

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Développement d'un promoteur efficace et muscle spécifique
pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire de
Duchenne

Par
Marilyne Blain

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en Biologie Moléculaire



Février, 2008
©, Marilyne Blain, 2008

Université de Montréal
Faculté de médecine

Ce mémoire intitulé :

Développement d'un promoteur efficace et muscle spécifique
pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire de
Duchenne

Présenté par :
Marilyne Blain

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Muriel Aubry
président-rapporteur

Dr Bernard Massie
directeur de recherche

Dr Rénaud Gilbert
co-directeur de recherche

Dr Ken Hastings
membre du jury

RÉSUMÉ (FRANÇAIS)

Le but de cette maîtrise était de développer un promoteur permettant l'expression efficace et spécifique d'une protéine thérapeutique dans les muscles. Un tel promoteur est essentiel pour traiter, par thérapie génique, une maladie incurable telle que la dystrophie musculaire de Duchenne.

La première partie de ce travail consiste à construire des promoteurs muscles spécifiques puissants à partir des éléments génétiques du gène de l'isoforme lente de la troponine I humaine (TnIS). Les éléments génétiques contrôlant l'expression de la TnIS, une protéine abondante des muscles, sont très bien caractérisés. Un petit activateur (USE) confère la spécificité aux fibres musculaires lentes. Une délétion de 100 pb en position 5' de l'activateur USE crée un activateur (Δ USE) lequel confère une expression dans les fibres musculaires lentes et rapides. Afin d'obtenir une expression efficace et muscle spécifique, plusieurs constructions plasmidiques ont été produites par la fusion d'activateurs USE ou Δ USE au promoteur minimal du gène TnIS. La puissance de ces constructions a été comparée à des promoteurs viraux puissants (CMV et CB) ainsi qu'à d'autres promoteurs muscles spécifiques. Des études de transfections transitoires ont permis de déterminer que l'activité des constructions contenant trois copies du USE ou quatre copies du Δ USE est semblable à celle du CB et plus puissante que celle du CMV. De plus, les promoteurs développés avaient tous une activité très faible dans les cellules non musculaires. Nous avons également démontré que les promoteurs développés sont aussi actifs que les promoteurs viraux de plasmides dans les muscles de souris après électroporation.

La deuxième partie de ce travail consiste à tester l'efficacité de 2 de ces promoteurs à l'aide de vecteurs adénovirus de troisième génération (HDAd) en cultures cellulaires et dans les muscles de souris. Malheureusement, pour une raison encore sous investigation, l'efficacité des HDAd muscles spécifiques était inférieure au contrôle utilisant le promoteur CB. En résumé, la multimérisation des activateurs USE ou Δ USE génère des promoteurs muscles spécifiques puissants. Cependant, leur spécificité musculaire (fibres lentes vs rapides) et leur efficacité à partir de vecteur viraux restent à démontrer.

Mots-clés : thérapie génique, muscle, promoteur, activateur, électroporation, troponine I, transfection, C2C12, adénovirus de troisième génération, dystrophie musculaire de Duchenne.

RÉSUMÉ (ANGLAIS)

Our goal was to develop a strong muscle specific promoter for the expression of a therapeutic protein in skeletal muscles. This type of promoter is essential for the treatment by gene therapy of a fatal disease such as Duchenne muscular dystrophy.

The first part of this work consisted in developing muscles specific promoters derived from the genetic elements of the human slow isoform of troponin I (TnIS). The genetic elements controlling the expression of TnIS, an abundant muscle protein, are relatively well characterized. A small upstream enhancer of 160-bp (USE) confers slow-twitch muscle fiber specificity. A 100-bp deletion at the 5' end of USE, generates a muscle specific enhancer (Δ USE) that confers expression in slow- and fast-twitch muscle fibers. To obtain efficient and muscle specific expression, we generated several constructs containing several copies of USE or Δ USE fused to the minimal promoter of the TnIS gene. The strength of these constructs was compared to strong viral promoters (CMV and CB), and to constructs derived from the genes of muscle specific proteins. Transient transfection studies in cell cultures showed that some of the TnIS constructs containing three USE or four Δ USE were comparable to CB and stronger than CMV. Moreover, these constructs had a very weak activity in the non-muscle cells. We showed that the strength of these constructs was similar to the strength of viral promoters after *in vivo* electroporation of plasmid DNA into mouse muscle.

The second part of this work was to evaluate the strength of these muscle specific promoters in the context of a helper-dependent adenovirus (HDAd) in cell culture and in the *in vivo* mouse muscles. Unfortunately, for an unknown reason, the efficacy of the muscles specific HDAd was lower than the control containing the CB promoter.

In summary, multimerization of USE and Δ USE generated powerful muscle-specific regulatory elements. However, their fiber specificity (slow fiber vs fast) and efficacy using HDAd remain to be shown.

Keys words: Gene therapy, Muscle, Promoter, Enhancer, Electrotransfer, Troponin I, Transfection, C2C12, helper-dependent adenovirus, Duchenne muscular dystrophy.

TABLE DES MATIÈRES

	PAGE
Section 1 : Revue de littérature	
1.1 Le muscle squelettique	2
1.1.1 Anatomie.....	2
1.1.2 Les types de fibres musculaires.....	4
1.1.3 Régénération musculaire.....	6
1.2 La dystrophie musculaire de Duchenne	7
1.2.1 Historique.....	7
1.2.2 La pathologie.....	7
1.2.3 La cause génétique.....	10
1.2.4 La dystrophine.....	10
1.2.5 Les modèles animaux.....	16
1.2.6 Les thérapies.....	18
1.3 Les promoteurs muscles spécifiques	30
1.4 L'importance des introns pour l'expression génique	35
1.5 Les objectifs	36
Section 2 : Matériel et méthode	
2.1 Construction des plasmides.....	38
2.2 Production des plasmides	50
2.3 Cultures cellulaires.....	51
2.4 Transfection transitoire.....	53
2.5 Électroporation de souris CD1	53
2.6 Production d'adénovirus recombinants.....	54
2.7 Amplification des virus	55
2.8 Purification des virus.....	56
2.9 Titration des virus HDAd.....	58
2.10 Titration du virus auxiliaire.....	58
2.11 Cytofluorométrie de flux	59
2.12 Infection des cellules avec les HDAd.....	59
2.13 Injection de souris CD1	59
2.14 Dosage de protéines.....	60
2.15 Dosage de la phosphatase alcaline	60
2.16 Dosage de la β -galactosidase.....	61
2.17 Coloration au X-gal.....	62
2.18 Microphotographies.....	62
2.19 Analyses statistiques.....	63

Section 3 : Résultats

3.1 Développement de promoteurs efficaces et muscles spécifiques.....	65
3.1.1 Description des constructions plasmidiques.....	65
3.1.2 Effet de la modification de l'ATG intronique du pCMV β	68
3.1.3 Puissance des promoteurs muscles spécifiques TnIF et TnIS en cultures cellulaires.....	69
3.1.4 Effet de la multimérisation des activateurs USE et Δ USE <i>in vitro</i> ...	71
3.1.5 Puissance des promoteurs muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 dans des cultures de cellules non musculaires.....	82
3.2 Puissance des promoteurs muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 <i>in vivo</i> . 84	
3.2.1 Étude d'électroporation chez les souris CD1.....	84
3.3 Puissance des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3.....	87
3.3.1 Étude de l'activité des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 <i>in vitro</i>	87
3.4 Puissance des HDAd <i>in vivo</i>	94
3.4.1 Étude de l'efficacité des HDAd chez les souris CD1.....	94

Section 4 : Discussion

4.2 Conclusion.....	114
---------------------	-----

Références

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1	Structure du muscle squelettique	3
2	Structure d'un filament fin d'actine	4
3	Schéma du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine	12
4	Vecteur adénovirus utilisant le gène dys	24
5	Mécanisme de recombinaison de la recombinaise FLPe	25
6	Structure de l'adénovirus auxiliaire	26
7	Structure de l'activateur USE	34
8	Carte générale des constructions plasmidiques	38
9	Construction contrôle : constructions dérivées de promoteurs muscles spécifiques et viraux utilisés comme contrôle	66
10	Structure des constructions dérivées du gène de l'isoforme lente de la troponine I humaine	67
11	Structure de l'activateur tronqué du Δ USE	67
12	Comparaison de l'activité du promoteur CMV avec l'intron modifié ou l'intron original dans les cellules 293A	68
13	Comparaison de l'activité des promoteurs MCK, TnIF(-) et USEx1 dans les cellules 293A	70
14	Comparaison de l'activité des promoteurs MCK, TnIF(-) et USEx1 dans les cellules C2C12 myotubes	71
15	Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx2, Δ USEx1 et Δ USEx1(-) dans les cellules C2C12 myoblastes	73
16	Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx2, Δ USEx1 et Δ USEx1(-) dans les cellules C2C12 myotubes	74
17	Comparaison de l'activité des promoteurs USEx2, USEx3, Δ USEx2, Δ USEx3 et Δ USEx2(-) dans les cellules C2C12 myotubes	76
18	Comparaison de l'activité des promoteurs USEx3, Δ USEx3, Δ USEx4 et TnIF(+) dans les cellules C2C12 myotubes	77
19	Distribution de la β -gal dans les cultures de cellules C2C12 myotubes	79
20	Comparaison de l'activité des promoteurs USEx3, USEx4, USEx5, Δ USEx3 et Δ USEx4 dans les cellules C2C12 myotubes	80
21	Distribution de la β -gal dans les cultures de cellules C2C12 myotubes	81
22	Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules A549	83
23	Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules HeLa S3	83
24	Distribution de la β -gal suite à l'électroporation des plasmides USEx3 et Δ USEx3 dans les muscles de souris CD1	85
25	Distribution de la β -gal dans le muscle TA de souris CD1	86
26	Structure générale des HDAd développés	87

27	Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules A549	89
28	Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules HeLa S3	90
29	Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules C2C12 myoblastes	91
30	Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules C2C12 myotubes	93
31	Distribution de la β -gal dans les cultures de cellules C2C12 myotubes	93
32	Distribution de la β -gal suite à l'injection des HDAd CBLacZ et USEx3 dans le muscle TA des souris CD1	95
33	Distribution de la β -gal dans le muscle TA de souris CD1	96
34	Structure générale des HDAd développés	110

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Comparaison des titres en particules totales ainsi que du pourcentage de contamination du virus auxiliaire chez les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 et Δ USEx3	88
-----------	--	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

% : pourcentage
 ΔUSE : activateur en amont tronqué du gène TnIS
 β-gal : β-galactosidase
 μg : microgramme
 μL : microlitre
 aa : acide aminé
 AAV : virus associé aux adénovirus
 Ad : adénovirus
 Adv : vecteurs adénoviraux de première génération
 ADN : acide désoxyribonucléique
 ADNc : ADN complémentaire
 ADP : Adénosine 5'-diphosphate
 ARN : acide ribonucléique
 ATP : Adénosine 5'-triphosphate
 CsCl : chlorure de césium
 CAD : complexe glycoprotéique associé à la dystrophine
 CB : promoteur hybride de la β-actine de volaille
 CMV : cytomégalovirus
 CPA : cellules présentatrice d'antigène
 DG: dystroglycan
 DMB: dystrophie musculaire de Becker
 DMEM: dulbecco's Modified Eagle's Medium
 DMD : dystrophie musculaire de Duchenne
E. coli : *Escherichia coli*
 ES(M) : erreur standard de la mesure
 HDAd : adénovirus de troisième génération (helper-dependent adenovirus)
 kDa : kilodaltons
 IGF-1: Insulin-like growth factor
 IRE : élément régulateur interne (activateur)
 ITR : séquences répétées terminales inversées
 MCK : créatine kinase musculaire
 Milieu LB : milieu Luria-Bertani
 mL : millilitre
 MOI : multiplicité d'infection, multiplicity of infection,
 Pb : paires de bases
 PCR : réaction de polymérisation en chaîne
 PBS : tampon phosphate salin
 pH : potentiel d'hydrogène
 SEAP : phosphatase alcaline sécrétée
 Souris *mdx* : souris déficiente en dystrophine
 TA : muscle tibialis
 TnIF : isoforme rapide de la troponine I
 TnIS : isoforme lente de la troponine I
 USE : activateur en amont lent du gène TnIS
 VLB : tampon de lyse de virion
 X-gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-galactopyranoside

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier particulièrement les Docteurs Bernard Massie et Rénaud Gilbert pour m'avoir permis d'effectuer mes études supérieures au sein de leur laboratoire ainsi que pour toute l'aide et les conseils dont ils m'ont fait bénéficier tout au long de ma maîtrise. Grâce à eux, j'ai eu l'opportunité de faire mes études au cœur d'un environnement stimulant. J'ai pu acquérir d'innombrables connaissances tout en cotoyant des gens expérimentés et aimables. Je tiens également à remercier Claire Guilbault, Antoine Caron et Félix Malenfant pour leur aide technique. Un merci spécial à Amélie Pilotte, Medhi Bendjelloul et Marc-André Robert ainsi que tous les autres membres du laboratoire du Docteur Massie pour les conseils et l'aide apportée. Chacun d'entre eux a participé de près ou de loin à la réussite de cette maîtrise. Finalement, je voudrais remercier également l'équipe du Docteur George Karpati pour son apport technique quant aux expérimentations *in vivo*.

Merci à mes parents. Ces années d'études n'ont pas été de tout repos et vous avez toujours été à mes côtés pour me supporter tant financièrement que moralement. L'éducation que vous m'avez donnée tout au long de ces années m'a permis de me rendre au bout de mon rêve aujourd'hui. Je n'y serais pas arrivée sans vous ! Merci également à mes frères et à mes amis, particulièrement à Caroline. Vous m'avez encouragée et soutenue lorsque je ne voyais pas la lumière au bout du tunnel. Merci aussi à Sylvie Charbonneau pour sa participation à la correction orthographique de ce document. Un merci tout particulier à mon amoureux, Charles-David, qui a partagé mes joies et mes peines au cours de ces années. Il a supporté mes larmes lorsque mes fichiers informatiques étaient corrompus. Il a su ensoleiller ma vie au moment où j'en avais le plus besoin. MERCI, MERCI à tous.

Finalement, je m'en voudrais de passer sous silence les organismes subventionnaires qui ont contribué à la réalisation de ce projet :

- Instituts de recherche en santé du Canada (IRSC);
- Département de biologie moléculaire.

Section 1 :
Revue de littérature

1.1 Le muscle squelettique

1.1.1 Anatomie

Chacun des mouvements volontaires du corps est sous le contrôle des cellules musculosquelettiques. Le muscle squelettique des vertébrés est constitué d'un faisceau de fibres parallèles que l'on nomme fibres musculaires. Ces longues fibres multinucléées et cylindriques ont un diamètre variant de 10 à 100 μm et une longueur pouvant atteindre jusqu'à 30 cm (1). La fibre musculaire est elle-même composée de myofibrilles, de mitochondries et de réticulum endoplasmique (1). Les myofibrilles sont constituées de plusieurs structures contractiles dont les myofilaments (figure 1). Les fibres musculaires sont formées suite à la fusion des précurseurs des fibres musculosquelettiques, les myoblastes, eux-mêmes dérivés des somites lors du développement embryonnaire. Suite à une période de prolifération, les myoblastes se différencient changeant ainsi de phénotype. Lors de cette différenciation, les myoblastes se fusionnent à des fibres musculosquelettiques multinucléées nommées myotubes. Ce processus de fusion implique des molécules d'adhésion spécifiques. Lorsque la différenciation est terminée, les cellules ne pourront plus répliquer leur génome, ni se diviser (2). De plus, les fibres vont exprimer des gènes spécifiques pour les muscles (3). Suite à la formation de la lamine basale, les cellules satellites seront visibles au pourtour de la fibre musculaire. Ces cellules satellites sont des cellules mononucléées impliquées dans le processus de régénération musculaire. Les cellules satellites sont dans une phase quiescente jusqu'à ce qu'elles soient activées lors de dommages musculaires.

isoformes est encodé par un gène distinctif (6-8). La TnIS sera exprimée majoritairement lors du développement foetal précoce des muscles squelettiques tandis que l'isoforme rapide sera exprimé dans tous les myotubes durant le développement foetal tardif et néonatal. Finalement, l'expression spécifique au type de fibres sera établie lors de la croissance néonatale (9). Il a été démontré que l'expression des différents isoformes de la TnI est régulée par des régions présentes en position 5' de leur gène respectif.

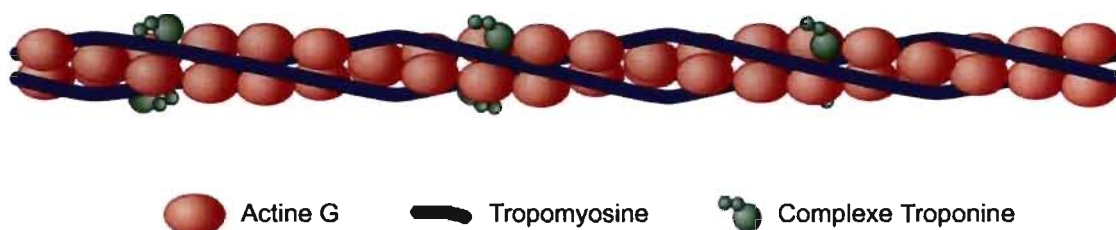


Figure 2 : Structure d'un filament fin d'actine

Le complexe de la troponine est composé de trois sous-unités, la troponine I, la troponine C et la troponine T.

Figure adaptée du Professeur Aristide Lafleur.

1.1.2 Les types de fibres musculaires

Les fibres musculaires ont connu de nombreux systèmes de classification. Dans les années 70, Padykula et Ganthier ont suggéré une classification des fibres basée sur la morphologie et le contenu en mitochondrie (10). Plus tard, Dubowitz, grâce à l'étude de l'histochimie des pathologies musculaires, a établi un nouveau système de classification. Les fibres musculaires sont désormais classées en 2 catégories; type I et type II (10). Les fibres sont distinguées selon leur métabolisme, c'est-à-dire leur teneur en enzymes oxydatives et glycolytiques, en phosphorylase ainsi que leur activité ATPasique (adénosine-triphosphatase). Cette classification repose aussi sur le polymorphisme des chaînes lourdes de la myosine (MHC = Myosin Heavy Chain) (11). La classification va ainsi :

Fibres de type I : fibres oxydatives à **contraction lente** et résistantes à la fatigue. Elles contiennent l'isoforme de Type I de la MHC. Ces fibres contiennent un taux de phosphorylase et une activité ATPasique faible. Elles scindent donc lentement l'ATP

(adénosine-triphosphate). Elles ont un diamètre moyen d'environ 58 μm chez les femmes et 62 μm chez les hommes (10). Ces fibres sont très sollicitées lors de mouvements répétitifs et demandant beaucoup d'endurance. Chez l'homme, ces fibres se retrouvent majoritairement dans les muscles posturaux et dans les muscles des jambes d'un coureur de fond. Chez la souris, le soleus est un muscle constitué de fibres de type I dans une proportion d'environ 50%.

