Q., Livanos, E., & Vos, J. M. (1996). Engineering a mini-herpesvirus as a general strategy to transduce up to 180 kb of functional self-replicating human mini-chromosomes. *Gene Ther*, 3(12), 1081-1088
518. Wohlgemuth, J. G., Kang, S. H., Bulboaca, G. H., Nawotka, K. A., & Calos, M. P. (1996). Long-term gene expression from autonomously replicating vectors in mammalian cells. *Gene Ther*, 3(6), 503-512
519. Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., ... Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature*, 375(6533), 685-688.doi:10.1038/375685a0
520. Lu, J., Murakami, M., Verma, S. C., Cai, Q., Haldar, S., Kaul, R., ... Robertson, E. S. (2011). Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology*, 410(1), 64-75.doi:10.1016/j.virol.2010.10.029
521. Heng, H. H., Goetze, S., Ye, C. J., Liu, G., Stevens, J. B., Bremer, S. W., ... Krawetz, S. A. (2004). Chromatin loops are selectively anchored using scaffold/matrix-attachment regions. *J Cell Sci*, 117(Pt 7), 999-1008.doi:10.1242/jcs.00976
522. Wang, T. Y., Han, Z. M., Chai, Y. R., & Zhang, J. H. (2010). A mini review of MAR-binding proteins. *Mol Biol Rep*, 37(7), 3553-3560.doi:10.1007/s11033-010-0003-8
523. Jenke, A. C., Stehle, I. M., Herrmann, F., Eisenberger, T., Baiker, A., Bode, J., ... Lipps, H. J. (2004). Nuclear scaffold/matrix attached region modules linked to a transcription unit are sufficient for replication and maintenance of a mammalian episome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), 11322-11327.doi:10.1073/pnas.0401355101
524. Argyros, O., Wong, S. P., Niceta, M., Waddington, S. N., Howe, S. J., Coutelle, C., ... Harbottle, R. P. (2008). Persistent episomal transgene expression in liver following

- delivery of a scaffold/matrix attachment region containing non-viral vector. *Gene Ther*, 15(24), 1593-1605.doi:10.1038/gt.2008.113
525. Jenke, A. C., Scinteie, M. F., Stehle, I. M., & Lipps, H. J. (2004). Expression of a transgene encoded on a non-viral episomal vector is not subject to epigenetic silencing by cytosine methylation. *Mol Biol Rep*, 31(2), 85-90
526. Phi-Van, L., von Kries, J. P., Ostertag, W., & Stratling, W. H. (1990). The chicken lysozyme 5' matrix attachment region increases transcription from a heterologous promoter in heterologous cells and dampens position effects on the expression of transfected genes. *Mol Cell Biol*, 10(5), 2302-2307
527. Betz, A. G., Milstein, C., Gonzalez-Fernandez, A., Pannell, R., Larson, T., & Neuberger, M. S. (1994). Elements regulating somatic hypermutation of an immunoglobulin kappa gene: critical role for the intron enhancer/matrix attachment region. *Cell*, 77(2), 239-248
528. Ehrhardt, A., & Kay, M. A. (2002). A new adenoviral helper-dependent vector results in long-term therapeutic levels of human coagulation factor IX at low doses in vivo. *Blood*, 99(11), 3923-3930
529. Hoshiya, H., Kazuki, Y., Abe, S., Takiguchi, M., Kajitani, N., Watanabe, Y., ... Oshimura, M. (2009). A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4 Mb entire human dystrophin gene. *Mol Ther*, 17(2), 309-317.doi:10.1038/mt.2008.253
530. Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., ... Oshimura, M. (2010). Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther*, 18(2), 386-393.doi:10.1038/mt.2009.274
531. Doherty, A. M., & Fisher, E. M. (2003). Microcell-mediated chromosome transfer (MMCT): small cells with huge potential. *Mamm Genome*, 14(9), 583-592
532. Harui, A., Suzuki, S., Kochanek, S., & Mitani, K. (1999). Frequency and stability of chromosomal integration of adenovirus vectors. *J Virol*, 73(7), 6141-6146
533. Hillgenberg, M., Tonnies, H., & Strauss, M. (2001). Chromosomal integration pattern of a helper-dependent minimal adenovirus vector with a selectable marker inserted into a

- 27.4-kilobase genomic stuffer. *J Virol*, 75(20), 9896-9908.doi:10.1128/JVI.75.20.9896-9908.2001
534. Ohbayashi, F., Balamotis, M. A., Kishimoto, A., Aizawa, E., Diaz, A., Hasty, P., ... Mitani, K. (2005). Correction of chromosomal mutation and random integration in embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(38), 13628-13633.doi:10.1073/pnas.0506598102
535. Stephen, S. L., Sivanandam, V. G., & Kochanek, S. (2008). Homologous and heterologous recombination between adenovirus vector DNA and chromosomal DNA. *J Gene Med*, 10(11), 1176-1189.doi:10.1002/jgm.1246
536. Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., ... Mitani, K. (2008). Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(37), 13781-13786.doi:10.1073/pnas.0806976105
537. Isman, O., Roberts, M. L., Morgan, J. E., Graham, I. R., Goldring, K., Lawrence-Watt, D. J., ... Dickson, G. (2008). Adenovirus-based targeting in myoblasts is hampered by nonhomologous vector integration. *Hum Gene Ther*, 19(10), 1000-1008.doi:10.1089/hum.2008.063
538. Stephen, S. L., Montini, E., Sivanandam, V. G., Al-Dhalimy, M., Kestler, H. A., Finegold, M., ... Kochanek, S. (2010). Chromosomal integration of adenoviral vector DNA in vivo. *J Virol*, 84(19), 9987-9994.doi:10.1128/JVI.00751-10
539. Tsukui, T., Kanegae, Y., Saito, I., & Toyoda, Y. (1996). Transgenesis by adenovirus-mediated gene transfer into mouse zona-free eggs. *Nat Biotechnol*, 14(8), 982-985.doi:10.1038/nbt0896-982
540. Zeng, M., Cerniglia, G. J., Eck, S. L., & Stevens, C. W. (1997). High-efficiency stable gene transfer of adenovirus into mammalian cells using ionizing radiation. *Hum Gene Ther*, 8(9), 1025-1032.doi:10.1089/hum.1997.8.9-1025
541. Sova, P., Wang, H., Bomsztyk, K., Stamatoyannopoulos, G., & Lieber, A. (2008). Role of chromatin structure in integration of helper-dependent adenoviral vectors containing the beta-globin locus control region. *Hum Gene Ther*, 19(2), 153-166.doi:10.1089/hum.2007.091