Fibres de type IIA : fibres oxydatives et glycolytiques à **contraction rapide** et résistantes à la fatigue. Elles contiennent l'isoforme de Type IIA de la MHC. Ces fibres ont une activité ATPasique élevée ainsi qu'un diamètre moyen d'environ 50 μm chez les femmes et 69 μm chez les hommes (10).

Fibres de type IIB : fibres glycolytiques à **contraction rapide** et sensibles à la fatigue. Elles contiennent l'isoforme de Type IIB de la MHC. Elles ont un diamètre très large et une activité ATPasique élevée.

Un troisième type de fibres de type II peut être retrouvé soit les fibres de type IIX (11). Habituellement, le pourcentage de ces fibres au sein d'un muscle est faible puisque, lors d'un entraînement physique quelconque, elles sont converties en fibres de type IIB (12). Tel que mentionné précédemment, les fibres musculaires peuvent aussi être distinguées selon leur métabolisme. Les fibres oxydatives produiront de l'énergie selon le système aérobique. À l'opposé, les fibres glycolytiques produisent leur énergie grâce au système anaérobique. Ces fibres réagissent donc rapidement à l'effort en utilisant rapidement leur réserve de glycogène (12). Chez l'homme, chacun des muscles squelettiques est constitué d'une combinaison des divers types de fibres. Dans un muscle squelettique, les cellules musculaires sont regroupées en une unité motrice qui ne contient qu'un seul type de fibres. L'unité motrice est formée par un seul neurone moteur ainsi que les fibres qu'il régite. Lorsque le neurone envoie un signal, toutes les fibres constituant l'unité motrice se contracte simultanément.

1.1.3 Régénération musculaire

Le muscle squelettique a la capacité de se régénérer lors de dommages. La régénération musculaire sera toujours effectuée par le même processus indépendamment du type de traumatisme (13). La régénération musculaire est effectuée en deux étapes successives; la phase initiale non inflammatoire et la phase de dégénérescence inflammatoire. La phase initiale non inflammatoire se limite aux minutes suivant le traumatisme et elle se caractérise par l'entrée de calcium extracellulaire et par la désintégration des organites cellulaires. La phase de dégénérescence inflammatoire est caractérisée par l'envahissement des cellules immunitaires au site de dommages. Les macrophages présents au site de dégénérescence émettent des produits chimio-attractants qui attireront les myoblastes dérivés des cellules satellites. Tel que mentionné auparavant, les cellules satellites sont des cellules mononucléées localisées entre la lamine basale des fibres musculaires et le sarcolemme. Lors de dommages musculaires, les cellules satellites seront rapidement activées et elles proliféreront. Une partie des cellules issues de cette prolifération retrouveront leur état de cellules quiescentes ce qui permettra de maintenir le bassin de cellules progénitrices. La seconde partie poursuivra sa différenciation en myoblastes. Trois jours suivant l'activation, les myoblastes dérivés des cellules satellites entreront dans une phase de prolifération. L'ancienne lamine basale se désintégrera et les myotubes formés par la fusion des myoblastes formeront une nouvelle lame basale. Les myotubes se distinguent des myoblastes par leurs nombreux noyaux.

1.2 La dystrophie musculaire de Duchenne

1.2.1 Historique

La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) a été caractérisée en 1861 par le physiologiste Duchenne de Boulogne (Guillaume Benjamin Amand Duchenne, 1806-1875). Il fut le premier à attribuer les symptômes de cette pathologie à une famille de myopathie particulière (14). Cette pathologie porte son nom, même si deux médecins, William John Little (1810-1894) et Edward Meyron (1807-1880) ont préalablement décrit cette maladie dans les années 1850. Duchenne attribua les symptômes de cette maladie à un désordre cérébral et lui donna l'appellation de «paralysie hypertrophique de l'enfance». Environ sept ans plus tard, en 1868, il établit que cette maladie était reliée au système musculosquelettique suite à l'observation de plusieurs cas de cette dernière (14). Duchenne fut le premier à initier des recherches cliniques sur des patients atteints de cette maladie (15). Parmi ses nombreuses découvertes, il décrivit le remplacement du tissu musculaire par du tissu fibreux grâce à des biopsies musculaires. Ses nombreux travaux lui ont valu l'attribution de son nom à cette pathologie.

Près de 20 ans s'écoulaient avant que l'on attribue cette maladie à une cause génétique. En effet, en 1886, Gowers (William Richard Gowers, 1845-1915) observa que les cas isolés de dystrophie étaient de faible pourcentage par rapport aux cas familiaux dont la famille maternelle avait des antécédents en cette matière. Il parvint donc à démontrer le caractère héréditaire de cette maladie. Il observa aussi que les garçons étaient plus touchés par cette myopathie. Il y a maintenant plus de 20 ans, en 1986, le gène responsable pour la dystrophie musculaire de Duchenne était identifié (16). Un an plus tard, la protéine codée par ce gène, la dystrophine, était à son tour identifiée (17).

1.2.2 La pathologie

La DMD est la plus commune des maladies neuromusculaires récessives liées au chromosome X. Par conséquent, les garçons sont généralement les seuls à souffrir de cette maladie (15). Elle affecte les populations mondiales avec une incidence d'un

homme à toutes les 3 500 naissances (15). Les patients sont, dans les premières années de leur vie, cliniquement normaux. Toutefois, des analyses histologiques et sanguines peuvent révéler chez certains une nécrose des fibres musculaires ainsi qu'un niveau anormalement élevé d'isoformes de créatines kinases sériques (18). Les créatines kinases interviennent lors de l'effort musculaire. Lorsqu'il y a une accumulation d'ADP, cet enzyme la catalyse en ATP. Lors de la dégénérescence des fibres musculaires, la créatine kinase est libérée dans le sang, d'où son taux élevé chez les patients souffrant de la DMD.

Les premiers signes de faiblesse musculaire sont caractérisés par une démarche chancelante, des chutes fréquentes, une difficulté à courir, un élargissement des muscles du mollet, un accroissement de la courbure convexe de la colonne vertébrale ainsi qu'une difficulté à monter les escaliers (19-21). Ces premiers symptômes de la maladie peuvent être observés vers l'âge d'environ 2 à 5 ans (19-21). Subséquemment, s'ensuivent une pseudohypertrophie des muscles du mollet et une faiblesse des membres proximaux. La dégénérescence affectant initialement les muscles proximaux, progressera vers une faiblesse des muscles des membres inférieurs. La progression de la maladie sera constante tout au long de la vie du patient. Vers l'âge d'environ 12 ans, on observe une perte de mobilité et les patients devront utiliser un fauteuil roulant pour leurs déplacements (15;22). La pathologie est due au remplacement des muscles endommagés par des tissus conjonctifs et fibreux, ce qui aura pour conséquence la diminution de la fonctionnalité des muscles. Dans les muscles des patients atteints de la DMD, la régénération musculaire diminuera graduellement et le cycle normal de dégénérescence et de régénération ne sera plus en équilibre. La dégénérescence sera plus importante que la régénération. Dans les muscles atteints, les cycles de nécrose et de réparation continueront après le développement de l'enfant jusqu'à ce que la réserve de cellules satellites ne puisse plus compenser la destruction des fibres (23). De plus, l'activation de plusieurs processus pathophysiologiques converge vers une altération du calcium intracellulaire (24). Cette altération est due à une modification de la perméabilité des fibres entraînant une entrée massive d'ions calciques. Chez les patients diagnostiqués avec la DMD et les souris *mdx*, les niveaux de calcium intracellulaire sont élevés en comparaison à des contrôles (25;26). L'augmentation en ions calciques résulte en

une hyperactivité des cascades de signalisation impliquées dans la réponse inflammatoire (27). Cette sensibilité des muscles atteints par la DMD peut être nuisible pour la survie du muscle. L'entrée massive d'ions augmente la dégradation des protéines. La membrane musculaire affaiblie ne résistera plus à la contraction musculaire.

Au stade le plus avancé, tous les muscles squelettiques sont touchés ce qui conduit à une contracture articulaire et une cyphoscoliose progressive. Inévitablement, les muscles respiratoires seront eux aussi affectés. Les échanges gazeux seront alors de plus en plus difficiles. Le décès des patients est causé par la rétention du monoxyde de carbone et à une anoxémie. Dans 10% à 40% des cas, le décès survient suite à une insuffisance du muscle cardiaque, lui aussi touché par la nécrose musculaire (28). Les patients atteints de la DMD décèdent habituellement vers la fin de l'adolescence ou au début de la vingtaine (15). Des mesures telles que la stabilisation de la colonne vertébrale, le port de prothèses orthopédiques et des mécanismes favorisant la ventilation sont des mesures qui peuvent améliorer la qualité de vie des patients. Cette maladie dévastatrice, malgré 150 ans de recherches, est encore, à ce jour, incurable.

Bien que les hommes soient majoritairement les seuls à être touchés par cette myopathie, certaines femmes peuvent aussi en être affectées. Les femmes porteuses du gène de la DMD sont habituellement asymptomatiques puisqu'elles possèdent deux chromosomes X. On dénote toutefois un taux élevé de créatine kinase sérique chez 66 % d'entre elles (29). Quelques cas de femmes atteintes de la DMD ont été rapportés au fil des ans. Elles sont généralement atteintes du syndrome de Turner (XO) ou de Turner mosaïque (X/XX ou X/XX/XXX). La DMD peut également être la conséquence d'une structure anormale, d'une translocation autosomale sur le chromosome X ou de l'inactivation sur le chromosome X normal entraînant ainsi l'expression du gène muté présent sur le second chromosome X (30-34). Dans un cas sur 10 000, l'anomalie est attribuable à une nouvelle mutation dans le gène de la dystrophine (35-37). Les femmes atteintes de la DMD présentent des symptômes moindres que les hommes et les symptômes débutent habituellement

vers l'âge adulte (29). Ces femmes présentent des symptômes tels qu'un déficit moteur des membres inférieurs avec une pseudo-hypertrophie musculaire des mollets.

1.2.3 La cause génétique

L'identification du locus de la DMD (1986) et de son produit, la dystrophine (1987) par le groupe de Kunkel, a conduit à l'amélioration de l'établissement du diagnostic et de l'identification des porteurs du gène. Cette découverte a aussi permis de grandes avancées dans la recherche contre cette maladie.

Le gène de la DMD encode la protéine de la dystrophine. La présence de mutations dans ce gène résulte en une absence ou une expression d'une forme mutante de la protéine causant ainsi le phénotype de la maladie (17). Chez l'humain, le gène de la dystrophine se situe sur le chromosome X, sur le locus Xp21 plus précisément. La séquence de ce gène fait environ 2,5 mégabases d'ADN, ce qui en fait le plus grand gène identifié à ce jour. Le gène de la dystrophine occupe environ 2% du chromosome X et environ 0,05% du génome humain entier (15). Ce gène est composé de 79 exons dont le transcrit codant est d'environ 14 kilobases. Ce transcrit est exprimé principalement dans les muscles lisses, squelettiques et cardiaque (38-40). L'extrême longueur du gène de la dystrophine pourrait expliquer la fréquence relativement élevée du nombre de mutations ainsi que l'incidence élevée de la DMD (41).

1.2.4 La dystrophine

Le gène de la DMD, dû à sa grande taille, peut produire plusieurs isoformes de la dystrophine grâce à l'usage de sept promoteurs alternatifs et à l'épissage alternatif du pré-ARN messager. Dans les muscles squelettiques et cardiaque normaux, l'un des promoteurs code l'isoforme prédominant de la dystrophine. Cet isoforme, de 427kDa est dit isoforme «intégral» ou «complet». Il comprend quatre domaines structuraux. Deux seconds isoformes de la dystrophine, exprimés au niveau du cerveau, sont aussi qualifiés de «complets» (42;43).

La dystrophine fait partie de la super famille des spectrines (44;45). Des études de similarité de la séquence de la dystrophine avec d'autres protéines ainsi que

des analyses sur sa séquence en acides aminés, prédisent que la dystrophine de 427kDa sera de forme allongée et divisée en quatre domaines structuraux.

1. Le premier domaine N-terminal de liaison à l'actine est constitué de 240 acides aminés. Celui-ci possède une homologie de séquence avec le domaine de liaison de l' α -actinine. Il permet de lier la dystrophine à l'actine du cytosquelette (44-46).
2. Le domaine central compose la partie majeure de la protéine. Celui-ci est composé de 2 400 acides aminés et il comprend 25 (47) séquences répétées en forme de triple hélices, ressemblant à la spectrine, interrompue par des régions riches en proline qui sont responsables de sa flexibilité (44;48).
3. Le domaine riche en cystéine (exon 62 à 70) d'environ 280 acides aminés, contient deux motifs «EF-Hand», liés par des domaines WW (49) et ZZ (50). Ce dernier forme un complexe avec la protéine β -dystroglycan du complexe associé à la dystrophine.
4. Le domaine carboxy-terminal, contenant 420 acides aminés, est homologue à l'utrophine, une protéine encodée sur le chromosome 6 (51-53). Le domaine carboxy-terminal, tout comme le domaine riche en cystéine, est essentiel pour la liaison au complexe associé à la dystrophine (54-57).

On retrouve aussi quatre autres isoformes contenant seulement le premier exon du gène de la DMD produisant des dystrophines de 260 kDa (58), 140 kDa (59), 116 kDa (60) et 71 kDa (61;62). Ces isoformes sont exprimés dans différents types cellulaires telles que les cellules de Purkinje (43), les cellules gliales (43;63;64), les cellules de Schwann (60), dans certaines parties du cortex cérébral (42;65;66) ainsi que dans plusieurs organes du corps (23;62;67;68). Plusieurs isoformes de la dystrophine peuvent se retrouver un sein d'un même type cellulaire ou tissulaire à l'exception de l'isoforme de 71kDa qui n'est pas exprimé dans les muscles squelettiques (68).

La dystrophine complète de 427 kDa s'accumule sous la surface cytoplasmique du sarcoplasme des fibres musculaires squelettiques en association avec un complexe de protéines qui permet de connecter le cytosquelette de filaments

d'actine du cytosol à la matrice extracellulaire en traversant le sarcolemme (figure 3) (15;69). La dystrophine présente aussi une expression croissante aux jonctions myotendineuses et à la membrane postsynaptique des jonctions neuromusculaires (69-71). L'expression de la dystrophine est observée dans les myotubes suite à la différenciation et à la fusion des myoblastes (66;72).

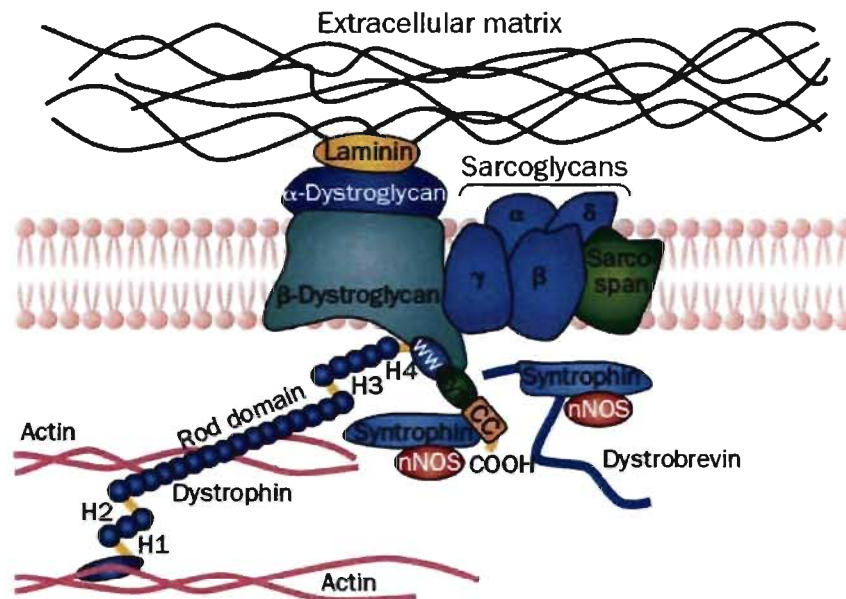


Figure 3 : Schéma du complexe glycoprotéique associé à la dystrophine

La région C-terminale de la dystrophine se lie aux autres protéines du complexe associé à la dystrophine tandis que la région N-terminale se lie à l'actine du cytosquelette. L'interaction et l'organisation entre les protéines du CAD supportent l'hypothèse selon laquelle la dystrophine sert de lien entre le réseau de microfilaments d'actine intracellulaire et la matrice extracellulaire via le CAD. Figure Kapsa *et al*, Lancet Neurology 2003 (23).

Bien que la fonction précise de la dystrophine soit encore inconnue à ce jour, l'absence de cette protéine cause une instabilité au niveau du sarcolemme. Cette instabilité conduit à une déstabilisation de la membrane de la cellule musculaire, à une faiblesse musculaire (73;74) ainsi qu'à une nécrose tissulaire (75). Il semble que le rôle majeur de la dystrophine serait de stabiliser le sarcolemme puisque lorsque l'on exprime l'ADN complémentaire de la dystrophine chez la souris *mdx*, les symptômes de fragilité du sarcolemme, de faiblesse musculaire ainsi que de nécrose sont corrigés (73). La dystrophine a aussi pour fonction d'intervenir lors de la transmission de la force contractile entre les domaines extra et intracellulaires de fibres musculaires ainsi qu'une fonction organisationnelle de domaines membranaires spécialisés dans les tissus non contractiles (68).

1.2.4.1 Les mutations

Il existe deux grands types de mutations dans le gène de la dystrophine : les réarrangements de larges sections (délétions intragéniques ou duplications) et les mutations impliquant un faible nombre de nucléotides (mutations ponctuelles ou microdélétions). Toutes ces mutations affectent l'expression du domaine riche en cystéine de la dystrophine (23).

Les réarrangements de larges sections sont retrouvés dans 60 à 65 % des cas de DMD. Ils sont dûs à un réarrangement inégal au niveau des introns du gène (76-79). Bien que les délétions surviennent aléatoirement dans le gène de la dystrophine, deux «points chauds» sont connus; l'un se retrouve dans le domaine central (exon 45-55) et le second, dans la partie 5'(exon 2-19) (80-83). Les duplications partielles surviennent dans environ 6% (Amérique du Nord) (84) ou 14% (Japon) (85) des cas de mutations. Elles ont pour conséquence l'absence complète de la protéine au sarcoplasme musculaire chez plusieurs patients atteints de la DMD et chez plusieurs modèles animaux incluant la souris *mdx* (17).

Dans 30% ou 41% des cas de DMD, la mutation est de taille beaucoup moins importante (délétion dans un nucléotide (86), délétion de 32 paires de bases (87) ou une mutation ponctuelle) mais les conséquences sont toutes aussi importantes (23;79;88-90). Ces petites mutations auront pour effet un changement de cadre de lecture de la protéine. La dystrophine ne sera plus fonctionnelle.

Bien que la taille de la mutation ne soit pas le facteur déterminant de la sévérité de la maladie, il existe une corrélation entre les types de mutations et la sévérité (91). L'analyse des délétions du gène de la dystrophine des patients atteints de la DMD a démontré que le domaine N-terminal de liaison à l'actine, le domaine riche en cystéine ainsi que le domaine carboxy-terminal sont essentiels pour la fonctionnalité de la dystrophine puisque, la liaison entre la dystrophine et son complexe associé est impossible sans leur présence (55;57). Il a aussi été démontré que le domaine central de la protéine peut s'adapter à de larges délétions qui n'affectent pas le cadre de lecture. Le domaine central agirait comme un «espaceur» entre le domaine de liaison à l'actine et les domaines riches en cystéine et carboxy-

terminal. Les délétions survenant dans le domaine central diminueront simplement l'espace entre les domaines essentiels.

Tel que mentionné, les mutations causant la DMD résultent en une absence ou une réduction sévère de la dystrophine. Toutefois, certaines mutations préservent le domaine riche en cystéine, ce qui résulte en une expression semi-fonctionnelle de la dystrophine (17;23). Ces mutations causent le phénotype de la dystrophie musculaire de Becker (BMD). La BMD se distingue de la DMD par ses symptômes beaucoup moins sévères, une progression plus lente ainsi qu'une nécrose musculaire moins importante (92).

1.2.4.2 Complexe glycoprotéique associé à la dystrophine

La dystrophine fait partie d'un groupe de 18 macromolécules de protéines. Ce complexe est nommé «complexe glycoprotéique associé à la dystrophine» (CAD) (figure 3). Le CAD joue un rôle très important dans les dystrophies musculaires puisque des mutations dans ces diverses protéines peuvent conduire vers d'autres formes de dystrophies musculaires (93-95). L'interaction et l'organisation entre les divers composants supportent l'hypothèse selon laquelle la dystrophine sert de lien entre le réseau de microfilaments d'actine intracellulaire et la matrice extracellulaire (56;96). Le CAD est composé, entre autres, de la dystrophine, de dystroglycans (α - et β -DG), de sarcoglycans (α -, β -, δ -, ϵ -, γ -), de sarcospans, de syntrophines (α -1, β -1 et β -2) et de dystrobrevines.

Le dystroglycan est encodé par un seul gène codant une protéine précurseure qui est rapidement clivée en deux sous-unités α - et β -DG (97;98). L' α -DG (156kDa) lie les composants de la matrice extracellulaire telle que la laminine, faisant ainsi le lien entre le cytosquelette interne et la matrice extracellulaire (56). Le cytodomaine du β -DG (43 kDa) contient plusieurs résidus prolines qui permettent une liaison à la dystrophine via ses domaines WW (54), «EF- hand» et ZZ (99). Le rôle du DG est de former le lien entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire. De plus, il assure la stabilité de la membrane plasmidique (100). Les protéines composant le sarcoglycan sont des petites glycoprotéines transmembranaires qui s'assemblent pour former un complexe tétramérique (figure 3) (101). Bien que la fonction du complexe

ne soit pas élucidée, le tétramère semble renforcer l'interaction entre le β -DG, l' α -DG et la dystrophine (101). Les protéines dystrobrevines (88 kDa) et la syntrophine (59 kDa) sont des protéines cytoplasmiques qui se lient l'une à l'autre en plus de se lier au domaine carboxy-terminal de la dystrophine (102).

Suite à des études immunohistochimiques, il a été déterminé qu'il y a une diminution considérable ou une absence complète des protéines du CAD dans le sarcoplasme des patients atteints de DMD. Cette diminution importante est le résultat de l'absence de dystrophine (103). La localisation au sarcoplasme des protéines du CAD est aussi affectée, bien que ces protéines soient transcrites et traduites. L'absence de lien physique entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule musculaire rend le sarcoplasme fragile, rendant les fibres musculaires susceptibles à la dégénérescence au cours des cycles répétés de contraction et de relaxation du muscle.

1.2.4.3 Rôles du CAD

Bien que le CAD ait plusieurs fonctions, son rôle principal est de stabiliser le sarcoplasme et d'assurer la protection des fibres musculaires des dommages encourus suite à une contraction à long terme et lors de la nécrose (104-108). De plus, le CAD jouerait un rôle dans la communication cellulaire en agissant comme un complexe de signalisation transmembranaire (105;109;110). Cette fonction serait très importante dans la stimulation de la cascade de signalisation appropriée lors de réponses à des stimulus extracellulaires (22). La dystrophine étant absente chez les patients atteints de la DMD, les événements de signalisation seront altérés dans un muscle atteint, ce qui contribue à la pathologie.

La dystrophine et les protéines du CAD semblent avoir des fonctions essentielles pour la survie des fibres musculaires, bien que le rôle spécifique de chacune des protéines du CAD ne soit pas encore déterminé à ce jour. Plusieurs rôles non structuraux ont été décrits pour la dystrophine. Par exemple, la localisation de la dystrophine et du CAD au sarcoplasme les positionnent en un endroit idéal pour servir de protéines d'échafaudages lors de réponses au stress cellulaire. Plusieurs protéines de signalisation telles que NOS, grb2 et la diacylglycérole kinase interagissent avec les composants du CAD (111-113).

1.2.5 Les modèles animaux

Les modèles animaux utilisés pour la DMD ont des mutations dans le gène de la dystrophine et une présentation biochimique dystrophinopatique similaire à celle observée chez l'humain. Les principaux modèles animaux sont la souris *mdx* ainsi que le Golden Retriever. On retrouve aussi des modèles animaux chez d'autres races canines, chez les félins ainsi que chez *Danio danio* et *Caenorhabditis elegans*.

1.2.5.1 La souris *mdx*

En raison de sa grande disponibilité et des faibles coûts de reproduction, les souris déficientes en dystrophine (souris C57Bl/10ScSn *mdx* (*mdx*)) sont les modèles animaux privilégiés lors d'études portant sur les fonctions, la thérapie génique et pharmaceutique de la DMD. La souris *mdx* est dérivée d'un mutant naturel d'une colonie de C57Bl/10. Elle présente une mutation dans la région 5', un changement d'un nucléotide C pour T à la position 3185, dans le transcrit d'ARNm de la dystrophine (114). Le codon glutamine CAA est alors converti en codon d'arrêt TAA, ce qui conduit à la production d'une protéine tronquée et instable tout comme chez les patients atteints de la DMD. L'analyse des muscles des souris *mdx* a démontré la perte du CAD à la membrane musculaire (114-117).

Malgré la déficience en dystrophine des souris *mdx*, les signes caractéristiques de la pathologie dystrophique humaine sont moins évidents. Elles vivent normalement et ont une espérance de vie d'environ deux ans (115). Malgré tout, on observe chez ces souris, entre la deuxième et la huitième semaine de vie, une dégénérescence au niveau musculaire ayant pour conséquence la présence d'un niveau élevé dans la circulation sanguine de protéines musculaires, telles que la créatine et la pyruvate kinase (115). La souris *mdx* a des fonctions de régénération qui compensent pour les cycles de dégénérescence contrairement à ce qui est observé chez l'humain atteint de la DMD chez qui, le muscle endommagé est progressivement remplacé par du tissu fibreux. Les muscles des souris *mdx* sont caractérisés par des fibres au noyau central, ce qui indique une régénération musculaire. Lorsque les souris sont âgées de 18 mois, elles perdent leur capacité de régénération musculaire. Les muscles du diaphragme sont alors remplacés par du tissu fibreux et des lipides

(118). Tout comme chez les patients atteints de la DMD, l'analyse des muscles des souris *mdx* a démontré la perte du CAD à la membrane musculaire. La souris *mdx* a été fortement utilisée lors de recherches visant à évaluer le potentiel des différentes approches thérapeutiques développées pour traiter la DMD.

Le désavantage de l'utilisation de ce modèle animal réside dans son inutilité lors d'études sur certains aspects de la DMD tels que les problèmes liés à la dimension des muscles humains. La pathologie observée étant différente des patients atteints de la DMD, la souris *mdx* n'est pas un bon substitut pour les études cliniques.

1.2.5.2 La dystrophie musculaire canine

Des mutations spontanées sur le gène de la dystrophine résultent en une dystrophie musculaire canine liée au chromosome X. Cette mutation, changement d'une base A pour G à l'extrémité 3' dans le site d'épissage de l'intron 6, a été identifiée chez les Golden Retrievers, les Rottweilers et les Braques allemands (119;120). Un modèle animal Beagle a aussi été développé (121). La dystrophie musculaire du Golden Retriever (GRMD) est la plus étudiée et la mieux caractérisée. La GRMD est le meilleur modèle quant à sa représentation des phénotypes de la DMD humaine. La pathologie GRMD se manifeste *in utero*. À la naissance, on observe une nécrose dans les muscles du cou, du tronc et des pattes (122). Lorsque les chiens sont âgés d'environ 60 jours, une fibrose débute au sein du muscle et on note un taux de créatine kinase sanguin élevé. Tout comme les patients atteints de la DMD, les chiens GRMD meurent d'une faiblesse respiratoire ou cardiaque (122). L'homologie entre les chiens GRMD et les patients atteints de la DMD fait du Golden Retriever le meilleur modèle animal pour les essais cliniques. Cependant, les variations entre les phénotypes individuels, l'impossibilité de manipulation génétique, l'espérance de vie plus courte des chiens, les coûts de production, la reproduction à large échelle ainsi que l'attachement des humains pour les animaux sont des inconvénients qui font des chiens dystrophiques, un modèle difficile à utiliser lors d'études.

1.2.5.3 Autres modèles

La dystrophie chez les félins est rare. On observe des symptômes tels que l'hypertrophie des muscles, une mobilité chancelante et des signes de cardiomyopathie (123;124). Les désavantages de ce modèle animal sont multiples; coûts de production, la faible similarité de la pathologie avec les patients atteints de la DMD ainsi que l'attachement des humains pour les chats. Le poisson *Danio danio* et le nématode *C. elegans* sont des modèles intéressants pour l'étude des myopathies puisqu'ils expriment des protéines orthologues ou homologues aux protéines du CAD humain (125-127).

1.2.6 Les thérapies

Malgré plus de 150 ans de recherche dans le combat contre la DMD, aucune thérapie efficace n'a encore été commercialisée. Toutefois, il y a de l'espoir. Certaines thérapies, encore en développement, sont promises à un bel avenir. Parmi les thérapies possibles aujourd'hui, on compte l'utilisation de divers composés chimiques, la thérapie cellulaire et la thérapie génique.

1.2.6.1 La thérapie par médication

L'approche pharmaceutique vise à améliorer le fonctionnement ainsi que l'aspect morphologique des muscles atteints. Leur utilisation permet d'améliorer la qualité de vie du patient.

L'emploi de certains stéroïdes a plusieurs effets bénéfiques chez les patients atteints de la DMD telles que la réduction de l'inflammation, la suppression des cellules cytotoxiques, l'amélioration de l'homéostasie du calcium, la stimulation des myoblastes ainsi que l'augmentation de la force musculaire. Toutefois, les effets secondaires de cette thérapie ne sont pas négligeables; gain de poids, cataractes, hypertension, diabète et changement de comportements. Des études conduites en 1989 ont démontré que l'utilisation de glucocorticoïdes tels que le prédnisone ou le déflazacort ont eu plusieurs effets positifs chez les malades (128-130). Ils permettent une amélioration des fonctions pulmonaires suggérant par le fait même, une amélioration des fonctions des muscles respiratoires chez les patients atteints de la

DMD (131). La masse musculaire chez un patient peut aussi être augmentée grâce à la stimulation et à l'activation de la prolifération des cellules satellites, par l'inhibition de régulateurs négatifs de la croissance des muscles squelettiques telle la myostatine ou grâce à l'utilisation de régulateurs positifs de la croissance musculaire telle que l'IGF-1 (Insulin-like growth factor) (132).

L'utilisation d'antibiotiques de la famille des aminoglycosides, telle que la gentamicine, prévient la reconnaissance d'un codon stop dans le gène de la dystrophine par les ribosomes rétablissant ainsi l'expression de la dystrophine. Ce codon stop prématuré est présent chez environ 15 % des patients (133). Les essais cliniques utilisant la gentamicine ne se sont toutefois pas révélés concluants (134).

Une approche alternative consiste à réguler positivement une protéine d'intérêt thérapeutique qui pourrait compenser pour le manque de dystrophine en assumant quelques unes ou mêmes toutes ses fonctions. L'une de ces protéines est l'utrophine (395 kd). La structure globale de l'utrophine et de la dystrophine est similaire à plus de 85% dans leur structure en C-terminal et en N-terminal (51;135). Cette dernière est à ce point similaire, que l'utrophine peut remplacer la dystrophine au sein du CAD, servant ainsi de lien entre le réseau de filaments d'actine et la matrice extracellulaire (136). Il a été démontré que l'expression d'utrophine dans la souris *mdx* améliore les fonctions motrices et prévient la pathologie. L'utrophine pourrait être régulée positivement grâce à l'utilisation de transgènes, d'activateurs pharmaceutiques, d'interleukine-6, de L-arginine ou par la stabilisation de l'ARNm de ce gène (15;137).

1.2.6.2 La thérapie cellulaire

Le but de cette manœuvre est de permettre la repopulation du muscle dystrophique grâce aux cellules transplantées, ce qui améliorera la fonction du muscle et diminuera les effets de la pathologie.

La thérapie cellulaire consiste en un transfert, une transplantation ou une injection de myoblastes dans le muscle dystrophique. Cette thérapie vise à introduire des cellules précurseuses de muscles (myoblastes) dans les myofibres de muscles dystrophiques. Il y aura une fusion entre les myoblastes exprimant la dystrophine et

les fibres musculaires déficientes en dystrophine. Le noyau des cellules dystrophines positives, contenant le gène de la dystrophine sera transféré dans les fibres musculaires atteintes. Ainsi, les myofibres nouvellement formées auront, au sein de leur noyau, une copie fonctionnelle du gène de la dystrophine. Toutefois, la transplantation des myoblastes comporte plusieurs obstacles. Tout d'abord, les myoblastes sont rejetés par le système immunitaire s'ils ne proviennent pas de donneurs compatibles. En second lieu, le taux de survie des myoblastes est très faible et le taux de mortalité peut atteindre jusqu'à 99% (138). Finalement, cette thérapie nécessite de nombreuses injections en raison de la faible migration de myoblastes au sein du muscle. Une médication immunosuppressive semble améliorer la survie des myoblastes indiquant que l'immunité est un facteur déterminant dans la mort des myoblastes (139). L'immunité envers la nouvelle dystrophine synthétisée est aussi un obstacle à cette thérapie (140). Afin d'améliorer l'efficacité du transfert des myoblastes, l'une des possibilités est l'utilisation de myoblastes modifiés génétiquement. Ce type de thérapie est une combinaison des approches cellulaire et génétique. Lors de cette approche, les myoblastes du patient atteint de la DMD sont isolés, modifiés génétiquement, amplifiés et réintroduits chez ce dernier (141). La modification génétique des myoblastes peut comprendre l'introduction du gène de la dystrophine ou des modifications basées sur les antisens qui permettent l'augmentation de la prolifération des myoblastes (142;143). Les résultats les plus impressionnants chez les primates ont été obtenus suite à l'injection de 30 millions de cellules par mm^3 (144). Une concentration aussi importante est nécessaire afin de contrer la mort rapide des myoblastes suite à leur injection. Afin d'augmenter les chances de succès du transfert de myoblastes, l'irradiation peut être utilisée (145). Bien que cette méthode ne soit pas idéale, lors d'études cliniques récentes, elle a démontré les résultats les plus impressionnants, soit une expression de la dystrophine dans 26% à 30% des fibres musculaires (146-148).

1.2.6.3 La thérapie génique

Plusieurs expérimentations chez les souris *mdx* ont démontré que l'expression de dystrophine recombinante dans le muscle dystrophique conduit à la restauration de la morphologie normale du muscle. Ces conclusions supportent l'idée que l'on

puisse traiter la DMD. Les études cliniques pour la traiter sont basées sur l'introduction de l'ADN complémentaire (ADNc) de la dystrophine dans les fibres musculo-squelettiques des souris *mdx*.

Les techniques de transfert de gènes sont regroupées en quatre catégories : les vecteurs viraux comprenant les virus à acide ribonucléique (ARN) (rétrovirus, lentivirus) et les virus à ADN (adénovirus, virus associés aux adénovirus (AAV), herpès virus), les techniques chimiques, les techniques impliquant une fusion et finalement les techniques qualifiées de physique telles que la micro-injection ou l'électroporation. À l'heure actuelle, les protocoles de thérapie génique humaine sont basés sur les vecteurs AAV et l'injection musculaire de plasmides.

1.2.6.3.1 Les vecteurs adénoviraux

Les adénovirus (Ad) constituent une vaste famille de virus à ADN non enveloppé. Depuis les années 50, date à laquelle les adénovirus ont été isolés pour la première fois, plus de 50 sérotypes ont été identifiés chez l'humain. À eux seuls, ils sont responsables de la majorité des infections mineures tels que les rhumes, les conjonctivites ou les gastro-entérites. Le virion adénovirus est une particule de forme icosaédrique de 70 à 100nm de diamètre (selon le sérotype). La capsid virale, composée de 252 capsomères, contient le génome linéaire d'ADN double brin de 26 à 45kb variable selon le sérotype. Depuis les années 1990, les sérotypes Ad2 et Ad5 ont été utilisés comme vecteurs de gènes thérapeutiques puisqu'ils sont les sérotypes les mieux connus. Ils ont en moyenne un génome de 36 kb. Le génome des adénovirus se subdivise en gènes précoces (E pour *early*), intermédiaires (codant les protéines IX et Iva2) et tardifs (L pour *late*). Les adénovirus possèdent la capacité d'infecter une grande variété de types cellulaires et ne sont pas dépendants de la division cellulaire. Contrairement au cas des vecteurs rétrovirus, le génome reste sous forme épisomale dans la cellule infectée (149).