542. Hatfield, L., & Hearing, P. (1991). Redundant elements in the adenovirus type 5 inverted terminal repeat promote bidirectional transcription in vitro and are important for virus growth in vivo. *Virology*, *184*(1), 265-276
543. Miralles, V. J., Cortes, P., Stone, N., & Reinberg, D. (1989). The adenovirus inverted terminal repeat functions as an enhancer in a cell-free system. *J Biol Chem*, *264*(18), 10763-10772
544. Ooyama, S., Imai, T., Hanaka, S., & Handa, H. (1989). Transcription in the reverse orientation at either terminus of the adenovirus type 5 genome. *EMBO J*, *8*(3), 863-868
545. Liu, G. H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, M., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2011). Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. *Cell Stem Cell*, *8*(6), 688-694.doi:10.1016/j.stem.2011.04.019
546. Goncalves, M. A., van Nierop, G. P., Tijssen, M. R., Lefevre, P., Knaan-Shanzer, S., van der Velde, I., ... de Vries, A. A. (2005). Transfer of the full-length dystrophin-coding sequence into muscle cells by a dual high-capacity hybrid viral vector with site-specific integration ability. *J Virol*, *79*(5), 3146-3162.doi:10.1128/JVI.79.5.3146-3162.2005
547. Gaggar, A., Shayakhmetov, D. M., & Lieber, A. (2003). CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med*, *9*(11), 1408-1412.doi:10.1038/nm952
548. Wang, H., & Lieber, A. (2006). A helper-dependent capsid-modified adenovirus vector expressing adeno-associated virus rep78 mediates site-specific integration of a 27-kilobase transgene cassette. *J Virol*, *80*(23), 11699-11709.doi:10.1128/JVI.00779-06
549. Recchia, A., Perani, L., Sartori, D., Olgiati, C., & Mavilio, F. (2004). Site-specific integration of functional transgenes into the human genome by adeno/AAV hybrid vectors. *Mol Ther*, *10*(4), 660-670.doi:10.1016/j.ymthe.2004.07.003
550. Schmidt, M., Afione, S., & Kotin, R. M. (2000). Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *J Virol*, *74*(20), 9441-9450
551. Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(3), 1156-1160

552. Rahman, S. H., Maeder, M. L., Joung, J. K., & Cathomen, T. (2011). Zinc-finger nucleases for somatic gene therapy: the next frontier. *Hum Gene Ther*, 22(8), 925-933.doi:10.1089/hum.2011.087
553. Rouet, P., Smih, F., & Jasin, M. (1994). Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(13), 6064-6068
554. Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B., & Nicolas, J. F. (1995). Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 15(4), 1968-1973
555. Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R. C., ... Jaenisch, R. (2009). Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 27(9), 851-857.doi:10.1038/nbt.1562
556. Zou, J., Maeder, M. L., Mali, P., Pruetz-Miller, S. M., Thibodeau-Beganny, S., Chou, B. K., ... Cheng, L. (2009). Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 5(1), 97-110.doi:10.1016/j.stem.2009.05.023
557. Perez, E. E., Wang, J., Miller, J. C., Jouvenot, Y., Kim, K. A., Liu, O., ... June, C. H. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 26(7), 808-816.doi:10.1038/nbt1410
558. Santiago, Y., Chan, E., Liu, P. Q., Orlando, S., Zhang, L., Urnov, F. D., ... Collingwood, T. N. (2008). Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(15), 5809-5814.doi:10.1073/pnas.0800940105
559. Cui, X., Ji, D., Fisher, D. A., Wu, Y., Briner, D. M., & Weinstein, E. J. (2011). Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 29(1), 64-67.doi:10.1038/nbt.1731
560. Zhang, F., Maeder, M. L., Unger-Wallace, E., Hoshaw, J. P., Reyon, D., Christian, M., ... Voytas, D. F. (2010). High frequency targeted mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*

- using zinc finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(26), 12028-12033.doi:10.1073/pnas.0914991107
561. Wright, D. A., Townsend, J. A., Winfrey, R. J., Jr., Irwin, P. A., Rajagopal, J., Lonosky, P. M., ... Voytas, D. F. (2005). High-frequency homologous recombination in plants mediated by zinc-finger nucleases. *Plant J*, 44(4), 693-705.doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02551.x
562. Foley, J. E., Maeder, M. L., Pearlberg, J., Joung, J. K., Peterson, R. T., & Yeh, J. R. (2009). Targeted mutagenesis in zebrafish using customized zinc-finger nucleases. *Nat Protoc*, 4(12), 1855-1867.doi:10.1038/nprot.2009.209
563. Hauschild, J., Petersen, B., Santiago, Y., Queisser, A. L., Carnwath, J. W., Lucas-Hahn, A., ... Niemann, H. (2011). Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(29), 12013-12017.doi:10.1073/pnas.1106422108
564. Lombardo, A., Genovese, P., Beausejour, C. M., Colleoni, S., Lee, Y. L., Kim, K. A., ... Naldini, L. (2007). Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol*, 25(11), 1298-1306.doi:10.1038/nbt1353
565. Gabriel, R., Lombardo, A., Arens, A., Miller, J. C., Genovese, P., Kaepfel, C., ... von Kalle, C. (2011). An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity. *Nat Biotechnol*, 29(9), 816-823.doi:10.1038/nbt.1948
566. Olsen, P. A., Gelazauskaite, M., Randol, M., & Krauss, S. (2010). Analysis of illegitimate genomic integration mediated by zinc-finger nucleases: implications for specificity of targeted gene correction. *BMC Mol Biol*, 11, 35.doi:10.1186/1471-2199-11-35
567. Olsen, P. A., Solhaug, A., Booth, J. A., Gelazauskaite, M., & Krauss, S. (2009). Cellular responses to targeted genomic sequence modification using single-stranded oligonucleotides and zinc-finger nucleases. *DNA Repair (Amst)*, 8(3), 298-308.doi:10.1016/j.dnarep.2008.11.011
568. Cornu, T. I., Thibodeau-Beganny, S., Guhl, E., Alwin, S., Eichtinger, M., Joung, J. K., & Cathomen, T. (2008). DNA-binding specificity is a major determinant of the activity

- and toxicity of zinc-finger nucleases. *Mol Ther*, 16(2), 352-358.doi:10.1038/sj.mt.6300357
569. Pattanayak, V., Ramirez, C. L., Joung, J. K., & Liu, D. R. (2011). Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nat Methods*, 8(9), 765-770.doi:10.1038/nmeth.1670
570. Ramalingam, S., Kandavelou, K., Rajenderan, R., & Chandrasegaran, S. (2011). Creating designed zinc-finger nucleases with minimal cytotoxicity. *J Mol Biol*, 405(3), 630-641.doi:10.1016/j.jmb.2010.10.043
571. Rousseau, J., Chapdelaine, P., Boisvert, S., Almeida, L. P., Corbeil, J., Montpetit, A., & Tremblay, J. P. (2011). Endonucleases: tools to correct the dystrophin gene. *J Gene Med*, 13(10), 522-537.doi:10.1002/jgm.1611
572. Ehrhardt, A., Yant, S. R., Giering, J. C., Xu, H., Engler, J. A., & Kay, M. A. (2007). Somatic integration from an adenoviral hybrid vector into a hot spot in mouse liver results in persistent transgene expression levels in vivo. *Mol Ther*, 15(1), 146-156.doi:10.1038/sj.mt.6300011
573. Olivares, E. C., Hollis, R. P., Chalberg, T. W., Meuse, L., Kay, M. A., & Calos, M. P. (2002). Site-specific genomic integration produces therapeutic Factor IX levels in mice. *Nat Biotechnol*, 20(11), 1124-1128.doi:10.1038/nbt753
574. Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Hollis, R. P., Ginsburg, D. S., & Calos, M. P. (2001). Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage phiC31 integrase. *Mol Cell Biol*, 21(12), 3926-3934.doi:10.1128/MCB.21.12.3926-3934.2001
575. Smith, M. C., Till, R., Brady, K., Soultanas, P., Thorpe, H., & Smith, M. C. (2004). Synapsis and DNA cleavage in phiC31 integrase-mediated site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, 32(8), 2607-2617.doi:10.1093/nar/gkh538
576. Chalberg, T. W., Portlock, J. L., Olivares, E. C., Thyagarajan, B., Kirby, P. J., Hillman, R. T., ... Calos, M. P. (2006). Integration specificity of phage phiC31 integrase in the human genome. *J Mol Biol*, 357(1), 28-48.doi:10.1016/j.jmb.2005.11.098
577. Thorpe, H. M., & Smith, M. C. (1998). In vitro site-specific integration of bacteriophage DNA catalyzed by a recombinase of the resolvase/invertase family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10), 5505-5510