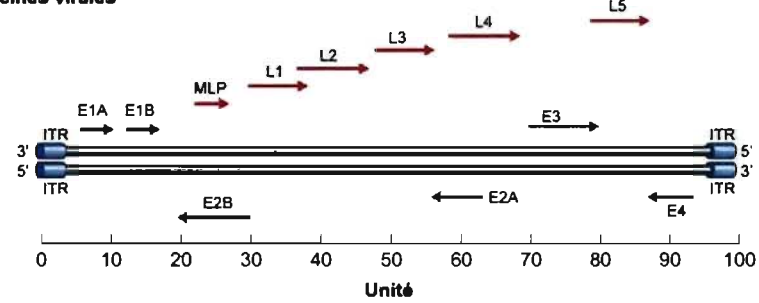
Les vecteurs adénovirus de première génération (Adv), dérivés de l'Ad5, défectifs dans leur répllication sont générés par délétion de la région E1 nécessaire pour l'activation de la répllication virale (150). Certains vecteurs contiennent aussi une délétion de la région E3 qui n'est pas essentielle à la répllication du virus. Afin de

produire ces vecteurs, des cellules telles que les HEK293 ayant intégré de façon stable les régions E1A et E1B, sont utilisées pour compléter en *trans* la délétion du virus. Puisque ces vecteurs ne peuvent s'intégrer dans le génome cellulaire, ils ne comportent pas de risque de mutagenèse. L'obstacle majeur à l'utilisation des Adv est la reconnaissance du vecteur par le système immunitaire de l'hôte ainsi que la capacité d'encapsidation limitée d'environ 6,5–7,5 kb (149;150). En raison de l'activation des cellules CD8+, les cellules transduites par les Adv seront progressivement éliminées et une réadministration du vecteur sera impossible (151). Dû à la capacité limitée de ces vecteurs, le mini-gène de la dystrophie musculaire de Becker a été utilisé dans un vecteur adénovirus et injecté dans les muscles des souris *mdx*. Suite à une injection d'un très grand nombre de particules virales (10^9) dans les souris *mdx* néonatales, plus de 50 % des fibres musculaires du muscle injecté sont positives pour la dystrophine (152;153) durant plus de six mois. Toutefois, ces résultats ne sont pas observés chez les souris adultes. La persistance du transgène est diminuée en raison de la reconnaissance des cellules transduites par le système immunitaire, de la toxicité du vecteur et de l'âge de l'hôte (23). L'un des avantages de l'utilisation des vecteurs Adv est qu'ils peuvent être préparés en très grand titre (jusqu'à 10^{12} PFU/mL). De plus, ce système a une efficacité très élevée quant à l'expression du transgène.

Afin d'améliorer les performances et de diminuer l'immunogénicité des Adv, les vecteurs adénovirus de seconde génération ont été créés. Ces vecteurs possèdent des délétions supplémentaires dans les régions E4, E2A ou E2B, codant pour plusieurs protéines régulatrices, pour la protéine de liaison à l'ADN et pour l'ADN polymérase virale respectivement (149). Ils ont donc besoin d'une nouvelle complémentation en *trans* ce qui rend difficile leur production. Due à la délétion des régions E4 et E2, la capacité d'encapsidation de ces vecteurs est d'environ 10kb (154).

Les adénovirus de troisième génération (HDAd) ont plusieurs caractéristiques qui font d'eux les vecteurs les plus appropriés pour la thérapie génique. Tout d'abord, les HDAd sont très sécuritaires puisqu'ils ne contiennent aucun gène viral. Seules les séquences répétées terminales inversées (ITR) ont été conservées

(figure 4). Ces vecteurs n'induisent donc qu'une très faible réponse immunitaire chez l'hôte. Leur capacité d'encapsidation est maximale, jusqu'à 36 kb, en raison de la délétion complète de leur génome viral (155). Par conséquent, ils peuvent contenir le gène complet de la dystrophine. La production des HDAd implique la co-infection d'une lignée cellulaire par l'HDAd contenant le gène d'intérêt ainsi que par un virus auxiliaire (*helper*). Lors de cette production, c'est le virus auxiliaire qui permet la complémentation en *trans* en apportant les protéines nécessaires à la réplication et à l'assemblage des particules virales. Cette technique sera décrite ultérieurement. Des études utilisant les HDAd et le gène complet de la dystrophine chez les souris *mdx* néonatales ont démontré une restauration du CAD et une expression à long terme de la dystrophine. Cependant, tout comme lors des études à l'aide des Adv, les essais chez les souris *mdx* adultes se sont avérés problématiques en raison de l'inefficacité de l'infection des fibres musculaires matures par les HDAd (22). En effet, le récepteur de surface naturel des adénovirus, appelé récepteur coxsackie-adenovirus (CAR) est régulé négativement dans les cellules musculaires matures, prévenant ainsi l'attachement efficace des HDAd et l'infection des cellules musculaires matures (156). De plus, lors de la maturation des fibres musculaires, il y a une perte des intégrines $\alpha\beta$ -3 et $\alpha\beta$ -5. Ces dernières sont responsables de l'internalisation des adénovirus dans les fibres musculaires (157). Chez les souris adultes, les études les plus impressionnantes ont été réalisées à l'aide d'un vecteur contenant deux copies du gène de la dystrophine sous le contrôle du promoteur hybride de la β -actine de volaille (158). Lors de cette étude, 42% des fibres musculaires des souris *mdx* injectées exprimaient la dystrophine 30 jours post-injection. Six mois post-injection, le pourcentage de fibres positives diminuait à 24% (158).

Adénovirus (Av-5)**Protéines virales****HDAd : Transgène complet de la dystrophine****Figure 4 : Vecteur adénovirus utilisant le gène dys**

Le vecteur adénovirus de troisième génération utilisant la cassette d'expression du gène de la dystrophine est montré en contraste avec le génome de l'adénovirus Av-5.

Figure adaptée de Kapsa *et al*, Lancet Neurology 2003 (23).

La production des HDAd est effectuée grâce à l'utilisation d'une lignée cellulaire stable exprimant la recombinase FLPe (figure 5). Cette lignée cellulaire permet la production d'HDAd sans qu'il y ait une contamination significative par le virus auxiliaire. Ce dernier est un adénovirus de première génération (figure 6). On retrouve la séquence d'encapsidation ψ entourée de deux séquences cibles (FRT) pour la recombinase FLPe. La séquence d'encapsidation sera excisée lors de la recombinaison médiée par la FLPe. Le virus auxiliaire encode le gène de la DsRED (RFP), un gène rapporteur sous le contrôle du promoteur CR5 (159), l'ADN de remplissage et la région ORF6, une région essentielle. Les régions E1 et E4 ont été délétées. Le vecteur contient la région E3 puisque des études ont démontré que sa présence diminuait l'immunogénicité des vecteurs et que les titres viraux obtenus étaient plus élevés (160). D'autres recombinases pourraient être utilisées comme par exemple, la CRE. Toutefois, il a été démontré que la recombinase FLPe est plus efficace que la recombinase CRE (161).

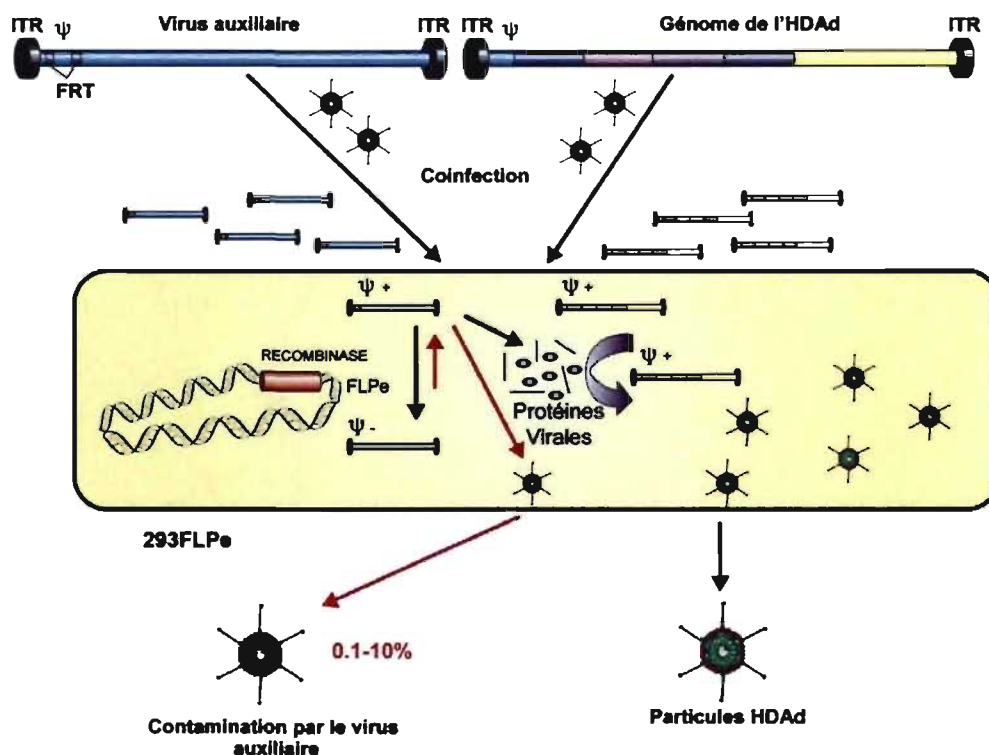


Figure 5 : Mécanisme de recombinaison de la recombinase FLPe

Génération des HDAd par l'utilisation du système FLPe/FRT. L'HDAd et le virus auxiliaire sont co-infectés dans les cellules 293FLPe où les deux génomes sont amplifiés et les protéines virales sont produites. Ensuite, le signal d'encapsidation du virus auxiliaire est excisé par la recombinase FLPe empêchant leur encapsidation dans la capsid virale. Seul l'HDAd sera encapsidé. L'efficacité de l'excision du signal d'encapsidation est de 90 à 99,9%.

Figure adaptée de Alba et al, Gene Therapy (2005).

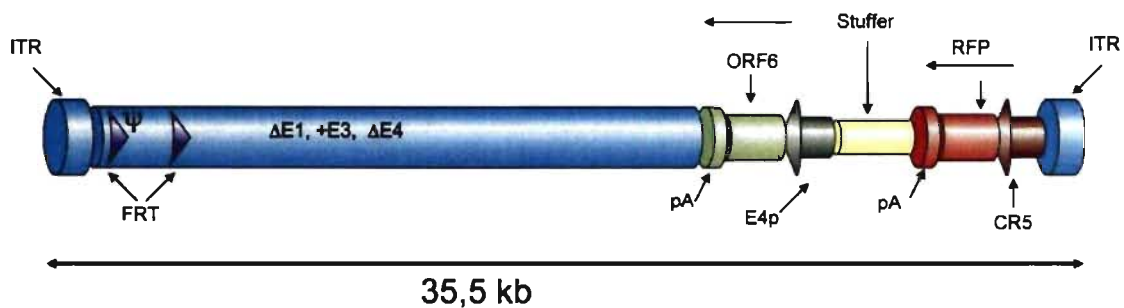


Figure 6 : Structure de l'adénovirus auxiliaire utilisé dans ce projet

Le virus auxiliaire encode pour le gène rapporteur de la DsRED (RFP) sous le contrôle du promoteur CR5. On retrouve aussi de l'ADN de compaction (Stuffer) et la région ORF6. Les régions E1 et E4 ont été déléetées mais le vecteur contient la région E3. On retrouve le signal d'encapsidation entre les deux séquences FRT.

1.2.6.3.2 Les vecteurs rétroviraux

Le second type de vecteurs viraux utilisés lors d'études précliniques par thérapie génique pour la DMD est dérivé des *Retroviridae*. Les rétrovirus sont des virus à ARN monocaténaire enveloppés. Les vecteurs rétroviraux recombinants sont générés à partir de virus à ARN tel que le virus de la leucémie murine Moloney (Moloney murine leukaemia virus). Ils possèdent la capacité d'infecter simultanément une très grande variété de types cellulaires et ils sont capables d'introduire leurs gènes dans l'ADN chromosomal de plusieurs variétés cellulaires. L'avantage majeur réside dans l'expression persistante du transgène tout au long de la vie de la cellule puisque celle-ci a incorporé le transgène. Toutefois, ce transfert de gènes est dépendant de la réplication cellulaire, ce qui signifie que seules les cellules satellites activées sont infectées par ce type de vecteur. Le second obstacle à l'utilisation des vecteurs rétroviraux pour la thérapie génique de la DMD est leur capacité d'encapsidation limitée d'environ 7,8 kb ainsi que la difficulté de production à haut titre (162). Suite à une injection intramusculaire, il a été démontré qu'environ 6% des muscles de la souris *mdx* sont positifs durant plus de 9 mois quant à l'expression de la dystrophine suite à l'utilisation d'un vecteur rétroviral contenant le gène de la dystrophine de 6,3 kb. La présence d'un des composés du CAD (43 kd) est aussi notée (162).

1.2.6.3.3 Les vecteurs lentiviraux

Un autre type de vecteurs viraux pouvant être utilisés lors de la thérapie génique est une sous-classe de la famille des *Retroviridae*, les lentivirus. Ils ont la capacité d'infecter les cellules postmitotiques tels les neurones, les hépatocytes et les cellules satellites des fibres musculaires. Les vecteurs lentiviraux, comme les autres vecteurs rétrovirus, sont délévés de tous leurs gènes viraux. Ils ne peuvent donc pas se répliquer seuls. De plus, tout comme les vecteurs adénoviraux, ils ont la capacité d'infecter les cellules quiescentes. Cependant, les vecteurs lentiviraux s'intègrent de façon stable dans le génome permettant ainsi une expression continue du transgène (163;164). Il est aussi possible de modifier leur tropisme grâce au pseudotypage (165). Kobinger *et al* sont parvenus à développer des vecteurs lentiviraux pseudotypés à l'aide des protéines de l'enveloppe virale d'une grande variété de virus (166). Ils ont pu démontrer que le vecteur lentivirus pseudotypé MuLV (murine leukemia virus) transduit environ 47% des myofibres adultes chez la souris *mdx*. Un mois suivant l'administration du vecteur, un dommage musculaire a été créé afin de vérifier la capacité de prolifération et de régénération des fibres musculaires exprimant le gène rapporteur de la β -gal. Suite au dommage, plusieurs petites fibres centronucléées exprimant la β -gal furent observées au cours de la régénération (166). Une étude de colocalisation de la β -gal et des marqueurs des cellules satellites a démontré que 84% des cellules satellites étaient transduites suite à l'injection du lentivirus pseudotypé MuLV. Kobinger *et al* ont aussi démontré l'expression de la dystrophine quatre mois post-injection suite à l'injection de vecteur lentiviraux exprimant la mini-dystrophine (166). Les vecteurs lentiviraux ont l'avantage de pouvoir être utilisés à des titres infectieux moindres que les autres vecteurs viraux (163). Malheureusement, leur production à haut titre est quelque peu problématique.

1.2.6.3.4 Les vecteurs AAV

Le quatrième type de vecteur viral utilisé pour la DMD est dérivé des virus associés aux adénovirus (AAV) plus particulièrement des sérotypes 1, 6, 7, 8 et 9. Ces sérotypes ont été sélectionnés puisqu'ils infectent efficacement les muscles squelettiques et cardiaque (167-171). Les virus AAV, de la famille des *Parvoviridae*,

contiennent 4 680 pb. Les AAV sont des virus à ADN simple brin non-enveloppé composés de deux ITR. Les AAV peuvent infecter les cellules quiescentes et ils ne causent aucune pathologie chez l'humain. Les vecteurs AAV ne contiennent aucun gène viral. Ils se composent uniquement du gène d'intérêt thérapeutique encadré par les deux ITR viraux. Ils induisent donc une réponse immunitaire et inflammatoire minimale. Malgré tout, les fibres musculaires transduites à l'aide de ces vecteurs peuvent être rejetées par le système immunitaire si le transgène est immunogénique (172). Des études effectuées chez les souris *mdx* à l'aide des gènes de la microdystrophine ont démontré une amélioration de la fonction musculaire. De plus, il a été démontré qu'une injection intraveineuse unique de vecteurs AAV à des titres très élevés, permet une infection dans tous les muscles squelettiques et cardiaque chez les souris adultes (173). L'utilisation des AAV comme vecteurs pour la DMD comporte des avantages. Tout d'abord, ces vecteurs ne sont pas bloqués par la lamine basale. Ensuite, la transduction des fibres musculaires par ces vecteurs est indépendante de la maturité (174). La difficulté de production en grande quantité ainsi que leur capacité d'encapsidation limitée d'environ 5,2 kb sont les obstacles majeurs à l'utilisation de ces vecteurs (175).

1.2.6.3.5 Les vecteurs non-viraux

L'avantage majeur de ce type de vecteurs réside en leur grande capacité de transport ainsi que dans la faible réponse immunitaire qu'ils induisent. Des études d'expression d'un transgène suite à l'injection intramusculaire de plasmides contenant le gène rapporteur de la luciférase ont été réalisées sur les fibres musculaires. Ces études démontrent que le gène est exprimé durant plus de 12 mois dans les fibres musculaires individuelles (176). L'injection de diverses constructions a démontré une expression de la dystrophine jusqu'à 10% des fibres musculaires et l'expression est observée jusqu'à six mois suite à une injection unique (177-180). De plus, aucune réponse immunitaire n'est observée contre la dystrophine nouvellement synthétisée (180). Suite à ces résultats, un essai clinique de phase I a été initié. Au cours de cet essai, une faible expression de dystrophine a été détectée durant une période de trois semaines chez six des neuf patients participant à l'étude (181;182). Comme l'injection directe d'ADN plasmidique n'est pas toujours d'une grande

efficacité, un courant électrique peut être appliqué afin d'augmenter l'efficacité de transduction des fibres musculaires, tel que démontré par Molnar *et al* (183). Cette technique comporte cependant des inconvénients majeurs. L'électroporation cause un dommage aux fibres musculaires. De plus, il n'est pas envisageable d'électroporer un muscle humain complet.

Des études *in vitro* de transfections transitoires avec des transporteurs liposomaux ont également été faites sur les cellules myoblastiques (184). Dans les cultures primaires de muscles de souris normales et *mdx*, l'efficacité de transfection pouvait atteindre jusqu'à 10% et l'expression de dystrophine était observée. L'efficacité de cette méthode repose sur la formulation des liposomes, le ratio ADN/liposomes et la division cellulaire. Le problème majeur de cette méthode est la dégradation de l'ADN par les lysosomes. L'ADN doit donc être directement introduit dans le cytoplasme. Le second obstacle est la livraison efficace de l'ADN au noyau cellulaire. Afin de contrer ces problèmes, une méthode utilisant l'activité de fusion du virus Sendai (hemagglutinating virus of Japan (HJV)) et une autre de livraison de l'ADN ont été développées (185;186).

Les avantages marqués de ces diverses techniques résident dans leur grande capacité d'encapsulation, leur simplicité et leur sécurité. Le problème majeur dans l'utilisation de ces thérapies est l'expression très localisée du transgène. Le corps humain est constitué d'environ 30% de fibres musculaires. Il est donc inconcevable de traiter tous les tissus musculaires, respiratoires et cardiaque à l'aide d'injection directe. Celle-ci doit être intraveineuse.

1.3 Les promoteurs muscles spécifiques

Notre choix s'est arrêté sur les HDAd en raison de leur grande capacité d'encapsidation, de leur production à haut titre, leur faible activation du système immunitaire ainsi que pour l'expertise de notre laboratoire dans ce domaine. Toutefois, bien que l'utilisation des HDAd comporte plusieurs avantages, il subsiste trois grandes problématiques. Tout d'abord, les adénovirus ont un large tropisme. Ils sont capables d'infecter plusieurs types cellulaires. Dans le cadre de nos travaux, l'expression du transgène doit être restreinte aux fibres musculaires. La seconde problématique découle de la première. Les promoteurs utilisés doivent être inactifs dans les cellules présentatrice d'antigène (CPA) tels que les cellules dendritiques ou les macrophages. Si le transgène est exprimé par les CPA, il y aura une réponse immunitaire contre le transgène, ce qui n'est pas souhaitable. La solution à ces deux problématiques est l'utilisation de promoteurs muscles spécifiques. Finalement, la troisième problématique réside dans la puissance du promoteur utilisé. Le transgène doit être fortement exprimé dans les cellules musculaires. Nous devons donc utiliser des promoteurs muscles spécifiques puissants. Contrairement aux promoteurs constitutifs, les promoteurs muscles spécifiques n'induisent pas de forte réponse immunitaire. De plus, selon le type de promoteur muscle spécifique utilisé, l'expression du transgène dans les tissus musculaires est jusqu'à 600 fois plus élevée que dans les tissus non musculaires (177;187). Les promoteurs muscles spécifiques ont généralement une activité plus faible que les promoteurs viraux tel que le promoteur/immédiat-précoce du cytomégavirus humain (CMV). Il existe plusieurs promoteurs muscles spécifiques. Notre attention s'est portée plus particulièrement sur les promoteurs de la créatine kinase musculaire murin (MCK), de l'isoforme rapide (TnIF) et lente (TnIS) de la troponine I.

La créatine kinase est une protéine abondante dans les muscles, elle catalyse la production d'ATP à partir de l'ADP. L'expression de la créatine kinase musculaire, l'un des isoformes de la créatine kinase, est élevée et restreinte aux fibres musculaires et cardiaques. Les éléments génétiques régulant l'expression de la créatine kinase musculaire ont été bien identifiés. Le promoteur/activateur du gène

MCK est d'environ 6,5 kb. Il est constitué d'un activateur muscle spécifique (E1) (-1 050 à -1 256 pb), d'un promoteur dans la région 5' non traduite du premier exon et d'un second activateur (E2) dans le premier intron (188-190). La traduction débutant à l'exon 2, les séquences entre les positions -4 800 et -1 800 pb ne sont pas essentielles quant à l'expression du gène (189;191). L'activateur E1, quant à lui, est essentiel. Il influence l'expression du gène et lui confère sa spécificité musculaire (188). L'ADNc complet de la dystrophine murine contrôlé par des régions du gène MCK, a été transféré dans les cellules germinales de la souris *mdx* (73;192). Ces souris surexpriment la dystrophine d'une manière tissu spécifique et ont un taux sérique de créatine kinase normal (73). Il a été démontré que la surexpression à de très hauts niveaux dans les muscles squelettiques d'un seul des isoformes de la dystrophine est suffisante pour restaurer les fonctions musculaires normales sans être toxique (118). L'expression de la dystrophine pouvait atteindre jusqu'à 50 fois le taux normal dans les muscles et le coeur. L'expression de l'ADNc de la dystrophine a été en mesure de restaurer la formation du CAD au sarcolemme, diminuer la libération des protéines musculaires dans la circulation sanguine et prévenir la dégénérescence musculaire (118). Des études menées à l'aide d'injections intramusculaires d'Adv et du promoteur tronqué MCK (1,35 kb) ont démontré une expression très faible du gène rapporteur dans les tissus non musculaires et une expression élevée dans les muscles (193).

La troponine I, une protéine abondante dans les muscles, fait partie du complexe qui prévient l'interaction de l'actine et de la myosine lorsque le muscle est en position de relaxation. Il existe trois isoformes de la TnI : lent, rapide et cardiaque. Au cours de la différenciation des myoblastes en myotubes, la transcription du TnIF de caille augmente d'un facteur de 100 fois (194). Cette augmentation est médiée par un activateur muscle spécifique, l'élément régulateur interne (IRE aussi nommé FIRE). L'IRE de 148 pb est localisé dans le premier intron du gène. À lui seul, il peut activer la transcription du gène durant la différenciation des myoblastes (195). L'activateur IRE est composé de quatre domaines : un motif E-box, un motif AT riche, un site CACC et un motif CAGG. Il a été démontré que le motif E-box lie une grande variété de facteurs muscles spécifiques tels que MyoD (196), myogénine (197;198), myf-5 (199) et MRF-4 (200-202). La séquence AT

riche lie les facteurs Mef2/RSRF (203). Le motif CAGG, quant à lui, est similaire au site MEF-3 retrouvé dans plusieurs promoteurs musculaires (204;205). Ces domaines sont conservés entre les séquences de la TnIF et de l'isoforme lent de la troponine I et ils sont indispensables pour la restriction aux fibres musculaires. Toutefois, il existe des éléments non homologues entre ces deux gènes qui permettent la restriction au type de fibres (203). Yutzey *et al* ont démontré que la présence d'un IRE augmente d'environ 39 fois l'expression du gène rapporteur par rapport au contrôle dans les myotubes (195). Des études menées à l'aide d'injections intramusculaires d'Adv et du promoteur TnIF lié à l'activateur IRE ont démontré une expression très faible du gène rapporteur dans les tissus non musculaires et une expression très élevée dans les muscles (193).

Cependant, une quatrième problématique survient. Chacun des muscles squelettiques humains est composé d'un pourcentage différent de fibres lentes et rapides. Une thérapie efficace implique que le transgène soit exprimé à la fois dans les fibres de type lentes et rapides.

L'isoforme lent de la troponine I humain (TnIS) est exprimé lors du développement des muscles cardiaque et squelettiques. Le gène TnIS est exprimé initialement dans toutes les fibres musculaires des membres postérieurs durant le développement embryonnaire. Par la suite, l'expression de ce gène est réprimée dans les fibres rapides matures. Toutefois, elle reste élevée dans les fibres musculaires lentes tel le soleus de souris (5;206;207). La séquence du gène TnIS s'étend sur environ 12,5 kb. Ce gène est composé de neuf exons et de huit introns. Le TnIS ne contient pas de séquence consensus CCAAT ou bien de boîte TATA. Toutefois, la séquence de -9 à +11 est similaire à un élément initiateur. Il a été démontré que les éléments initiateurs peuvent diriger la transcription de certains gènes tissus spécifiques n'ayant aucune boîte TATA (208). Un activateur en amont du gène a été identifié (USE aussi nommé SURE) (209;210). Tout comme l'activateur IRE, l'USE est capable à lui seul de diriger l'expression aux types de fibres chez les souris. Ceci a été démontré à l'aide de l'activateur USE de rat (207). Celui-ci est composé de cinq domaines (figure 7). Tout d'abord, le domaine BLM est un motif semblable au motif Bicoïd (*bicoid*-like motif). Il lie le facteur nucléaire GTF3, essentiel lors de la

myogénèse et de la régénération musculaire. Ce domaine est très important puisqu'il est responsable de la réduction de l'activité de la transcription de l'activateur USE dans les fibres rapides (207). Calvo *et al* ont surexprimé le facteur GTF3 *in vivo*. Ceci a eu pour conséquence une réduction de l'activité transcriptionnelle de l'activateur USE de rat (207). Le domaine CAGG lie un élément dont l'identité n'a pas encore été découverte. Les domaines E-box, MeF-2 (nommé AT riche chez TnIF) et le motif CACC lient respectivement les protéines MyoD/Myogénine, MeF-2 et le facteur de transcription Sp1. Entre le domaine E-box et MeF-2, il y a un domaine important lors de la fusion de myoblastes aux myotubes nouvellement formés, le domaine NFAT. Calvo *et al* ont démontré que les éléments génétiques requis pour la spécificité du type de fibres ne sont pas les mêmes que ceux responsables de la spécificité aux fibres musculaires (207). Ils sont parvenus à identifier ces domaines suite à une série de constructions contenant chacune des délétions de longueurs différentes dans l'activateur USE. Leurs travaux démontrent que les domaines BLM et CAGG sont responsables de la restriction aux types de fibres musculaires lentes et que les domaines CACC, MeF-2 et E-box sont responsables de la restriction aux fibres musculaires. En délétant les domaines BLM et CAGG, ils ont observé que l'expression n'était plus restreinte aux fibres lentes. Cette stratégie sera donc utilisée afin d'obtenir une expression dans les fibres rapides et lentes.

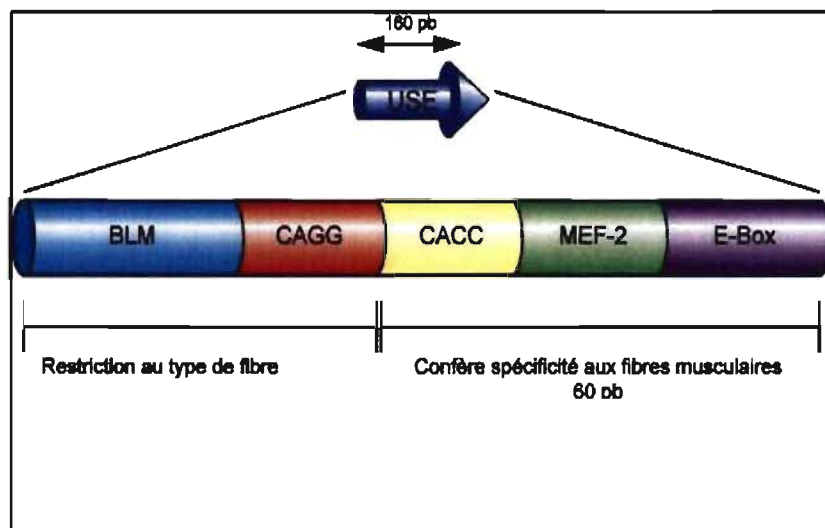


Figure 7 : Structure de l'activateur USE

L'activateur USE confère une spécificité aux fibres musculaires lentes. Il est composé d'un domaine E-Box, MEF-2 et d'un motif CACC liant respectivement les protéines MyoD/Myogénine, MeF-2 et le facteur de transcription Sp1. Entre les domaines MEF-2 et E-box, il y a la présence d'un domaine NFAT. Le motif CAGG lie un élément inconnu. Le motif BLM (*bicoid*-like motif) lie le facteur nucléaire GTF3, important lors de la myogénèse et de la régénération musculaire. Il est aussi responsable de la réduction de l'activité de la transcription du USE dans les fibres rapides.

1.4 L'importance des introns pour l'expression génique

Il a été démontré que la présence d'un intron est considérablement bénéfique lors de la transcription *in vivo* (211;212). Toutefois, ceci n'est pas applicable à toutes les constructions plasmidiques exprimées en cultures cellulaires (211-213). En effet, certaines études concluent que les essais en cultures cellulaires sont d'une faible valeur de prédiction en ce qui concerne l'efficacité de la construction plasmidique chez un animal transgénique. De plus, il a été démontré que chez la souris, les constructions plasmidiques contenant des introns produisaient de 10 à 100 fois plus de copies d'ARNm (212). Il a été suggéré que le rôle des introns serait de faciliter la transcription bien qu'ils ne joueraient pas de rôle quant à la stabilité de ces ARNm (212). Certains ont avancé trois hypothèses quant au rôle de l'intron (211). Certains introns pourraient contenir des activateurs ou d'autres éléments agissant *in cis* qui lieraient les protéines, ce qui influencerait l'initiation de la transcription et l'élongation. Selon la deuxième hypothèse, l'épissage de l'ARNm pourrait augmenter la stabilité de l'ARNm dans le noyau, ce qui conduit vers une accumulation de plusieurs ARNm matures dans le cytoplasme. Selon la troisième hypothèse, il est possible que les introns contiennent des séquences qui faciliteraient l'ouverture des domaines chromosomiques, possiblement en affectant la composition, la position ou bien l'organisation (*higher-order packing*) du nucléosome. Nous avons donc inclus dans nos travaux, un intron tronqué dérivé de l'ARN messager tardif 16/19S du polyomavirus simian 40 (SV40) (213). De plus, cet intron a subi une modification préalablement à son ajout dans nos constructions plasmidiques pour détruire un codon ATG présent (voir les sections Matériel et méthode et Résultats).

1.5 Les objectifs

L'objectif global de cette maîtrise était de parvenir à développer des promoteurs efficaces et muscles spécifiques pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne. Ces promoteurs devront être puissants dans les cellules musculaires tout en ayant une activité minimale dans les autres types cellulaires. De plus, un promoteur idéal devra être actif dans les fibres de types rapides et lentes puisque la dystrophine doit être exprimée dans ces deux types de fibres afin de traiter la DMD.

Pour atteindre cet objectif, j'ai tout d'abord construit différents promoteurs muscles spécifiques dérivés des éléments génétiques du gène de l'isoforme lent de la troponine I. Ces diverses constructions ont été testées en transfections transitoires en cultures cellulaires afin de pouvoir déterminer leur efficacité et leur spécificité pour les cellules musculaires.

Par la suite, deux promoteurs muscles spécifiques ont été testés dans les muscles de souris CD1 grâce à la méthode d'électroporation afin de déterminer l'efficacité *in vivo* des promoteurs développés.

Pour terminer, j'ai développé des vecteurs adénoviraux de troisième génération contenant certains de ces promoteurs muscles spécifiques. J'ai ensuite testé des HDAd en cultures cellulaires et dans les muscles de souris CD1.

Section 2 :
Matériel et méthode

2.1 Construction des plasmides

Toutes les enzymes utilisées lors des diverses constructions plasmidiques proviennent de New England Biolabs (Beverly, MA, É.-U.). Tous les désoxyribonucléotides proviennent d'Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, É.-U.). Toutes les séquences nucléotidiques obtenues suite à des amplifications par réactions en chaîne de la polymérase (PCR) ont été séquencées par le Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill, *Plateforme séquençage* à des fins de confirmation.

Le gène de la β -galactosidase (β -gal) utilisé lors de la construction des divers plasmides est celui de la β -gal fusionnée de Clontech (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca.). Ce dernier comprend 92 acides aminés provenant du gène de l'alcool déshydrogénase de *Drosophila melanogaster* suivis des acides aminés du gène de LacZ de *E.coli*.

Les plasmides nommés p(Im) β construits au cours des diverses expériences partagent tous la même structure (figure 8). Celle-ci est composée du gène de la β -gal fusionnée, d'une origine de répllication bactérienne (pCU ori), d'un gène de résistance à l'ampicilline (β -lactamase) suivi du promoteur d'intérêt et de l'intron SV40 du cytomégalo virus modifié (SV40m).

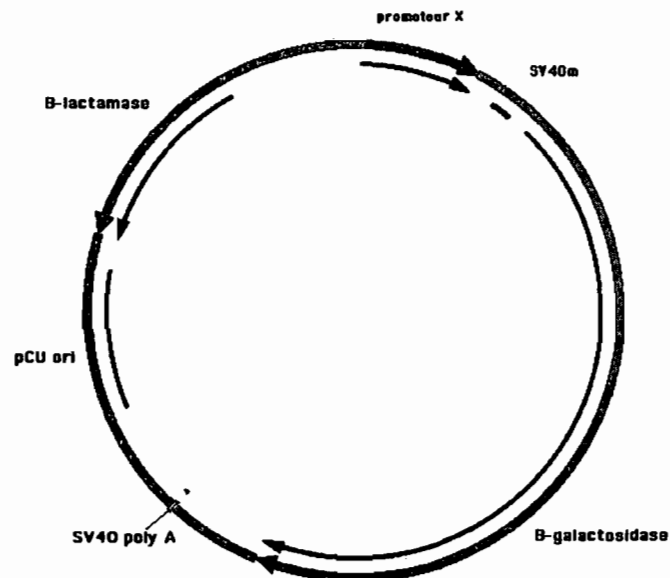


Figure 8 : Carte générale des constructions plasmidiques

pMCKG

Le plasmide pMCKG fut construit par l'entremise de plusieurs plasmides intermédiaires. Tout d'abord, le plasmide pAdMCK-Spe a été construit par le remplacement de l'ADNc codant pour la minidystrophine Becker du plasmide pAdMCKBecker (214) pour le site de restriction SpeI. Le plasmide pAdMCKBecker a été digéré par les enzymes Sall et KpnI et des extrémités franches ont ensuite été produites à l'aide de la DNA polymérase I, Large (klenow) fragment. Le fragment d'ADN de 1,35 kb du gène 4 de la créatine kinase musculaire (MCK) murin et l'ITR gauche de l'adénovirus (Ad) ont été purifiés par «QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et ligués à des liens SpeI (New England Biolabs, Beverly, MA, É.-U.). Le produit de ligation a été digéré par l'enzyme SpeI, purifié par «QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et recircularisé par l'enzyme T4 DNA ligase. Ce plasmide intermédiaire se nomme pAdMCK-Spe. Le site de restriction ClaI du plasmide pAdMCK-Spe a été remplacé par le site de restriction NotI. Ce remplacement a été fait selon la procédure décrite précédemment (en remplaçant l'enzyme SpeI par NotI) à l'exception de la purification entre la production des extrémités franches et la première ligation. Ce plasmide est nommé pAdMCK-Not. Le promoteur MCK, le signal de polyadénylation de la β -globine de lapin et l'ITR gauche de l'Ad ont été excisés du plasmide pAdMCK-Not suite à une digestion par l'enzyme BglII. Des extrémités franches ont ensuite été produites à l'aide de l'enzyme DNA polymérase I, Large (klenow) fragment. Le plasmide résultant a ensuite été digéré par l'enzyme NotI. Le fragment contenant l'ITR gauche et le promoteur MCK ont été purifiés selon le protocole «QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et insérés dans le site de clonage multiple du plasmide pBluescript SK (Stratagene, La Jolla, CA). Celui-ci a été digéré par les enzymes NotI et SmaI et purifié selon le protocole cité ci-dessus. Les fragments ont été ligaturés par la T4 DNA ligase. Ce plasmide est nommé p5IMCK. Le plasmide pMCKG a été construit suite à l'insertion de l'ITR droit de l'Ad dans le plasmide p5IMCK. L'ITR droit a été isolé de l'ADN d'un Ad de première génération encodant la protéine fluorescente verte (GFP, Green Fluorescent Protein) (215) de notre laboratoire par PCR grâce à

l'utilisation de la Taq polymerase (Bohringer Mannheim, IN, É.-U.). Les amorces utilisées sont les suivantes : 5'- TAC GTG TCG ACA CAA CTT CCT CAA ATC G-3' et 5'- CGA GCC TCG AGC ATC ATC AAT AAT ATA CC-3'. Le produit de PCR a été purifié selon le protocole «QIAquick Nucleotide removal kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.), digéré par les enzymes Sall et XhoI et purifié une seconde fois par l'utilisation de «QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). Le plasmide p5IMCK a été digéré par les enzymes Sall et XhoI et purifié selon le même protocole. Le plasmide p5IMCK et le produit de PCR purifié ont été ligués suite à l'utilisation de la T4 DNA ligase.

pBglII β

Le plasmide pCMV β (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca.) a subi une digestion par SmaI. Le fragment a été purifié en utilisant le «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Le plasmide a ensuite été digéré par l'enzyme EcoRI et des extrémités franches ont été produites à l'aide de l'enzyme T4 DNA polymérase. Le plasmide a été déphosphorylé par la phosphatase alcaline puis purifié une seconde fois par l'utilisation du «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Le fragment a ensuite été ligué à un lien BglII (New England Biolabs, Beverly, MA, É.-U.) (10 μ L de vecteur et 1 μ L lien BglII [1 μ g/ μ L] dans un volume total de 20 μ L) à l'aide de l'enzyme T4 DNA ligase suivie d'une incubation de 90 minutes à 22°C. Suite à cette incubation, la ligation a été purifiée en utilisant le «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et éluée dans 50 μ L. L'éluat a été digéré par l'enzyme BglII. Le produit de ligation digéré a été purifié par l'utilisation de «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Le fragment de ligation digéré a été recircularisé (4 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'utilisation de l'enzyme T4 DNA ligase suivi d'une incubation de 90 minutes à 22°C.

pMCK β

Le fragment MCK d'environ 1 400 paires de bases (pb) contenant le promoteur MCK a été isolé du plasmide pMCKG suite à une double digestion enzymatique par SpeI / Hind III. Des extrémités franches ont ensuite été produites à

l'aide de l'enzyme T4 DNA polymérase. Le fragment a été purifié en utilisant le «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 µL. Le fragment élué a ensuite été ligué à un lien BglII (New England Biolabs, Beverly, MA, É.-U.) (12 µL d'insert et 2 µL lien BglII [1 µg/µL] dans un volume final de 20 µL) grâce à l'utilisation de l'enzyme T4 DNA ligase suivie d'une incubation de 90 minutes à 22°C. La ligation est ensuite purifiée en utilisant le «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et éluée dans 50 µL. L'éluat est digéré par BglII et PvuI. Une digestion enzymatique par BglII suivie d'une déphosphorylation par la phosphatase alcaline ont été effectuées sur le plasmide vecteur pBglIIβ. Les deux fragments ont été purifiés par l'utilisation de «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élués dans 50 µL. Les fragments ont ensuite été ligués (2 µL d'insert et 2 µL de vecteur dans un volume total de 10 µL) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés 150 minutes à 22°C.

pCMV(Im)β

Tel que mentionné précédemment, l'intron SV40 du plasmide pCMVβ (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca.) comprend un ATG comparativement à l'intron modifié qui n'en contient aucun. La modification de la séquence d'ADN a été réalisée par PCR. Tout d'abord, un fragment d'environ 500 pb a été isolé par PCR à partir du plasmide pCMVβ. Les amorces utilisées lors du PCR sont les suivantes : 5'- CGG TAA ACT GCC CAC TTG-3' et 5'- CCT AGA AGT AAA GGC GTA TCC ACT GAG GAG CAG-3'.