578. Andreas, S., Schwenk, F., Kuter-Luks, B., Faust, N., & Kuhn, R. (2002). Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLPe recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, *30*(11), 2299-2306
579. Woodard, L. E., Hillman, R. T., Keravala, A., Lee, S., & Calos, M. P. (2010). Effect of nuclear localization and hydrodynamic delivery-induced cell division on phiC31 integrase activity. *Gene Ther*, *17*(2), 217-226.doi:10.1038/gt.2009.136
580. Smith, M. C., & Thorpe, H. M. (2002). Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol*, *44*(2), 299-307
581. Smith, M. C., Brown, W. R., McEwan, A. R., & Rowley, P. A. (2010). Site-specific recombination by phiC31 integrase and other large serine recombinases. *Biochem Soc Trans*, *38*(2), 388-394.doi:10.1042/BST0380388
582. Chen, C. M., Krohn, J., Bhattacharya, S., & Davies, B. (2011). A comparison of exogenous promoter activity at the ROSA26 locus using a PhiC31 integrase mediated cassette exchange approach in mouse ES cells. *PLoS One*, *6*(8), e23376.doi:10.1371/journal.pone.0023376
583. Ehrhardt, A., Xu, H., Huang, Z., Engler, J. A., & Kay, M. A. (2005). A direct comparison of two nonviral gene therapy vectors for somatic integration: in vivo evaluation of the bacteriophage integrase phiC31 and the Sleeping Beauty transposase. *Mol Ther*, *11*(5), 695-706.doi:10.1016/j.ymthe.2005.01.010
584. Ye, L., Chang, J. C., Lin, C., Qi, Z., Yu, J., & Kan, Y. W. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells using site-specific integration with phage integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(45), 19467-19472.doi:10.1073/pnas.1012677107
585. Sivalingam, J., Krishnan, S., Ng, W. H., Lee, S. S., Phan, T. T., & Kon, O. L. (2010). Biosafety assessment of site-directed transgene integration in human umbilical cord-lining cells. *Mol Ther*, *18*(7), 1346-1356.doi:10.1038/mt.2010.61
586. Groth, A. C., Olivares, E. C., Thyagarajan, B., & Calos, M. P. (2000). A phage integrase directs efficient site-specific integration in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(11), 5995-6000.doi:10.1073/pnas.090527097

587. Khaleel, T., Younger, E., McEwan, A. R., Varghese, A. S., & Smith, M. C. (2011). A phage protein that binds phiC31 integrase to switch its directionality. *Mol Microbiol*, 80(6), 1450-1463.doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07696.x
588. Chen, J. Z., Ji, C. N., Xu, G. L., Pang, R. Y., Yao, J. H., Zhu, H. Z., ... Jia, W. (2006). DAXX interacts with phage PhiC31 integrase and inhibits recombination. *Nucleic Acids Res*, 34(21), 6298-6304.doi:10.1093/nar/gkl890
589. Maucksch, C., Aneja, M. K., Hennen, E., Bohla, A., Hoffmann, F., Elfinger, M., ... Rudolph, C. (2008). Cell type differences in activity of the Streptomyces bacteriophage phiC31 integrase. *Nucleic Acids Res*, 36(17), 5462-5471.doi:10.1093/nar/gkn532
590. Lin, Y., Li, Z. H., Wang, J. J., Xu, G. L., Shen, Q., Tian, L., ... Chen, J. Z. (2011). Sp100 interacts with phage PhiC31 integrase to inhibit its recombination activity. *Acta Biochim Pol*, 58(1), 67-73
591. Wang, B. Y., Xu, G. L., Zhou, C. H., Tian, L., Xue, J. L., Chen, J. Z., & Jia, W. (2010). PhiC31 integrase interacts with TTRAP and inhibits NFkappaB activation. *Mol Biol Rep*, 37(6), 2809-2816.doi:10.1007/s11033-009-9829-3
592. Karow, M., Chavez, C. L., Farruggio, A. P., Geisinger, J. M., Keravala, A., Jung, W. E., ... Calos, M. P. (2011). Site-specific recombinase strategy to create induced pluripotent stem cells efficiently with plasmid DNA. *Stem Cells*, 29(11), 1696-1704.doi:10.1002/stem.730
593. Thyagarajan, B., Liu, Y., Shin, S., Lakshmipathy, U., Scheyhing, K., Xue, H., ... Chesnut, J. D. (2008). Creation of engineered human embryonic stem cell lines using phiC31 integrase. *Stem Cells*, 26(1), 119-126.doi:10.1634/stemcells.2007-0283
594. Leighton, P. A., van de Lavoie, M. C., Diamond, J. H., Xia, C., & Etches, R. J. (2008). Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase. *Mol Reprod Dev*, 75(7), 1163-1175.doi:10.1002/mrd.20859
595. Ortiz-Urda, S., Thyagarajan, B., Keene, D. R., Lin, Q., Calos, M. P., & Khavari, P. A. (2003). PhiC31 integrase-mediated nonviral genetic correction of junctional epidermolysis bullosa. *Hum Gene Ther*, 14(9), 923-928.doi:10.1089/104303403765701204

596. Wilber, A., Ulloa Montoya, F., Hammer, L., Moriarity, B. S., Geurts, A. M., Largaespada, D. A., ... Lakshmiathy, U. (2011). Efficient non-viral integration and stable gene expression in multipotent adult progenitor cells. *Stem Cells Int*, 2011, 717069.doi:10.4061/2011/717069
597. Liesner, R., Zhang, W., Noske, N., & Ehrhardt, A. (2010). Critical amino acid residues within the phiC31 integrase DNA-binding domain affect recombination activities in mammalian cells. *Hum Gene Ther*, 21(9), 1104-1118.doi:10.1089/hum.2010.034
598. Ehrhardt, A., Engler, J. A., Xu, H., Cherry, A. M., & Kay, M. A. (2006). Molecular analysis of chromosomal rearrangements in mammalian cells after phiC31-mediated integration. *Hum Gene Ther*, 17(11), 1077-1094.doi:10.1089/hum.2006.17.1077
599. Held, P. K., Olivares, E. C., Aguilar, C. P., Finegold, M., Calos, M. P., & Grompe, M. (2005). In vivo correction of murine hereditary tyrosinemia type I by phiC31 integrase-mediated gene delivery. *Mol Ther*, 11(3), 399-408.doi:10.1016/j.ymthe.2004.11.001
600. Keravala, A., Chavez, C. L., Hu, G., Woodard, L. E., Monahan, P. E., & Calos, M. P. (2011). Long-term phenotypic correction in factor IX knockout mice by using phiC31 integrase-mediated gene therapy. *Gene Ther*, 18(8), 842-848.doi:10.1038/gt.2011.31
601. Keravala, A., Lee, S., Thyagarajan, B., Olivares, E. C., Gabrovsky, V. E., Woodard, L. E., & Calos, M. P. (2009). Mutational derivatives of PhiC31 integrase with increased efficiency and specificity. *Mol Ther*, 17(1), 112-120.doi:10.1038/mt.2008.241
602. Chavez, C. L., Keravala, A., Woodard, L. E., Hillman, R. T., Stowe, T. R., Chu, J. N., & Calos, M. P. (2010). Kinetics and longevity of PhiC31 integrase in mouse liver and cultured cells. *Hum Gene Ther*, 21(10), 1287-1297.doi:10.1089/hum.2010.049
603. Liao, Y. C., & Lo, S. H. (2008). Deleted in liver cancer-1 (DLC-1): a tumor suppressor not just for liver. *Int J Biochem Cell Biol*, 40(5), 843-847.doi:10.1016/j.biocel.2007.04.008
604. Aneja, M. K., Imker, R., & Rudolph, C. (2007). Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration and long-term gene expression in the lung after nonviral gene delivery. *J Gene Med*, 9(11), 967-975.doi:10.1002/jgm.1090