Les conditions d'amplification sont les suivantes :

100 ng d'ADN		5 minutes à 95°C
5 µL de tampon Vent 10X		1 minute à 95°C
2,5 µL d'amorces à 10 pmol/µL	Répété 27 fois	1 minute à 62°C
4 µL dNTP à 10 mM		45 secondes à 72°C
1 µL de l'enzyme Vent		10 minutes à 72°C
X µL de dH ₂ O pour volume final de 50 µL		Infini à 4°C

Le produit PCR a ensuite été purifié à l'aide du «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 µL de tampon d'éluion. L'éluat a été digéré par l'enzyme XhoI. Le vecteur pCMVβ a aussi subi une double digestion

enzymatique par XhoI et StuI. Le vecteur et l'insert ont ensuite été purifiés grâce au «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élués dans 50 µL. Par la suite, les fragments ont été ligués (1 µL d'insert et 2 µL de vecteur dans un volume total de 10 µL) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pendant 24 heures à 16°C.

La nouvelle séquence est :

740 5'- TCC TCA GTG GAT *ATC* GCC TTT ACT TCT AGG-3' 770

et l'ancienne séquence était :

740 5'- TCC TCA GTG GAT *GTT* GCC TTT ACT TCT AGG-3' 770

p(Im)-ASXK

Le promoteur CMV a été excisé du plasmide pCMV(Im)β par une double digestion EcoRI/XhoI. Les sites de restriction AscI, SpeI, XhoI et KpnI sont ensuite ajoutés grâce à la ligation d'amorces préalablement hybridées. Les amorces utilisées sont les suivantes : 5'- AAT TGG CGC GCC ACT AGT CTC GAG GTA CCA-3' et 5'- TCG ATG GTA CCT CGA GAC TAG TGG CGC GCC-3'.

Les conditions d'hybridation étaient :

	2,5 minutes à 95°C
30 µg d'amorces	5 minutes à 65°C
X µL de dH ₂ O pour un volume final de 300 µL	5 minutes à 42°C
	Infini à 4°C

Le vecteur et les amorces hybridées ont ensuite été ligués (3 µL d'insert [1 ng/µL] et 2,8 µL de vecteur dans un volume total de 10 µL) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés durant 150 minutes à 22°C.

pTnIF(Im)β(-)

Le fragment d'environ 720 pb contenant le promoteur minimal de l'isoforme rapide de la troponine I de caille (position -204 :+22) ainsi que trois copies de l'activateur du premier intron du gène TnIF, l'élément régulateur interne (IRE), (position +658 à +804) ont été isolés du plasmide TnIFast (-198 :+22) Z (3xIRE) R72 (216) (gracieusement donné par le Dr. Ken Hastings, Institut neurologie de Montréal,

Université McGill, Montréal, QC, Ca.) grâce à une double digestion XhoI / KpnI. Une digestion par ces mêmes enzymes a été effectuée sur le vecteur p(Im) β -ASXK. Les fragments ont ensuite été ligués (6 μ L d'insert et 1 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pendant 150 minutes à 22°C.

pTnIF(Im) β (+)

Le fragment d'environ 450 pb contenant les trois copies du IRE a été isolé du plasmide TnIF(Im) β (-) grâce à une amplification par PCR. Les amorces utilisées sont les suivantes : 5'- AAC GAC GGC CAG TGA ATT G-3' et 5'- CAG ACC AAT GGT GTG CAA GAG C-3'.

Les conditions d'amplification étaient :

100 ng d'ADN		30 secondes à 95°C
10 μ L de tampon Phusion 5X		10 secondes à 95°C
2,5 μ L d'amorces à 10 pmol/ μ L	Répété 30 fois	1 minute à 72°C
4 μ L dNTP [1 mM]		1 minute à 72°C
0,5 μ L de l'enzyme Phusion		10 minutes à 72°C
X μ L de dH ₂ O pour volume final de 50 μ L		Infini à 4°C

Le produit PCR a ensuite été purifié à l'aide du «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L de tampon d'éluion. L'éluat a été digéré par les enzymes XhoI / Sall. Le vecteur p(Im)-ASXK a subi une digestion par l'enzyme XhoI ainsi qu'un traitement à la phosphatase alcaline. Le vecteur et l'insert ont ensuite été purifiés grâce au «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élués dans 50 μ L. Par la suite, les fragments ont été ligués (1 μ L d'insert et 6 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés durant 24 heures à 16°C. Ce plasmide intermédiaire se nomme p(Im)-IRE. Afin d'isoler le promoteur minimal TnIF, le plasmide pTnIF(Im) β (-) a été digéré par les enzymes KpnI, StuI, XmnI et a ensuite été purifié grâce au «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). L'éluat a ensuite été digéré par Sall et purifié une seconde fois en suivant la même procédure. Le promoteur minimal TnIF a ensuite été ligué au plasmide p(Im)-IRE digéré par XhoI / KpnI purifié par le «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) (6 μ L d'insert et 1 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubé durant 24 heures à 16°C.

pTnIS(Im) β -AgeI

Le promoteur minimal humain de l'isoforme lente de la troponine I (position -95 à +56) et l'activateur (USE) (position -1036 à -873) ont été isolés du plasmide TnI₅USE-95X1nucZ (217). Ce dernier a permis la construction du plasmide pBSKII+(USE/P) (gracieusement donné par le Docteur Ken Hastings de l'Institut de neurologie de Montréal, Université McGill, Montréal, QC, Ca.). Une digestion EcoRI de ce plasmide a d'abord permis l'insertion du site de restriction KpnI à l'aide d'une amorce préalablement hybridée. L'amorce utilisée est la suivante : 5'- AAT TGG TAC C-3'. Les conditions d'hybridation sont les mêmes que celles utilisées lors de la construction du plasmide p(Im) β -ASXK. Le vecteur et l'amorce hybridée ont ensuite été ligués (1 μ L d'insert [2 ng/ μ L] et 7 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pendant 150 minutes à 22°C. Ce plasmide se nomme pBSKII+(USE/P)-KpnI. Le fragment d'environ 300 pb contenant le promoteur et l'activateur USE/TnIS a ensuite été isolé du plasmide pBSKII+(USE/P)-KpnI grâce à une digestion enzymatique KpnI. Le vecteur p(Im) β -ASXK a été aussi digéré par cette même enzyme. Les fragments ont ensuite été ligués (4,5 μ L d'insert et 2,5 μ L de vecteur dans un volume final de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés durant 150 minutes à 22°C. Ce plasmide se nomme pTnIS(Im) β . Afin d'ajouter le site AgeI, le plasmide a été digéré par l'enzyme XbaI, déphosphorylé par la phosphatase alcaline, purifié grâce au «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Le site de restriction AgeI a été ajouté à l'aide d'une amorce préalablement hybridée. L'amorce utilisée est la suivante : 5'- CTA GAC AGA CCG GTC TGT-3'. Les conditions d'hybridation étaient identiques à celles présentées pour le plasmide p(Im)-ASXK. L'amorce hybridée a ensuite été phosphorylée par l'enzyme T4 polynucléotide kinase. Les fragments ont ensuite été ligués (1 μ L d'insert et 4 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pour 24 heures à 16°C.

pTnIS(Im) β -USEx2

Le fragment d'environ 250 pb contenant le USE a été isolé par PCR à partir du pTnIS(Im) β . Les amorces utilisées lors du PCR sont les suivantes : 5'- GTA CTA

CTA GTA CCG AGC TCT TAC GCG TGC-3'et 5'- GGT ACG TCT AGA TAA
GCT TCC CAC TGC CCC CTC CTG C-3'.

Les conditions d'amplification étaient :

200 ng d'ADN		30 secondes à 95°C
10 µL de tampon Phusion 5X		10 secondes à 95°C
2,5 µL d'amorces à 10 µM	Répété 30 fois	30 secondes à 62°C
4 µL dNTP à 1 mM		30 secondes à 72°C
0,5 µL de l'enzyme Phusion		10 minutes à 72°C
X µL de dH ₂ O pour volume final de 50 µL		Infini à 4°C

Le produit PCR a ensuite été purifié à l'aide du «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et élué dans 50 µL de tampon d'éluion. L'éluat a ensuite été digéré par les enzymes SpeI/XbaI. Le produit de PCR a été purifié par le «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et élué dans 50 µL. Le vecteur pTnIS(Im)β a aussi subi une digestion par l'enzyme SpeI pour ensuite être déphosphorylé grâce à la phosphatase alcaline. Le vecteur a été purifié grâce au «PCR Purification Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et élué dans 50 µL. Par la suite, les fragments ont été ligués (6 µL d'insert et 1 µL de vecteur dans un volume total de 10 µL) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pendant 150 minutes à 22°C.

pTnIS(Im)β-UEx3

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im)β-UEx2 (en remplaçant le pTnIS(Im)β par le plasmide pTnIS(Im)β-UEx2).

pTnIS(Im)β-UEx4

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im)β-UEx2 (en remplaçant le pTnIS(Im)β par le plasmide pTnIS(Im)β-UEx3) à l'exception de la purification du produit PCR qui a été exécutée selon le protocole de «PCR Purification Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.).

pTnIS(Im) β -USEx5

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im) β -USEx2 (en remplaçant le pTnIS(Im) β par le plasmide pTnIS(Im) β -USEx3) à l'exception de la purification du produit PCR qui a été effectuée par «PCR Purification Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.).

pTnIS(Im) β - Δ USEx1

Le fragment d'environ 150 pb contenant le USE tronqué a été isolé par PCR à partir du pTnIS(Im) β . Les amorces utilisées lors du PCR sont les suivantes : 5'- GCG GGG AGA TCT GGA TAT CGA TAT AGG GTG GGT ATT ATG-3' et 5'- GGT ACG TCT AGA TAA GCT TCC CAC TGC CCC CTC CTG C-3'. Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles utilisées lors de la construction du plasmide pTnIS(Im) β -USEx2.

Ensuite, le produit PCR a été purifié à l'aide du «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L de tampon d'éluion. L'éluat a ensuite été digéré par l'enzyme BglII. Le produit PCR a été purifié par le «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Le vecteur pTnIS(Im) β -AgeI a aussi subi une digestion par l'enzyme BglII pour ensuite être déphosphorylé grâce à la phosphatase alcaline. Le vecteur a été purifié grâce au «PCR Purification Kit» (Qiagen, Missisauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Par la suite, les fragments ont été ligués (7 μ L d'insert et 1 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés durant 4 heures à 22°C et ensuite, pendant 24 heures à 16°C.

pTnIS(Im) β - Δ USEx1(-)

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im) β - Δ USEx1.

pTnIS(Im) β - Δ USEx2

Le fragment d'environ 150 pb contenant le USE tronqué a été isolé par PCR à partir du pTnIS(Im) β . Les amorces utilisées lors du PCR sont les suivantes : 5'- GCG GGG ACT AGT GGA TAT CG ACTA TAG GGT GGG TAT TAT G-3' et

5'- GGT ACG TCT AGA TAA GCT TCC CAC TGC CCC CTC CTG C-3'. Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles utilisées lors de la construction du plasmide pCMV(Im) β à l'exception de la concentration de l'ADN [200 ng] et la concentration des dNTP [1 mM].

Ensuite, le produit PCR est purifié à l'aide du «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L de tampon d'éluion avant d'être digéré par les enzymes SpeI / XbaI. Le produit PCR digéré a été purifié par le «Gel Extraction Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Le vecteur pTnIS(Im) β - Δ USEx1 a été digéré par l'enzyme SpeI et déphosphorylé par la phosphatase alcaline. Le vecteur a été purifié par le «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 50 μ L. Par la suite, les fragments ont été ligués (6 μ L d'insert et 1 μ L de vecteur dans un volume total de 10 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pour une durée de 4 heures à 22°C suivi d'une incubation de 24 heures à 16°C.

pTnIS(Im) β - Δ USEx2(-)

Le fragment d'environ 150 pb contenant le USE délété a été isolé par PCR à partir du pTnIS(Im) β . Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles utilisées lors de la construction du plasmide pTnIS(Im) β -USEx2 à l'exception de la température d'hybridation (30 secondes à 68°C en remplacement de 30 secondes à 62°C).

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im) β - Δ USEx2 (en remplaçant le plasmide pTnIS(Im) β - Δ USEx1 par le plasmide pTnIS(Im) β - Δ USEx1 (-)) à l'exception du procédé de purification qui a été effectué à l'aide du «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.).

pTnIS(Im) β - Δ USEx3

Durant l'amplification par PCR du fragment Δ USE lors de la construction du plasmide pTnIS(Im) β - Δ USEx2, il y a eu une erreur d'amplification dans la partie 5' du produit PCR. La séquence prévue du plasmide était :

1 5'- GAA TTG GCG CGC CAC TAG TGG ATA TCG ACT ATA GGG-3' 26

La séquence obtenue est :

1 5'- GAA TTG GCG CGC CAC GAC TAT AGG G-3' 26

Cette erreur dans la séquence de nucléotide a été confirmée par séquençage ainsi que par des digestions plasmidiques. Un troisième Δ USE a donc été ajouté à l'aide de nouvelles amorces. Les amorces utilisées lors du PCR sont les suivantes : 5'- ATA GGC GCG CCG TAC TAG TGA CTA TAG GGT GGG TAT TAT G-3' et 5'- ATA ATA CGC GTT AAG CTT CCC ACT GCC CCC TCC TGC-3'. Les conditions d'amplification sont les mêmes que celles utilisées lors de la construction du plasmide pTnIS(Im) β -USEx2 à l'exception de la concentration l'ADN [300ng].

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im) β - Δ USEx2 (en remplaçant le plasmide pTnIS(Im) β - Δ USEx1 par le plasmide pTnIS(Im) β - Δ USEx2 et les enzymes SpeI et XbaI par AscI et MluI respectivement) à l'exception du procédé de purification utilisé soit le «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.).

pTnIS(Im) β - Δ USEx4

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im) β - Δ USEx2 (en remplaçant le pTnIS(Im) β - Δ USEx1 par le plasmide pTnIS(Im) β - Δ USEx3) à l'exception de l'amplification par PCR. L'amplification par PCR a été faite selon les conditions exposées lors de la construction du plasmide pTnIS(Im) β -USEx2.

pCBDysFL-Pme I

Le vecteur pCBDysFL (218) a été digéré par Sall. Des extrémités franches ont ensuite été produites à l'aide de l'enzyme T4 DNA polymérase. Le fragment a été purifié en utilisant le «QIAEX II Protocol for Desalting and Concentrating DNA Solutions» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élué dans 15 μ L. Le fragment a ensuite été ligué à un lien AscI (New England Biolabs, Beverly, MA, É.-U.) (6 μ L d'insert et 2 μ L lien AscI [1 μ g/ μ L] dans un volume total de 20 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase durant 120 minutes d'incubation à 22°C. La ligation est ensuite purifiée en utilisant le «QIAEX II Protocol for Desalting and Concentrating DNA Solutions» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.) et élue dans 20 μ L. L'éluat a ensuite été digéré par

AscI et purifié par «QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). Le fragment digéré a été ligué (8 µL d'ADN dans un volume final de 10 µL) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubé pendant 20 minutes à 22°C. Ce plasmide intermédiaire nommé pCBDysFL-AscI a, par la suite, été digéré par l'enzyme SphI afin de pouvoir insérer le site AgeI dans le plasmide à l'aide d'une amorce préalablement hybridée. L'amorce utilisée est la suivante : 5'- GAT ACC GGT ATC CAT G-3'. Les conditions d'hybridation sont identiques à celles présentées pour le plasmide p(Im)β-ASXK. Les fragments ont ensuite été ligués (1 µL d'insert [0,5 ng/µL] et 4 µL de vecteur dans un volume total de 10 µL supplémenté de 1 µL ATP [10 mM] (Amersham Biosciences, NJ, É.-U.)) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés durant 24 heures à 16°C. Ce plasmide nommé pCBDysFL-AgeI a, à son tour, été digéré par l'enzyme NotI afin d'insérer un troisième site de restriction unique PmeI. Cette insertion est effectuée à l'aide de l'amorce suivante : 5'- GGC CCG TTT AAA CG-3' hybridée selon les mêmes conditions d'hybridation présentées précédemment. Les fragments ont ensuite été ligués (1 µL d'insert [1 µg/µL] et 3 µL de vecteur dans un volume total de 10 µL) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pendant 150 minutes à 22°C.

pTnIS(Im)β-USEx3DysFL

Le fragment d'environ 4 600 pb contenant les trois activateurs USE, le promoteur TnIS, le gène de β-gal et le polyA a été isolé du plasmide pTnIS(Im)β-USEx3 par une digestion AgeI/AscI/XmnI/BspHI. Le vecteur pCBDysFL-Pme I a aussi été digéré par les enzymes AgeI/AscI et déphosphorylé à l'aide de l'enzyme alcaline phosphatase. Le vecteur et l'insert ont ensuite été purifiés grâce au «PCR Purification Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). Les fragments ont ensuite été ligués (1 µL d'insert et 1,3 µL de vecteur dans un volume total de 10 µL) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés durant 4 heures à 22°C.

pTnIS(Im)β-ΔUSEx3DysFL

Les conditions de clonage sont les mêmes que celles présentées lors de la construction pTnIS(Im)β-USEx3DysFL (en remplaçant le pTnIS(Im)β-USEx3 par le plasmide pTnIS(Im)β-ΔUSEx3).

pCBLacZ-ITR

Le plasmide pCMVDysFl (219) a d'abord été digéré par l'enzyme SphI et un site de restriction MluI a été ajouté grâce à l'utilisation d'un lien MluI [1 µg/µL] (New England Biolabs, Beverly, MA, É.-U.). Le promoteur CMV a été excisé suite à une digestion par l'enzyme SalI et AscI. Le plasmide pCBLacZ (183) a été digéré par l'enzyme HindIII afin d'ajouter un site de restriction pour l'enzyme AscI grâce, encore une fois, à l'utilisation d'un lien AscI (New England Biolabs, Beverly, MA, É.-U.). Le plasmide fut ensuite digéré par les enzymes SalI et AscI. Le fragment obtenu contient le promoteur CB, le gène de la β-gal ainsi que le polyA. Ce fragment est ensuite lié au fragment obtenu suite à la digestion par SalI/MluI du plasmide pCMVDysFl.