605. Keravala, A., Ormerod, B. K., Palmer, T. D., & Calos, M. P. (2008). Long-term transgene expression in mouse neural progenitor cells modified with phiC31 integrase. *J Neurosci Methods*, *173*(2), 299-305.doi:10.1016/j.jneumeth.2008.06.005
606. Hollis, R. P., Stoll, S. M., Scilimenti, C. R., Lin, J., Chen-Tsai, Y., & Calos, M. P. (2003). Phage integrases for the construction and manipulation of transgenic mammals. *Reprod Biol Endocrinol*, *1*, 79.doi:10.1186/1477-7827-1-79
607. Bertoni, C., Jarrahian, S., Wheeler, T. M., Li, Y., Olivares, E. C., Calos, M. P., & Rando, T. A. (2006). Enhancement of plasmid-mediated gene therapy for muscular dystrophy by directed plasmid integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(2), 419-424.doi:10.1073/pnas.0504505102
608. Portlock, J. L., Keravala, A., Bertoni, C., Lee, S., Rando, T. A., & Calos, M. P. (2006). Long-term increase in mVEGF164 in mouse hindlimb muscle mediated by phage phiC31 integrase after nonviral DNA delivery. *Hum Gene Ther*, *17*(8), 871-876.doi:10.1089/hum.2006.17.871
609. Woodard, L. E., Keravala, A., Jung, W. E., Wapinski, O. L., Yang, Q., Felsher, D. W., & Calos, M. P. (2010). Impact of hydrodynamic injection and phiC31 integrase on tumor latency in a mouse model of MYC-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, *5*(6), e11367.doi:10.1371/journal.pone.0011367
610. Ishikawa, Y., Tanaka, N., Murakami, K., Uchiyama, T., Kumaki, S., Tsuchiya, S., ... Sugamura, K. (2006). Phage phiC31 integrase-mediated genomic integration of the common cytokine receptor gamma chain in human T-cell lines. *J Gene Med*, *8*(5), 646-653.doi:10.1002/jgm.891
611. Scilimenti, C. R., Thyagarajan, B., & Calos, M. P. (2001). Directed evolution of a recombinase for improved genomic integration at a native human sequence. *Nucleic Acids Res*, *29*(24), 5044-5051
612. Liu, J., Jeppesen, I., Nielsen, K., & Jensen, T. G. (2006). Phi c31 integrase induces chromosomal aberrations in primary human fibroblasts. *Gene Ther*, *13*(15), 1188-1190.doi:10.1038/sj.gt.3302789

613. Liu, J., Skjorringe, T., Gjetting, T., & Jensen, T. G. (2009). PhiC31 integrase induces a DNA damage response and chromosomal rearrangements in human adult fibroblasts. *BMC Biotechnol*, *9*, 31.doi:10.1186/1472-6750-9-31
614. Keravala, A., Portlock, J. L., Nash, J. A., Vitrant, D. G., Robbins, P. D., & Calos, M. P. (2006). PhiC31 integrase mediates integration in cultured synovial cells and enhances gene expression in rabbit joints. *J Gene Med*, *8*(8), 1008-1017.doi:10.1002/jgm.928
615. Chalberg, T. W., Genise, H. L., Vollrath, D., & Calos, M. P. (2005). phiC31 integrase confers genomic integration and long-term transgene expression in rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, *46*(6), 2140-2146.doi:10.1167/iovs.04-1252
616. Marino, M., Scuderi, F., Provenzano, C., & Bartoccioni, E. (2011). Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Ther*, *18*(2), 109-116.doi:10.1038/gt.2010.124
617. Masson, F., Mount, A. M., Wilson, N. S., & Belz, G. T. (2008). Dendritic cells: driving the differentiation programme of T cells in viral infections. *Immunol Cell Biol*, *86*(4), 333-342.doi:10.1038/icb.2008.15
618. Brooks, A. R., Harkins, R. N., Wang, P., Qian, H. S., Liu, P., & Rubanyi, G. M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med*, *6*(4), 395-404.doi:10.1002/jgm.516
619. Jang, H. J., Choi, J. W., Kim, Y. M., Shin, S. S., Lee, K., & Han, J. Y. (2011). Reactivation of transgene expression by alleviating CpG methylation of the Rous sarcoma virus promoter in transgenic quail cells. *Mol Biotechnol*, *49*(3), 222-228.doi:10.1007/s12033-011-9393-7
620. Mehta, A. K., Majumdar, S. S., Alam, P., Gulati, N., & Brahmachari, V. (2009). Epigenetic regulation of cytomegalovirus major immediate-early promoter activity in transgenic mice. *Gene*, *428*(1-2), 20-24.doi:10.1016/j.gene.2008.09.033
621. Harms, J. S., & Splitter, G. A. (1995). Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter. *Hum Gene Ther*, *6*(10), 1291-1297.doi:10.1089/hum.1995.6.10-1291

622. Ritter, T., Brandt, C., Prosch, S., Vergopoulos, A., Vogt, K., Kolls, J., & Volk, H. D. (2000). Stimulatory and inhibitory action of cytokines on the regulation of hCMV-IE promoter activity in human endothelial cells. *Cytokine*, *12*(8), 1163-1170.doi:10.1006/cyto.2000.0689
623. Blain, M., Zeng, Y., Bendjelloul, M., Hallauer, P. L., Kumar, A., Hastings, K. E., ... Gilbert, R. (2010). Strong muscle-specific regulatory cassettes based on multiple copies of the human slow troponin I gene upstream enhancer. *Hum Gene Ther*, *21*(1), 127-134.doi:10.1089/hum.2008.208
624. Li, X., Eastman, E. M., Schwartz, R. J., & Draghia-Akli, R. (1999). Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol*, *17*(3), 241-245.doi:10.1038/6981
625. Hauser, M. A., Robinson, A., Hartigan-O'Connor, D., Williams-Gregory, D. A., Buskin, J. N., Apone, S., ... Chamberlain, J. S. (2000). Analysis of muscle creatine kinase regulatory elements in recombinant adenoviral vectors. *Mol Ther*, *2*(1), 16-25.doi:10.1006/mthe.2000.0089
626. Wang, B., Li, J., Fu, F. H., Chen, C., Zhu, X., Zhou, L., ... Xiao, X. (2008). Construction and analysis of compact muscle-specific promoters for AAV vectors. *Gene Ther*, *15*(22), 1489-1499.doi:10.1038/gt.2008.104
627. Yue, Y., Li, Z., Harper, S. Q., Davisson, R. L., Chamberlain, J. S., & Duan, D. (2003). Microdystrophin gene therapy of cardiomyopathy restores dystrophin-glycoprotein complex and improves sarcolemma integrity in the mdx mouse heart. *Circulation*, *108*(13), 1626-1632.doi:10.1161/01.CIR.0000089371.11664.27
628. Li, Z., Marchand, P., Humbert, J., Babinet, C., & Paulin, D. (1993). Desmin sequence elements regulating skeletal muscle-specific expression in transgenic mice. *Development*, *117*(3), 947-959
629. Zhang, G., Ludtke, J. J., Thioudellet, C., Kleinpeter, P., Antoniou, M., Herweijer, H., ... Wolff, J. A. (2004). Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, *15*(8), 770-782.doi:10.1089/1043034041648408