2.2 Production des plasmides

Les produits de ligation ont été transformés dans des bactéries compétentes *E.coli* DH5_α (Invitrogen, Ca.). La transformation est effectuée en incubant de 2 µL à 5 µL du produit de ligation à 50 µL de bactéries compétentes durant 30 minutes sur la glace. Suite à cette incubation, les bactéries subissent un choc thermique de 20 secondes dans un bain-marie à 37°C pour ensuite être replacées sur la glace durant 2 minutes. Par la suite, 600µL de milieu LB est ajouté au mélange ADN/bactéries, avant d'être incubé pendant 45 minutes à 37°C avec agitation. Suite à cette incubation, les bactéries sont centrifugées à 15 800g afin de produire un culot qui sera resuspendu dans 100 µL de milieu LB frais et étalé sur des géloses LB agar contenant 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.). Une incubation de 24 heures à 37°C suivra. Ensuite, les colonies sont repiquées dans 3 mL de milieu LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) et incubées un autre 24 heures à 37°C avec agitation. Le milieu de culture est ensuite divisé en deux, 1,5 mL de ce mélange est utilisé afin d'extraire le plasmide pur à l'aide du «Qiaprep Spin Miniprep Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). L'ADN plasmidique est ensuite digéré par des enzymes de restriction et les patrons des digestions obtenus sont analysés sur un gel d'agarose 0,8% ou 2% (Wisent, Ca.) grâce à un appareil FluorImager (FluorImager 595, Molecular Dynamics, CA, É.-U.). Le 1,5 mL restant de la culture bactérienne est ensuite utilisé afin d'ensemencer

250 mL de milieu LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) et incubé durant 24 heures à 37°C avec agitation. Le plasmide est alors extrait à l'aide du «Plasmid Maxi Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). L'ADN plasmidique est ensuite analysé selon la même méthode décrite pour les plasmides issus de la culture bactérienne de 3 mL. L'ADN plasmidique est ensuite dosé par absorbance à 260 nm/280 nm avec le spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne). Lors de ce dosage, 5 µL de la solution d'ADN plasmidique purifiée est diluée dans 500 µL d'eau déionisée et l'absorbance a été mesurée à 260 et 280 nm. La pureté de l'ADN plasmidique est déterminée grâce au ratio A260/A280 réalisé par le spectrophotomètre. Lors de ce dosage, le «blanc» fut réalisé à l'aide de 500 µL d'eau déionisée. Une unité d'absorbance à 260 nm équivaut à 50 µg/mL d'ADN double brins.

2.3 Cultures cellulaires

Les cellules humaines HEK-293A (293A) (220) sont un sous-clone d'une lignée immortalisée de fibroblastes rénaux humains transformés par de l'ADN Ad de type 5 (221). Les cellules 293A expriment constitutivement les gènes E1A et E1B de l'Ad. Ces cellules sont utilisées pour la propagation d'Ad délété dans la région E1 grâce à une complémentation en *trans*. Les cellules 293A sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Multicell Wisent Inc, Ca. et Hyclone Utah, É.-U.) supplémenté de 5% (v/v) de sérum de veau foetal (Multicell Wisent Inc., Ca. et Hyclone, Utah, É.-U.) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Ca.). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur maintenu à 5 % de CO₂.

Les cellules 293-cTA sont dérivées des cellules 293A qui ont été transfectées de façon stable avec le plasmide pcDNA-cTA (159). Les cellules transfectées ont été sélectionnées pour la résistance au G418. Ces cellules sont utilisées pour titrer la contamination par le virus auxiliaire lors de l'amplification des adénovirus de troisième génération. Les cellules 293-cTA expriment constitutivement l'activateur cTA permettant l'induction du promoteur CR5. La DsRED est alors fortement exprimée. Les conditions de culture pour les cellules 293-cTA sont les mêmes que pour les cellules 293A.

Les cellules 293FLPe sont dérivées de cellules 293A qui ont été transfectées de façon stable avec le plasmide pCAGGSFLPeIRESpuro (161). Les cellules transfectées ont été sélectionnées pour l'expression stable des transgènes en présence de puromycine [1,5 µg/mL] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.). Ces cellules sont utilisées pour la propagation d'adénovirus de troisième génération. Ces cellules permettent la production d'HDAd tout en diminuant la contamination par le virus auxiliaire utilisé lors de cette production. Les cellules 293FLPe sont cultivées dans du milieu DMEM (Multicell Wisent Inc, Ca. et Hyclone Utah, É.-U.) supplémenté de 7,5% (v/v) de sérum de veau fœtal (Multicell Wisent Inc. Ca. et Hyclone Utah, É.-U.), de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Ca.) et de puromycine [1,5 µg/mL] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur maintenu à 5% de CO₂.

Les cellules humaines A549 sont des cellules épithéliales basiques alvéolaires qui proviennent d'une culture d'explants de tissus carcinomateux de poumons d'un caucasien mâle de 58 ans (222). Les conditions de culture pour les cellules A549 sont les mêmes que pour les cellules 293A.

Les cellules humaines HeLa S3 sont un sous-clone de la lignée cellulaire HeLa, celle-ci cancéreuse (223). Ces cellules proviennent d'un prélèvement de cellules épithéliales d'un carcinome du col de l'utérus chez une femme âgée de 31 ans. Les conditions de culture pour les cellules HeLa S3 sont les mêmes que pour les cellules 293A.

Les cellules murines C2C12 (224) sont un sous-clone d'une lignée de myoblastes murins établie à partir du muscle de la cuisse d'une souris C3H. La particularité des C2C12 est leur capacité à produire des myotubes capables de se contracter au cours de leur différenciation. De plus, les myotubes expriment plusieurs protéines musculaires spécifiques, d'où leur atout lors d'études portant sur la différenciation des cellules non musculaires en cellules musculo-squelettiques (224). Les cellules C2C12 sont cultivées dans du milieu DMEM (Multicell Wisent Inc. Ca. et Hyclone Utah, É.-U.) supplémenté de 10% (v/v) de sérum de veau fœtal (Multicell Wisent Inc. Ca. et Hyclone Utah, É.-U.) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Ca.). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans un incubateur maintenu à 5

% de CO₂. La différenciation en myotubes est induite par le changement de milieu de croissance lorsque les cellules C2C12 sont entre 70 et 90% de confluence. Le milieu de croissance est remplacé par du milieu DMEM (Multicell Wisent Inc. Ca. et Hyclone Utah, É.-U.) supplémenté de 2% (v/v) sérum équin (Sigma, St-Louis, MO, É.-U.) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Ca.).

2.4 Transfection transitoire

Les transfactions transitoires sont effectuées grâce à la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Ca.). Les cellules sontensemencées à une concentration de 4×10^4 (C2C12), 7×10^4 (HeLa et A-549) et 8×10^4 cellules (293A) cellules par puits dans une plaque de 24 puits. Vingt-quatre heures plus tard, le mélange de transfection a été ajouté aux cellules. Ce mélange est constitué de 1 µg de mélange d'ADN et de 2 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad Ca.) tous deux complétés à un volume final de 50 µL grâce à une solution d'opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Ca.). Le mélange d'ADN est constitué d'une fraction égale du plasmide d'intérêt et d'un plasmide rapporteur pAdCMV5SEAPDCGFP (225) exprimant la phosphatase alcaline sécrétée (SEAP) sous le contrôle du promoteur/activateur CMV. Chacune des solutions est incubée pendant 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, les solutions d'opti-MEM contenant l'ADN et la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) sont mélangées puis incubées durant 20 minutes à la température de la pièce. Le mélange final de 100 µL contenant l'ADN, la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) et l'opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) est ajouté délicatement à chacun des puits. Quarante-huit heures (293A, HeLa S3, A549, C2C12 myoblastes) ou 11 jours (C2C12 myotubes) suivant la transfection, les échantillons de β-gal et de phosphatase alcaline sécrétée sont récoltés.

2.5 Électroporation de souris CD1

Toutes les expériences animales ont été effectuées conformément aux règles établies par le Comité de protection des animaux de l'Université McGill et de l'Institut de recherche en biotechnologie. Des souris CD1 adultes (CD1, Charles River Laboratories) de cinq à six semaines ont été utilisées. Préalablement à l'électroporation, 30 µL d'hyaluronidase (0,4 U/µL diluée dans une solution saline)

(Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, É.-U.) ont été injectés dans le muscle tibialis antérieur (TA) de chacune des souris anesthésiées. Deux heures suivant cette opération, celles-ci ont été injectées avec 40 μL de plasmide [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$]. Les conditions de production des plasmides injectés sont les mêmes que celles présentées lors de la production de plasmides à l'exception de l'étape finale d'extraction. L'extraction de l'ADN plasmidique est effectuée à l'aide du «Endofree Plasmid Maxi Kit» (Qiagen, Mississauga, ON, Ca.). L'ADN plasmidique a été resuspendu dans du tampon phosphate salin (PBS) (Multicell Wisent Inc, Ca. et Hyclone Utah, É.-U.). Suite à cette injection, un courant électrique de 8 pulsations de 175 volt/cm² (durée: 20 millisecondes; intervalle: 1 seconde) a été appliqué grâce à un système d'électroporation (ECM 830; BTX Division, Genetronix, San Diego, CA, É.-U.) à l'aide d'électrodes circulaires (7 mm de diamètre). Deux expériences d'électroporation ont été effectuées. Six et huit muscles ont respectivement été injectés (sur 3 à 4 souris). Dix jours suivant l'injection, les souris ont été euthanasiées et le TA entier a été prélevé et congelé dans de l'azote liquide. Des sections cryogénéisées du TA ont été resuspendues dans du tampon de lyse « β -Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent» (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Allemagne) et la quantité totale de protéines dans chacun des échantillons a été mesurée. Le nombre de fibres positives pour la β -gal a aussi été dénombré pour chacun des plasmides.

2.6 Production d'adénovirus recombinants

Tous les adénovirus ont été produits et amplifiés dans du milieu complet DMEM (Hyclone Utah, É.-U.) supplémenté de 7,5% (v/v) de sérum de veau fœtal (Hyclone Utah, É.-U.) et de 2 mM de L-glutamine (Wisent, Ca.).

Afin de produire des adénovirus de troisième génération TnIS(Im) β -USEx3 et TnIS(Im) β - Δ USEx3, les plasmides pTnIS(Im) β -USEx3DysFL et pTnIS(Im) β - Δ USEx3DysFL ont été digérés par PmeI. L'enzyme a ensuite été inactivé et le plasmide linéarisé a été déphosphorylé par la phosphatase alcaline shrimp (Fermentas Inc, MD, É.-U.) qui, à son tour, a été inactivée. Une digestion par l'enzyme AscI a ensuite été réalisée et inactivée. Les fragments d'ADN ont ensuite été purifiés par la

méthode de phénol/chloroforme (226). Les fragments de 15 000 pb ont ensuite été ligués (37,5 μ L d'ADN dans un volume total de 50 μ L) par l'enzyme T4 DNA ligase et incubés pendant 48 heures à 16°C. Le produit de ligation a ensuite été purifié par la méthode de phénol/chloroforme (226). Les conditions de construction de l'HDAd CBLacZ-ITR sont les mêmes que celles présentées lors de la construction des HDAd TnIS(Im) β -USEx3 et pTnIS(Im) β - Δ USEx3 en remplaçant les enzymes PmeI et AscI par les enzymes NotI et Sall.

Le jour 1, les cellules 293FLPe sontensemencées à une concentration de $1,5 \times 10^5$ cellules par puits dans un pétri de 35 mm. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu de culture est retiré et remplacé par 2 mL de milieu de culture frais et le mélange de transfection a été ajouté aux cellules. Ce mélange est constitué de 4 μ g de la ligation préparée précédemment, auquel on ajoute de l'opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) pour un volume final de 250 μ L et de 10 μ L de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad Ca.) dans 250 μ L de opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Ca.). Chacune des solutions est incubée 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, les solutions d'opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) contenant l'ADN et la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) sont mélangées puis, incubées durant 20 minutes à la température de la pièce. Le mélange final de 500 μ L contenant l'ADN, la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) et l'opti-MEM (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) est ajouté délicatement au pétri de 35 mm. Les cellules subissent une agitation douce durant 24 heures. Ensuite, le virus auxiliaire est ajouté à une multiplicité d'infection (MOI) de 15. Suite à une incubation de 72 heures, les cellules 293FLPe sont récoltées et centrifugées à 300g (rotor :H6000A, RC-3B Sorvall Refrigerated centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Inc.) durant 5 minutes afin de produire un culot. Celui-ci est ensuite resuspendu dans 500 μ L de milieu de culture frais. Par la suite, trois cycles de gel-dégel (-80°C / 37°C) sont réalisés dans le but de lyser les cellules et de libérer les particules virales. Ceci correspond au passage 0.

2.7 Amplification des virus

Les virus ont été amplifiés sur des cellules 293FLPe pour tous les cycles d'amplification. Le jour 1, les cellules 293FLPe sontensemencées à une concentration de 5×10^5 cellules par puits dans une plaque de 6 puits. Vingt-quatre

heures plus tard, le milieu de culture est retiré et remplacé par 1 mL de milieu de culture frais additionné de 250 μ L du passage précédent (ici le passage 0) et de X μ L du virus auxiliaire pour une MOI de 15. Les cellules subissent une agitation douce pendant 6 heures. Ensuite, 1 mL de milieu de culture frais y est ajouté. Suite à une incubation de 72 heures, les cellules 293FLPe sont récoltées et centrifugées à 300g (rotor :H6000A, RC-3B Sorvall Refrigerated centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Inc.) durant 5 minutes afin de produire un culot. Ce dernier est ensuite resuspendu dans 500 μ L de milieu de culture frais. Par la suite, trois cycles de gel-dégel ($-80^{\circ}\text{C} / 37^{\circ}\text{C}$) sont réalisés. Ceci correspond au passage 1. Les passages 2 à 6 sont réalisés selon les conditions précédentes. Afin de produire le passage 7, les cellules 293FLPe sontensemencées à une concentration de 3×10^6 à 5×10^6 cellules dans un p etri de 100 mm. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu de culture est retiré et remplacé par 5 mL de milieu de culture frais additionné de 250 μ L du passage précédent (ici le passage 6) et de X μ L du virus auxiliaire pour une MOI de 5. Par la suite, les étapes réalisées dans le but de libérer les particules virales sont les mêmes que celles exposées pour le passage 1. Le culot cellulaire est toutefois resuspendu dans 1 mL de milieu de culture frais. Le passage 8 (un p etri de 150 mm contenant entre 5×10^6 à 7×10^6 de cellules 293FLPe, 500 μ L du passage 7 et X μ L du virus auxiliaire pour une MOI de 5), le passage 9 (10 p etris de 150 mm contenant entre 5×10^6 à 7×10^6 de cellules, 50 μ L du passage 8 et X μ L du virus auxiliaire pour une MOI de 5 et le passage 10 (de 50 à 100 p etris de 150 mm contenant entre 5×10^6 à 7×10^6 de cellules 293FLPe, 10   40 μ L du passage 9 et X μ L du virus auxiliaire pour une MOI de 5) sont réalisés en suivant les mêmes procédures exposées précédemment. Les culots des passages 8 à 10 sont resuspendus dans 2 volumes de culot dans du milieu de culture complet (passages 8 et 9) et Tris-HCl, pH 8 [0.1 M] (MP Biomedicals, Solon, OH,  .-U.).