630. Zhu, L., Lyons, G. E., Juhasz, O., Joya, J. E., Hardeman, E. C., & Wade, R. (1995). Developmental regulation of troponin I isoform genes in striated muscles of transgenic mice. *Dev Biol*, *169*(2), 487-503.doi:10.1006/dbio.1995.1163
631. Calvo, S., Vullhorst, D., Venepally, P., Cheng, J., Karavanova, I., & Buonanno, A. (2001). Molecular dissection of DNA sequences and factors involved in slow muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*, *21*(24), 8490-8503.doi:10.1128/MCB.21.24.8490-8503.2001
632. Bhavsar, P. K., Dhoot, G. K., Cumming, D. V., Butler-Browne, G. S., Yacoub, M. H., & Barton, P. J. (1991). Developmental expression of troponin I isoforms in fetal human heart. *FEBS Lett*, *292*(1-2), 5-8
633. Calvo, S., Venepally, P., Cheng, J., & Buonanno, A. (1999). Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements. *Mol Cell Biol*, *19*(1), 515-525
634. Yutzey, K. E., Kline, R. L., & Konieczny, S. F. (1989). An internal regulatory element controls troponin I gene expression. *Mol Cell Biol*, *9*(4), 1397-1405
635. Nakayama, M., Stauffer, J., Cheng, J., Banerjee-Basu, S., Wawrousek, E., & Buonanno, A. (1996). Common core sequences are found in skeletal muscle slow- and fast-fiber-type-specific regulatory elements. *Mol Cell Biol*, *16*(5), 2408-2417
636. Corin, S. J., Juhasz, O., Zhu, L., Conley, P., Kedes, L., & Wade, R. (1994). Structure and expression of the human slow twitch skeletal muscle troponin I gene. *J Biol Chem*, *269*(14), 10651-10659
637. Corin, S. J., Levitt, L. K., O'Mahoney, J. V., Joya, J. E., Hardeman, E. C., & Wade, R. (1995). Delineation of a slow-twitch-myofiber-specific transcriptional element by using in vivo somatic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(13), 6185-6189
638. O'Mahoney, J. V., Guven, K. L., Lin, J., Joya, J. E., Robinson, C. S., Wade, R. P., & Hardeman, E. C. (1998). Identification of a novel slow-muscle-fiber enhancer binding protein, MusTRD1. *Mol Cell Biol*, *18*(11), 6641-6652
639. Calvo, S., Stauffer, J., Nakayama, M., & Buonanno, A. (1996). Transcriptional control of muscle plasticity: differential regulation of troponin I genes by electrical activity. *Dev*

Genet, 19(2), 169-181.doi:10.1002/(SICI)1520-6408(1996)19:2<169::AID-DVG9>3.0.CO;2-7

640. Conseil National de Recherche du Canada & Université de Montréal. Constructs for enhancement of gene expression in muscle. Blain, M., Massie B., & Gilbert, R. Brevet # WO/2008/124934. 2008.10.23.
641. Hunt, A. G., Mogen, B. D., Chu, N. M., & Chua, N. H. (1991). The SV40 small t intron is accurately and efficiently spliced in tobacco cells. *Plant Mol Biol*, 16(3), 375-379
642. Bentzinger, C. F., Wang, Y. X., & Rudnicki, M. A. (2012). Building muscle: molecular regulation of myogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4(2).doi:10.1101/cshperspect.a008342
643. Siegel, A. L., Atchison, K., Fisher, K. E., Davis, G. E., & Cornelison, D. D. (2009). 3D timelapse analysis of muscle satellite cell motility. *Stem Cells*, 27(10), 2527-2538.doi:10.1002/stem.178
644. Cherry, S. R., Biniszkiewicz, D., van Parijs, L., Baltimore, D., & Jaenisch, R. (2000). Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol*, 20(20), 7419-7426
645. Liu, X. F., Yan, S., Abecassis, M., & Hummel, M. (2008). Establishment of murine cytomegalovirus latency in vivo is associated with changes in histone modifications and recruitment of transcriptional repressors to the major immediate-early promoter. *J Virol*, 82(21), 10922-10931.doi:10.1128/JVI.00865-08
646. Papadakis, E. D., Nicklin, S. A., Baker, A. H., & White, S. J. (2004). Promoters and control elements: designing expression cassettes for gene therapy. *Curr Gene Ther*, 4(1), 89-113
647. Gorski, K. S., Shin, T., Crafton, E., Otsuji, M., Rattis, F. M., Huang, X., ... Tsuchiya, H. (2003). A set of genes selectively expressed in murine dendritic cells: utility of related cis-acting sequences for lentiviral gene transfer. *Mol Immunol*, 40(1), 35-47
648. Kay, M. A., Glorioso, J. C., & Naldini, L. (2001). Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, 7(1), 33-40.doi:10.1038/83324

649. Robert, M. A., Zeng, Y., Raymond, B., Desfosse, L., Mairey, E., Tremblay, J. P., ... Gilbert, R. (2012). Efficacy and Site-Specificity of Adenoviral Vector Integration Mediated by the Phage phiC31 Integrase. *Hum Gene Ther Methods*, 23(6), 393-407.doi:10.1089/hgtb.2012.122
650. Wurtele, H., Little, K. C., & Chartrand, P. (2003). Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther*, 10(21), 1791-1799.doi:10.1038/sj.gt.3302074
651. Murnane, J. P., Yezzi, M. J., & Young, B. R. (1990). Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells. *Nucleic Acids Res*, 18(9), 2733-2738
652. Kreiss, P., Cameron, B., Rangara, R., Mailhe, P., Aguerre-Charriol, O., Airiau, M., ... Pitard, B. (1999). Plasmid DNA size does not affect the physicochemical properties of lipoplexes but modulates gene transfer efficiency. *Nucleic Acids Res*, 27(19), 3792-3798
653. Sinn, P. L., Sauter, S. L., & McCray, P. B., Jr. (2005). Gene therapy progress and prospects: development of improved lentiviral and retroviral vectors--design, biosafety, and production. *Gene Ther*, 12(14), 1089-1098.doi:10.1038/sj.gt.3302570
654. Dropulic, B. (2011). Lentiviral vectors: their molecular design, safety, and use in laboratory and preclinical research. *Hum Gene Ther*, 22(6), 649-657.doi:10.1089/hum.2011.058
655. Mitchell, R. S., Beitzel, B. F., Schroder, A. R., Shinn, P., Chen, H., Berry, C. C., ... Bushman, F. D. (2004). Retroviral DNA integration: ASLV, HIV, and MLV show distinct target site preferences. *PLoS Biol*, 2(8), E234.doi:10.1371/journal.pbio.0020234
656. Vetrini, F., & Ng, P. (2010). Gene therapy with helper-dependent adenoviral vectors: current advances and future perspectives. *Viruses*, 2(9), 1886-1917.doi:10.3390/v2091886
657. Massie, B., Couture, F., Lamoureux, L., Mosser, D. D., Guilbault, C., Jolicoeur, P., ... Langelier, Y. (1998). Inducible overexpression of a toxic protein by an adenovirus vector with a tetracycline-regulatable expression cassette. *J Virol*, 72(3), 2289-2296

658. Meneses-Acosta, A., Dormond, E., Jacob, D., Tom, R., Bernier, A., Perret, S., ... Kamen, A. (2008). Development of a suspension serum-free helper-dependent adenovirus production system and assessment of co-infection conditions. *J Virol Methods*, *148*(1-2), 106-114.doi:10.1016/j.jviromet.2007.10.017
659. Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Howell, J. M., Davies, L., Fletcher, S., Amalfitano, A., ... 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*(14), 1741-1755.doi:10.1089/104303401750476249
660. Robert, M. A., Lin, Y., Bendjelloul, M., Zeng, Y., Dessolin, S., Broussau, S., ... Gilbert, R. (2012). Strength and muscle specificity of a compact promoter derived from the slow troponin I gene in the context of episomal (gutless adenovirus) and integrating (lentiviral) vectors. *J Gene Med*.doi:10.1002/jgm.2675
661. Mah, L. J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010). gammaH2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia*, *24*(4), 679-686.doi:10.1038/leu.2010.6
662. Sharma, N., Moldt, B., Dalsgaard, T., Jensen, T. G., & Mikkelsen, J. G. (2008). Regulated gene insertion by steroid-induced PhiC31 integrase. *Nucleic Acids Res*, *36*(11), e67.doi:10.1093/nar/gkn298
663. Calos, M. P. (2006). The phiC31 integrase system for gene therapy. *Curr Gene Ther*, *6*(6), 633-645
664. Mates, L., Chuah, M. K., Belay, E., Jerchow, B., Manoj, N., Acosta-Sanchez, A., ... Izsvak, Z. (2009). Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates. *Nat Genet*, *41*(6), 753-761.doi:10.1038/ng.343
665. Soifer, H. S., & Kasahara, N. (2004). Retrotransposon-adenovirus hybrid vectors: efficient delivery and stable integration of transgenes via a two-stage mechanism. *Curr Gene Ther*, *4*(4), 373-384
666. Liu, Q., Perez, C. F., & Wang, Y. (2006). Efficient site-specific integration of large transgenes by an enhanced herpes simplex virus/adeno-associated virus hybrid amplicon vector. *J Virol*, *80*(4), 1672-1679.doi:10.1128/JVI.80.4.1672-1679.2006

667. Goncalves, M. A., Holkers, M., van Nierop, G. P., Wieringa, R., Pau, M. G., & de Vries, A. A. (2008). Targeted chromosomal insertion of large DNA into the human genome by a fiber-modified high-capacity adenovirus-based vector system. *PLoS One*, 3(8), e3084.doi:10.1371/journal.pone.0003084
668. Fredman, J. N., & Engler, J. A. (1993). Adenovirus precursor to terminal protein interacts with the nuclear matrix in vivo and in vitro. *J Virol*, 67(6), 3384-3395
669. Raymond, C. S., & Soriano, P. (2007). High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS One*, 2(1), e162.doi:10.1371/journal.pone.0000162
670. Robert, M. A., Lin, Y., Bendjelloul, M., Zeng, Y., Dessolin, S., Broussau, S., ... Gilbert, R. (2012). Strength and muscle specificity of a compact promoter derived from the slow troponin I gene in the context of episomal (gutless adenovirus) and integrating (lentiviral) vectors. *J Gene Med*, 14(12), 746-760.doi:10.1002/jgm.2675
671. Cordier, L., Gao, G. P., Hack, A. A., McNally, E. M., Wilson, J. M., Chirmule, N., & Sweeney, H. L. (2001). Muscle-specific promoters may be necessary for adeno-associated virus-mediated gene transfer in the treatment of muscular dystrophies. *Hum Gene Ther*, 12(2), 205-215.doi:10.1089/104303401750061267
672. Palmer, D. J., & Ng, P. (2005). Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther*, 16(1), 1-16.doi:10.1089/hum.2005.16.1
673. Giberson, A. N., Davidson, A. R., & Parks, R. J. (2012). Chromatin structure of adenovirus DNA throughout infection. *Nucleic Acids Res*, 40(6), 2369-2376.doi:10.1093/nar/gkr1076
674. Komatsu, T., Haruki, H., & Nagata, K. (2011). Cellular and viral chromatin proteins are positive factors in the regulation of adenovirus gene expression. *Nucleic Acids Res*, 39(3), 889-901.doi:10.1093/nar/gkq783
675. DelloRusso, C., Scott, J. M., Hartigan-O'Connor, D., Salvatori, G., Barjot, C., Robinson, A. S., ... Chamberlain, J. S. (2002). Functional correction of adult mdx mouse muscle using gutted adenoviral vectors expressing full-length dystrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(20), 12979-12984.doi:10.1073/pnas.202300099

676. Kawano, R., Ishizaki, M., Maeda, Y., Uchida, Y., Kimura, E., & Uchino, M. (2008). Transduction of full-length dystrophin to multiple skeletal muscles improves motor performance and life span in utrophin/dystrophin double knockout mice. *Mol Ther*, *16*(5), 825-831.doi:10.1038/mt.2008.23
677. Reay, D. P., Bilbao, R., Koppanati, B. M., Cai, L., O'Day, T. L., Jiang, Z., ... Clemens, P. R. (2008). Full-length dystrophin gene transfer to the mdx mouse in utero. *Gene Ther*, *15*(7), 531-536.doi:10.1038/gt.2008.8
678. Ishizaki, M., Maeda, Y., Kawano, R., Suga, T., Uchida, Y., Uchino, K., ... Uchino, M. (2011). Rescue from respiratory dysfunction by transduction of full-length dystrophin to diaphragm via the peritoneal cavity in utrophin/dystrophin double knockout mice. *Mol Ther*, *19*(7), 1230-1235.doi:10.1038/mt.2011.58
679. Dormond, E., Meneses-Acosta, A., Jacob, D., Durocher, Y., Gilbert, R., Perrier, M., & Kamen, A. (2009). An efficient and scalable process for helper-dependent adenoviral vector production using polyethylenimine-adenofection. *Biotechnol Bioeng*, *102*(3), 800-810.doi:10.1002/bit.22113
680. Cote, J., Bourget, L., Garnier, A., & Kamen, A. (1997). Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring. *Biotechnol Prog*, *13*(6), 709-714.doi:10.1021/bp970110i
681. Miyoshi, H., Blomer, U., Takahashi, M., Gage, F. H., & Verma, I. M. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J Virol*, *72*(10), 8150-8157
682. Vigna, E., Cavalieri, S., Ailles, L., Geuna, M., Loew, R., Bujard, H., & Naldini, L. (2002). Robust and efficient regulation of transgene expression in vivo by improved tetracycline-dependent lentiviral vectors. *Mol Ther*, *5*(3), 252-261.doi:10.1006/mthe.2002.0542
683. Gaillet, B., Gilbert, R., Broussau, S., Pilotte, A., Malenfant, F., Mullick, A., ... Massie, B. (2010). High-level recombinant protein production in CHO cells using lentiviral vectors and the cumate gene-switch. *Biotechnol Bioeng*, *106*(2), 203-215.doi:10.1002/bit.22698
684. Chabaud, S., Sasseville, A. M., Elahi, S. M., Caron, A., Dufour, F., Massie, B., & Langelier, Y. (2007). The ribonucleotide reductase domain of the R1 subunit of herpes

- simplex virus type 2 ribonucleotide reductase is essential for R1 antiapoptotic function. *J Gen Virol*, 88(Pt 2), 384-394.doi:10.1099/vir.0.82383-0
685. Molnar, M. J., Gilbert, R., Lu, Y., Liu, A. B., Guo, A., Larochele, N., ... Karpati, G. (2004). Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther*, 10(3), 447-455.doi:10.1016/j.ymthe.2004.06.642
686. Jockusch, H., Voigt, S., & Eberhard, D. (2003). Localization of GFP in frozen sections from unfixed mouse tissues: immobilization of a highly soluble marker protein by formaldehyde vapor. *J Histochem Cytochem*, 51(3), 401-404
687. Niwa, H., Yamamura, K., & Miyazaki, J. (1991). Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene*, 108(2), 193-199
688. Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Petrof, B. J., Ebihara, S., Guibinga, G. H., Tinsley, J. M., ... Karpati, G. (1999). Adenovirus-mediated utrophin gene transfer mitigates the dystrophic phenotype of mdx mouse muscles. *Hum Gene Ther*, 10(8), 1299-1310.doi:10.1089/10430349950017987
689. Ishii, A., Hagiwara, Y., Saito, Y., Yamamoto, K., Yuasa, K., Sato, Y., ... Takeda, S. (1999). Effective adenovirus-mediated gene expression in adult murine skeletal muscle. *Muscle Nerve*, 22(5), 592-599
690. Evans, V., Foster, H., Graham, I. R., Foster, K., Athanasopoulos, T., Simons, J. P., ... Owen, J. S. (2008). Human apolipoprotein E expression from mouse skeletal muscle by electrotransfer of nonviral DNA (plasmid) and pseudotyped recombinant adeno-associated virus (AAV2/7). *Hum Gene Ther*, 19(6), 569-578.doi:10.1089/hum.2007.169
691. Reeves, R., Gorman, C. M., & Howard, B. (1985). Minichromosome assembly of non-integrated plasmid DNA transfected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 13(10), 3599-3615
692. Chen, P., Tian, J., Kovesdi, I., & Bruder, J. T. (2008). Promoters influence the kinetics of transgene expression following adenovector gene delivery. *J Gene Med*, 10(2), 123-131.doi:10.1002/jgm.1127

693. Norrman, K., Fischer, Y., Bonnamy, B., Wolfhagen Sand, F., Ravassard, P., & Semb, H. (2010). Quantitative comparison of constitutive promoters in human ES cells. *PLoS One*, 5(8), e12413.doi:10.1371/journal.pone.0012413
694. Bushman, F., Lewinski, M., Ciuffi, A., Barr, S., Leipzig, J., Hannenhalli, S., & Hoffmann, C. (2005). Genome-wide analysis of retroviral DNA integration. *Nat Rev Microbiol*, 3(11), 848-858.doi:10.1038/nrmicro1263
695. Emery, D. W. (2011). The use of chromatin insulators to improve the expression and safety of integrating gene transfer vectors. *Hum Gene Ther*, 22(6), 761-774.doi:10.1089/hum.2010.233
696. Harraghy, N., Gaussin, A., & Mermoud, N. (2008). Sustained transgene expression using MAR elements. *Curr Gene Ther*, 8(5), 353-366
697. Farruggio, A. P., Chavez, C. L., Mikell, C. L., & Calos, M. P. (2012). Efficient reversal of phiC31 integrase recombination in mammalian cells. *Biotechnol J*.doi:10.1002/biot.201200283
698. Kondrychyn, I., Garcia-Lecea, M., Emelyanov, A., Parinov, S., & Korzh, V. (2009). Genome-wide analysis of Tol2 transposon reintegration in zebrafish. *BMC Genomics*, 10, 418.doi:10.1186/1471-2164-10-418
699. Koga, A., Higashide, I., Hori, H., Wakamatsu, Y., Kyono-Hamaguchi, Y., & Hamaguchi, S. (2007). The Tol1 element of medaka fish is transposed with only terminal regions and can deliver large DNA fragments into the chromosomes. *J Hum Genet*, 52(12), 1026-1030.doi:10.1007/s10038-007-0213-7
700. Yergeau, D. A., & Mead, P. E. (2007). Manipulating the *Xenopus* genome with transposable elements. *Genome Biol*, 8 Suppl 1, S11.doi:10.1186/gb-2007-8-s1-s11
701. Yergeau, D. A., Kelley, C. M., Kuliyeve, E., Zhu, H., Johnson Hamlet, M. R., Sater, A. K., ... Mead, P. E. (2011). Remobilization of Sleeping Beauty transposons in the germline of *Xenopus tropicalis*. *Mob DNA*, 2, 15.doi:10.1186/1759-8753-2-15
702. Liu, G., Aronovich, E. L., Cui, Z., Whitley, C. B., & Hackett, P. B. (2004). Excision of Sleeping Beauty transposons: parameters and applications to gene therapy. *J Gene Med*, 6(5), 574-583.doi:10.1002/jgm.486

703. Maury, J. J., Choo, A. B., & Chan, K. K. (2011). Technical advances to genetically engineering human embryonic stem cells. *Integr Biol (Camb)*, 3(7), 717-723.doi:10.1039/c1ib00019e
704. Geurts, A. M., Collier, L. S., Geurts, J. L., Oseth, L. L., Bell, M. L., Mu, D., ... Largaespada, D. A. (2006). Gene mutations and genomic rearrangements in the mouse as a result of transposon mobilization from chromosomal concatemers. *PLoS Genet*, 2(9), e156.doi:10.1371/journal.pgen.0020156
705. Ivics, Z., & Izsvak, Z. (2010). The expanding universe of transposon technologies for gene and cell engineering. *Mob DNA*, 1(1), 25.doi:10.1186/1759-8753-1-25
706. Huang, X., Guo, H., Tamma, S., Jung, Y. C., Mellgren, E., Bassi, P., ... Zhou, X. (2010). Gene transfer efficiency and genome-wide integration profiling of Sleeping Beauty, Tol2, and piggyBac transposons in human primary T cells. *Mol Ther*, 18(10), 1803-1813.doi:10.1038/mt.2010.141
707. Urschitz, J., Kawasumi, M., Owens, J., Morozumi, K., Yamashiro, H., Stoytchev, I., ... Moisyadi, S. (2010). Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches: strategies for avoiding potential genotoxic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(18), 8117-8122.doi:10.1073/pnas.1003674107
708. Li, M. A., Turner, D. J., Ning, Z., Yusa, K., Liang, Q., Eckert, S., ... Bradley, A. (2011). Mobilization of giant piggyBac transposons in the mouse genome. *Nucleic Acids Res*, 39(22), e148.doi:10.1093/nar/gkr764
709. Yusa, K., Zhou, L., Li, M. A., Bradley, A., & Craig, N. L. (2011). A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(4), 1531-1536.doi:10.1073/pnas.1008322108
710. Doherty, J. E., Huye, L. E., Yusa, K., Zhou, L., Craig, N. L., & Wilson, M. H. (2012). Hyperactive piggyBac gene transfer in human cells and in vivo. *Hum Gene Ther*, 23(3), 311-320.doi:10.1089/hum.2011.138
711. Dafnis-Calas, F., Xu, Z., Haines, S., Malla, S. K., Smith, M. C., & Brown, W. R. (2005). Iterative in vivo assembly of large and complex transgenes by combining the activities of phiC31 integrase and Cre recombinase. *Nucleic Acids Res*, 33(22), e189.doi:10.1093/nar/gni192

712. Venken, K. J., He, Y., Hoskins, R. A., & Bellen, H. J. (2006). P[acman]: a BAC transgenic platform for targeted insertion of large DNA fragments in *D. melanogaster*. *Science*, *314*(5806), 1747-1751.doi:10.1126/science.1134426
713. Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., ... Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, *186*(2), 757-761.doi:10.1534/genetics.110.120717
714. Miller, J. C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K. A., Wang, J., Xia, D. F., ... Rebar, E. J. (2011). A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*, *29*(2), 143-148.doi:10.1038/nbt.1755
715. Hockemeyer, D., Wang, H., Kiani, S., Lai, C. S., Gao, Q., Cassady, J. P., ... Jaenisch, R. (2011). Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol*, *29*(8), 731-734.doi:10.1038/nbt.1927
716. Guo, J., Gaj, T., & Barbas, C. F., 3rd. (2010). Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *J Mol Biol*, *400*(1), 96-107.doi:10.1016/j.jmb.2010.04.060
717. Szczepek, M., Brondani, V., Buchel, J., Serrano, L., Segal, D. J., & Cathomen, T. (2007). Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, *25*(7), 786-793.doi:10.1038/nbt1317
718. Brunet, E., Simsek, D., Tomishima, M., DeKolver, R., Choi, V. M., Gregory, P., ... Jasin, M. (2009). Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(26), 10620-10625.doi:10.1073/pnas.0902076106
719. Sun, N., Abil, Z., & Zhao, H. (2012). Recent advances in targeted genome engineering in mammalian systems. *Biotechnol J*, *7*(9), 1074-1087.doi:10.1002/biot.201200038
720. Arnould, S., Perez, C., Cabaniols, J. P., Smith, J., Gouble, A., Grizot, S., ... Paques, F. (2007). Engineered I-CreI derivatives cleaving sequences from the human XPC gene can induce highly efficient gene correction in mammalian cells. *J Mol Biol*, *371*(1), 49-65.doi:10.1016/j.jmb.2007.04.079
721. Cabaniols, J. P., & Paques, F. (2008). Robust cell line development using meganucleases. *Methods Mol Biol*, *435*, 31-45.doi:10.1007/978-1-59745-232-8_3

722. Moran, D. M., Shen, H., & Maki, C. G. (2009). Puromycin-based vectors promote a ROS-dependent recruitment of PML to nuclear inclusions enriched with HSP70 and Proteasomes. *BMC Cell Biol*, *10*, 32.doi:10.1186/1471-2121-10-32
723. Riddell, S. R., Elliott, M., Lewinsohn, D. A., Gilbert, M. J., Wilson, L., Manley, S. A., ... Greenberg, P. D. (1996). T-cell mediated rejection of gene-modified HIV-specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *Nat Med*, *2*(2), 216-223
724. Li, Z., Fang, Y., Wang, R., Xue, J., & Chen, J. (2011). Preliminary study on the DNA-binding properties of phage PhiC31 integrase. *Gene*, *484*(1-2), 47-51.doi:10.1016/j.gene.2011.05.020
725. Salomoni, P., & Khelifi, A. F. (2006). Daxx: death or survival protein? *Trends Cell Biol*, *16*(2), 97-104.doi:10.1016/j.tcb.2005.12.002
- Hoyt, J. J. (2008). *Application and engineering of phage integrases for gene therapy*. (Thesis (Ph D), Stanford University, 2008.). Accessible par ProQuest Dissertations & Theses (3332840).
727. Friedmann, T. (2012). *Gene transfer vectors for clinical application*. Academic Press/Elsevier,. San Diego. 1 online resource (1, 385 p., [314] p. of plates) pages. p
728. Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B., & Sinha, R. P. (2010). Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*, *2010*, 592980.doi:10.4061/2010/592980
729. Kuzminov, A. (2001). Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(15), 8241-8246.doi:10.1073/pnas.131009198
730. Lin, C. P., Ban, Y., Lyu, Y. L., & Liu, L. F. (2009). Proteasome-dependent processing of topoisomerase I-DNA adducts into DNA double strand breaks at arrested replication forks. *J Biol Chem*, *284*(41), 28084-28092.doi:10.1074/jbc.M109.030601
731. Dickey, J. S., Baird, B. J., Redon, C. E., Sokolov, M. V., Sedelnikova, O. A., & Bonner, W. M. (2009). Intercellular communication of cellular stress monitored by gamma-H2AX induction. *Carcinogenesis*, *30*(10), 1686-1695.doi:10.1093/carcin/bgp192
732. Bogdanov, K. V., Chukhlovin, A. B., Zaritskey, A. Y., Frolova, O. I., & Afanasiev, B. V. (1997). Ultraviolet irradiation induces multiple DNA double-strand breaks and

- apoptosis in normal granulocytes and chronic myeloid leukaemia blasts. *Br J Haematol*, 98(4), 869-872
733. Xia, X., Zhang, Y., Zieth, C. R., & Zhang, S. C. (2007). Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells Dev*, 16(1), 167-176.doi:10.1089/scd.2006.0057
734. McGinley, L., McMahon, J., Strappe, P., Barry, F., Murphy, M., O'Toole, D., & O'Brien, T. (2011). Lentiviral vector mediated modification of mesenchymal stem cells & enhanced survival in an in vitro model of ischaemia. *Stem Cell Res Ther*, 2(2), 12.doi:10.1186/scrt53
735. Miranda, T. B., & Jones, P. A. (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol*, 213(2), 384-390.doi:10.1002/jcp.21224
736. Lefaucheur, J. P., Pastoret, C., & Sebille, A. (1995). Phenotype of dystrophinopathy in old mdx mice. *Anat Rec*, 242(1), 70-76.doi:10.1002/ar.1092420109
737. Bostick, B., Shin, J. H., Yue, Y., Wasala, N. B., Lai, Y., & Duan, D. (2012). AAV micro-dystrophin gene therapy alleviates stress-induced cardiac death but not myocardial fibrosis in >21-m-old mdx mice, an end-stage model of Duchenne muscular dystrophy cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*, 53(2), 217-222.doi:10.1016/j.yjmcc.2012.05.002