2.8 Purification des virus

Un premier gradient continu de chlorure de césium (CsCl) (Bioshop Canada Inc., Burlington, ON, Ca.) a été fait dans un tube de 25 mm X 89 mm. Pour chaque mL de surnageant viral, 0,01 volume de sodium deoxycholate 5% (v/v) est ajouté, mélangé puis incubé durant 30 minutes à 22°C . Ensuite, sont ajoutés dans l'ordre:

0,005 volume de $MgCl_2$ [2 M] (BDH Inc., Toronto, Ca.), 0,005 volume d'une solution de DNase 1 (100 mg DNase 1 (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) dilué dans 10 mL de Tris-HCl, pH 7,4 [20 mM], NaCl [50 mM] (EMS, Sciences), dithiothreitol [1 mM] (Bioshop Canada Inc., Burlington, ON, Ca.), d'albumine de sérum de boeuf [0,1 mg/mL] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) et 50% de glycérol (EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Allemagne)) et 0,005 volume d'une solution de RNase A (100 mg RNase A (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) dilué dans 10 mL de Tris-HCl, pH 7,4 [10 mM], et de NaCl [15 mM]). La solution est ensuite bien mélangée et incubée à 37°C de 30 à 45 minutes en agitant fréquemment. Ensuite, pour chaque mL de solution, 0,58 mL de CsCl saturé (150 μ L de Tris-HCl, pH 8 [1.0 M], 30 μ L de EDTA [0.5 M] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.), 29 g de CsCl dans un volume final de 15 mL d'H₂O déionisée) est ajoutée. La solution est ensuite mise dans un tube 25 mm X 89 mm Quick-Seal (Beckman, Palo Alto, CA, É.-U.). La solution peut être complétée avec du CsCl dilué (9 mL de 10 mM Tris-HCl [pH 8], 5,22 mL de CsCl saturé) au besoin. Le tube est ensuite scellé avec un «tube Sealer» (Beckman, Palo Alto, CA, É.-U.). Le virus est ensuite centrifugé durant 24 heures à 116 395g (rotor : type 60 Ti, Beckman L8-M ultracentrifuge, Beckman, Palo Alto, CA, É.-U.). La bande virale a été récoltée à l'aide d'une aiguille de 20G. Le virus est ensuite dilué dans un volume final de 13 mL de CsCl dilué dans un tube de 14 mm X 89 mm Ultra-Clear (Beckman, Palo Alto, CA, É.-U.). Le virus est centrifugé une seconde fois durant 24 heures à 159 512g (rotor : SW41 Ti, Beckman L8-M ultracentrifuge, Beckman, Palo Alto, CA, É.-U.). La bande virale a été récoltée à l'aide d'une aiguille de 20G dans un volume maximum de 2 mL. Le virus est ensuite purifié à l'aide d'une colonne NAP10 (GE Healthcare Biosciences AB, Suède). Cette colonne permet d'enlever le CsCl indésirable. Préalablement à l'ajout du virus sur la colonne, celle-ci est équilibrée avec 15 mL de tampon de congélation (Hepes [50 mM] (Boehringer Mannheim, Allemagne), $MgCl_2$ [2 mM] (BDH Inc., Toronto, Ca.), NaCl [150 mM], 5% Sucrose [pH :7,5] (EM Sciences Darmstadt, Allemagne)). Suite à l'ajout du virus sur la colonne, 1,5 mL de tampon de congélation est ajouté sur celle-ci dans le but de récupérer le virus. Celui-ci purifié, est ensuite conservé à -80°C.

2.9 Titration des virus HDAd

Le titre des virus est exprimé en particules totales. Il est obtenu de la façon suivante : un échantillon de 25 μL de virus HDAd purifié est mis en présence de 475 μL de tampon de Lyse de virion (VLB) (0,1% SDS (EMD Chemicals Inc., Darmstadt, Allemagne), Tris-HCL, pH 7,4 [10 mM] et EDTA [1 mM] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.)). L'échantillon est incubé pendant 10 minutes à 56°C avec agitation fréquente. Le nombre de particules totales est ensuite déterminé par l'absorbance à 260 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Allemagne). Lors de ce dosage, 500 μL de tampon VLB a permis de réaliser le «blanc». Le titre du stock viral en particules virales totales par mL est déterminé par la multiplication de l'absorbance obtenue à 260 nm par le facteur de dilution de l'échantillon et par la constante $1,1 \times 10^{12}$.

Le titre viral infectieux en particules infectieuses par mL est obtenu de la façon suivante : le jour 1, les cellules 293A sontensemencées à une concentration de $1,5 \times 10^5$ cellules par pétri dans un pétri quadrillé (comprenant 200 carrés) de 35 mm. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu de culture est retiré et remplacé par 1 mL de dilution en série du virus à titrer. Suite à une agitation douce d'environ 6 heures, 1 mL de milieu de culture frais est ajouté. Quarante-huit heures suivant les infections, les cellules sont colorées au X-gal. Vingt-quatre heures suivant la coloration, les cellules «bleues» sont dénombrées sur les pétris ayant en moyenne entre 10 et 30 cellules «bleues» par carré. Le titre exprimé en particules infectieuses par mL est obtenu en divisant le nombre moyen de cellules «bleues» dans le pétri par la dilution du virus.

2.10 Titration du virus auxiliaire

Le jour 1, les cellules 293-cTA sontensemencées à une concentration de $1,2 \times 10^5$ cellules par puits dans une plaque de 12 puits. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu de culture est retiré et remplacé par 0,5 mL de dilution en série du virus à titrer. Une agitation douce est ensuite appliquée durant les 6 heures suivantes. Suite à cette opération, 0,5 mL de milieu de culture frais est ajouté. Quarante-huit heures suivant les infections, le surnageant cellulaire ainsi que les cellules sont récoltés et

centrifugés à 300g (rotor :H6000A, RC-3B Sorvall Refrigerated centrifuge, Thermo Fisher Scientific, Inc.) durant 3 minutes. Le culot cellulaire est ensuite resuspendu dans 400 μ L de PBS (Multicell Wisent Inc, Ca. et Hyclone Utah, É.-U.). Les cellules sont ensuite mises en présence de 100 μ L formaldéhyde 10% (Polysciences, Inc., Warrington) durant une période de 30 minutes. Les échantillons sont ensuite analysés par cytofluorométrie de flux. Le titre du virus auxiliaire est déterminé grâce à une courbe de titration. Un même nombre de cellules a été infecté par différentes dilutions de virus HDAd. Le pourcentage de cellules infectées par le virus auxiliaire (cellules RFP positives) permet de tracer une courbe en fonction de la dilution (227). La pente de cette courbe de titration permet alors de déterminer le titre viral puisqu'elle est proportionnelle au titre du virus auxiliaire selon la distribution de Poisson.

2.11 Cytofluorométrie de flux

Les résultats de cytofluorométrie de flux ont été obtenus à l'aide d'un cytofluoromètre Coulter EPICS™ XL flowcytometer (Beckman, Palo Alto, CA, É.-U.). Ceux-ci sont exprimés en pourcentage de cellules positives (cellules rouges).

2.12 Infection des cellules avec les HDAd

Le jour 1, les cellules sontensemencées à une concentration de 5×10^4 (C2C12), 8×10^4 (HeLa et A-549) cellules par puits dans une plaque de 24 puits. Vingt-quatre heures plus tard, le milieu de culture est retiré et remplacé par 0,25 mL de milieu frais contenant X μ L de virus HDAd pour une MOI de 5 000 particules totales. Suite à une agitation douce d'environ 6 heures, 0,25 mL de milieu de culture frais est ajouté. Quarante-huit heures (HeLa S3, A549, C2C12 myoblastes) ou 11 jours (C2C12 myotubes) suivant l'infection, les échantillons de β -gal sont récoltés.

2.13 Injection de souris CD1

Toutes les expériences animales ont été effectuées conformément aux règles établies par le Comité de protection des animaux de l'Université McGill et de l'Institut de recherche en biotechnologie. Quinze souris CD1 adultes (CD1, Charles River Laboratories) âgées de 5 à 6 semaines et 22 souris CD1 nouveau-nées (CD1, Charles

River Laboratories) ont été utilisées au cours de cette expérience. L'injection a été pratiquée sur les souris anesthésiées. L'opération complète comprenant la chirurgie et l'injection dure environ 20 minutes. Chez les souris adultes et nouveau-nées, l'injection percutanée du TA est effectuée à l'aide de 35 μL et 5 μL d'HDAd (1.0×10^{12} particules total/mL) respectivement grâce à une aiguille de 30 gauges. Seize jours suivant l'injection, les souris ont été euthanasiées et le TA entier a été prélevé et congelé dans de l'azote liquide. Des sections cryogénéisées du TA ont été resuspendues dans du tampon de lyse « β -Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent» (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Allemagne) et la quantité totale de protéines dans chacun des échantillons a été mesurée. Les fibres positives pour la β -gal ont aussi été dénombrées pour chacun des HDAd.

2.14 Dosage de protéines

Une évaluation de la quantité protéique par essai colorimétrique est effectuée en suivant la procédure de dosage «Bio-Rad DC Protein Assay» (Bio-Rad Laboratories, Hercules). Cet essai effectué en deux étapes, est basé sur la réaction des protéines avec une solution de tartrate de cuivre dans un milieu alcalin. Dans un second temps, le réactif de folin ajouté est réduit par la protéine liée au cuivre. Les essais sont effectués sur les échantillons de β -gal extraits à l'aide du « β -Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent» (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Allemagne). Les extraits protéiques ont été préparés pour l'analyse selon les recommandations du manufacturier. Une lecture simple à 750 nm est réalisée à la température de la pièce à l'aide d'un lecteur de microplaque Spectro max 250 (Molecular Devices Corporation, CA, É.-U.) sous le contrôle du logiciel Softmax Pro (Molecular Devices Corporation, CA, É.-U.). La densité optique permet de déterminer pour chacun des échantillons, la teneur en protéine ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Cette valeur est ensuite utilisée afin de pouvoir comparer l'efficacité des différentes infections.

2.15 Dosage de la phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline sécrétée est une protéine de 64 kDa dérivée de l'isoforme du placenta humain. Contrairement à plusieurs isoformes de phosphatase alcaline endogène, la SEAP n'est pas inactivée par une température de 65°C et la

présence de L-homoarginine n'affecte pas son activité, alors que ces conditions inactivent de nombreux isoformes de phosphatase alcaline endogène.

Le dosage enzymatique a été établi selon le procédé suivant : 50 μ L de surnageant cellulaire provenant d'une transfection transitoire ont été placés dans une plaque de 96 puits. Chacun des échantillons a préalablement subi une étape d'inactivation à 65°C pendant 10 minutes dans le but d'inactiver les isoformes de phosphatase alcaline endogène. Ensuite, 50 μ L de tampon de SEAP (4-nitrophenyl phosphate (PNPP) [20 mM] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) dans du tampon de SEAP 2X (diethanolamine, pH 9.8 [1 M] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.), MgCl₂ [2 mM], 1-homoarginine [10 mM] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.)) sont ajoutés à chacun des échantillons. Une cinétique à 405 nm est réalisée à la température de la pièce sur une durée de 30 minutes à l'aide d'un lecteur de microplaque Spectro max 250 (Molecular Devices Corp.) sous le contrôle du logiciel Softmax Pro (Molecular Devices Corp.). La lecture est faite à intervalles de 30 secondes. La pente de la cinétique est déterminée pour chacun des échantillons et elle est utilisée afin de pouvoir comparer l'efficacité des différentes transfections.

2.16 Dosage de la β -galactosidase

Le gène de la β -gal est encodé par le gène de β -gal fusionnée (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca.). Ce dernier est nommé fusionné puisqu'il comprend 92 acides aminés provenant du gène de l'alcool déshydrogénase de *Drosophila melanogaster* suivis des acides aminés du gène de LacZ de *E.coli*. Lorsque ce gène est fusionné à un promoteur de cellules de mammifères, il peut servir de gène rapporteur grâce à sa détection dans les extraits cellulaires. La β -gal a été extraite des cellules avec le « β -Gal Reporter Gene Assay, chemiluminescent» (Roche Molecular Biochemical, Mannheim, Allemagne). Les extraits cellulaires ont été préparés pour l'analyse selon les recommandations du manufacturier. Les mesures ont ensuite été prises à l'aide du luminomètre «Microtiter plate luminometer» (Dynex, É.-U.) et du logiciel «Revelation MLX» (Dynex, É.-U.) ou du luminomètre «Labsystems Luminoskan» ou encore du luminomètre «BioOrbit luminometer» (LKB-Fisher, Turku, Finlande).

2.17 Coloration au X-gal

La présence de la protéine β -gal dans les cellules peut être révélée grâce à l'utilisation d'une galactoside, ici le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -galactopyranoside (X-gal). Chez les bactéries, la β -gal catalyse le clivage du lactose en glucose et galactose. Elle catalyse l'hydrolyse de substrat incolore tel que le X-gal en deux composés soit le galactose et un composé insoluble bleu.

La coloration des cellules a été effectuée de la manière suivante : 48 heures (293A, C2C12 myoblastes, 293-cTA) ou 11 jours (C2C12 myotubes) suivant la transfection ou l'infection, le milieu de croissance est retiré. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS pendant 3 minutes. Par la suite, les cellules sont mises en présence de PBS complété avec 0,5 % (v/v) de glutaraldéhyde (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) afin d'induire leur fixation. Subséquemment, le glutaraldéhyde est retiré et les cellules sont lavées à deux reprises durant 3 minutes à l'aide de PBS. Le tampon X-gal (chlorure de magnésium [1 mM] (BDH Inc., Toronto, Ca.), ferricyanide de potassium [5 mM] (BDH Inc., Toronto, Ca.), ferrocyanide de potassium [5 mM] (Produits Chimiques Américains Ltée, Toronto, Ca.) dans du PBS (Multicell Wisent Inc, Ca. et Hyclone Utah, É.-U.)) supplémenté de 10 μ L par mL de X-gal [20 mg/mL] (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, É.-U.) dilué dans du diméthylformamide (Produits Chimiques Américains Ltée, Toronto, Ca.) est ajouté à chacun des puits. La plaque est maintenue à 5 % de CO₂ pendant 24 heures à 37°C dans un incubateur.

2.18 Microphotographies

Les photographies de transfections ont été prises avec une caméra couleur refroidie DEC-750 (Zeiss Optronics, Allemagne), un microscope inversé DMIL avec un objectif 10x C Plan (Leica Microsystems, Allemagne) et le logiciel Apple Video Player (Apple Computers, CA, États-Unis). Les photographies de sections musculaires ont été prises avec une caméra couleur CC-12 (Soft Imaging Systems, Allemagne), un microscope CKX41 (Olympus, Allemagne) et le logiciel Cell D (Olympus/Soft Imaging Systems, Allemagne).

2.19 Analyses statistiques

Les données sont exprimées par la moyenne \pm erreur standard de la moyenne ES(M). Celles-ci ont été analysées selon une analyse de la variance (ANOVA) suivie d'une analyse de Fisher (LSD) dans le but de comparer les moyennes. Le seuil de signification statistique a été placé à $p < 0,05$. Les analyses ont été effectuées à l'aide du logiciel «GB-STAT» (Dynamic Microsystems, Inc). Ces dernières ont été effectuées sur les données normalisées ou encore sur les données normalisées modifiées par le «log» en base 10.

Section 3 :
Résultats

3.1 Développement de promoteurs efficaces et muscles spécifiques

3.1.1 Description des constructions plasmidiques

Tel qu'il a été mentionné dans la section revue de littérature, nous voulions développer un promoteur muscle spécifique pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne. Pour ce faire, nous avons cherché à développer un promoteur fortement actif dans les cellules musculaires lentes et rapides. Ces promoteurs devraient aussi avoir une activité très faible dans les cellules non musculaires. Nous disposions, au sein du laboratoire, du promoteur muscle spécifique de la créatine kinase murin (MCK) (figure 9). Nous voulions comparer sa puissance à d'autres promoteurs muscles spécifiques tel que le promoteur minimal de l'isoforme lent de la troponine I humaine. Il a été démontré précédemment que la fusion de trois copies des activateurs IRE du TnIF de caille (figure 9) confère une expression muscle spécifique *in vivo* (229). Par conséquent, nous avons aussi testé des constructions contenant le promoteur minimal TnIF de caille lié à trois copies de l'activateur IRE. Nous avons également décidé de développer et de tester des constructions contenant plusieurs copies de l'activateur USE ou de l'activateur tronqué Δ USE du gène de la TnIS humain (figures 10 et 11). Certaines de ces constructions contiennent les activateurs IRE ou Δ USE dans deux orientations possibles soit l'orientation naturelle (5'-3') ou inversée (3'-5'). L'avantage de tronquer l'activateur USE réside dans l'expression du transgène à la fois dans les fibres lentes et rapides puisque l'expression du transgène n'est plus confinée aux fibres de type lentes.

La puissance des nouvelles constructions développées a été comparée à celle du promoteur/immédiat-précoce CMV et du promoteur hybride de la β -actine de volailles (CB) (figure 9). La puissance de nos activateurs/promoteurs a aussi été comparée à celle de l'activateur/promoteur MCK. Il a été démontré, par l'utilisation de vecteurs adénoviraux de première génération, que l'activateur/promoteur MCK confère une expression muscle spécifique lors d'expériences *in vivo* (193;214).

D'autre part, des études ont démontré que la présence d'introns peut améliorer le niveau et la stabilité de l'expression d'un gène *in vivo* (212;213;230). C'est la

raison pour laquelle nous avons inséré, après le site d'initiation de la transcription, un petit intron de 100 pb dans chacune de nos constructions, à l'exception des constructions CB et MCK. Cet intron est dérivé de l'ARN messenger tardif 16/19S du polyomavirus simian 40 (SV40). L'intron original (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca.) contient un ATG pouvant initier la traduction à partir du site accepteur et donneur du 19S lorsque ce dernier n'est pas complètement épissé (dans 10 à 20% du temps) (211). Nous avons donc modifié la séquence ATG de l'intron pour la séquence ATA (voir la section Matériel et méthode). Ce changement empêche la formation d'une protéine de fusion indésirable. À noter que toutes les constructions plasmidiques ont été construites à partir du même plasmide de départ où chacun des activateurs/promoteurs contrôle l'expression de l'enzyme β -gal, utilisé ici comme gène rapporteur.

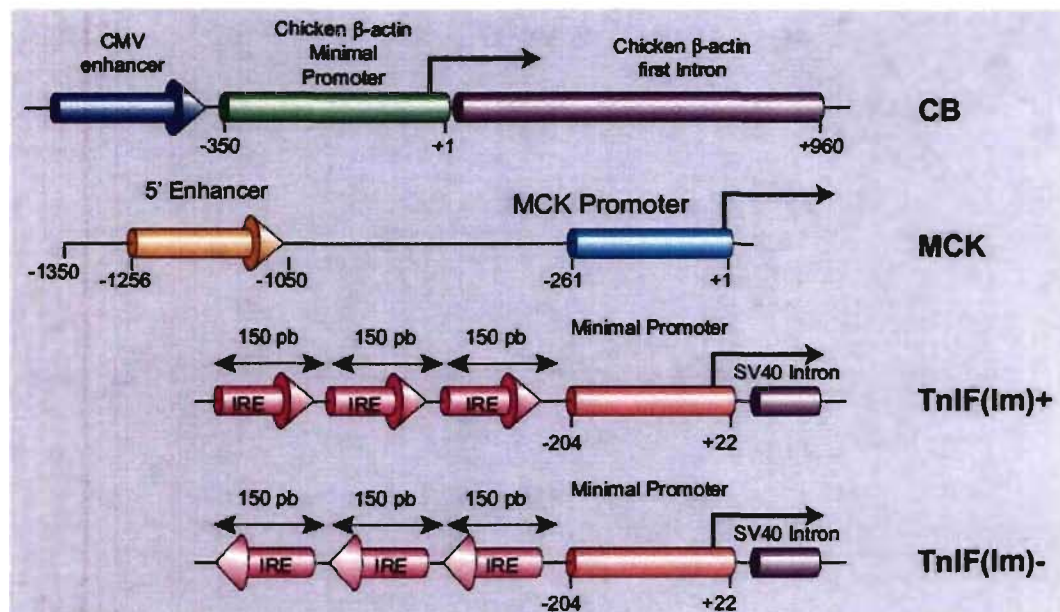


Figure 9 : Construction contrôle : constructions dérivées de promoteurs muscles spécifiques et viraux

Sur chacune des constructions, la position du promoteur minimal et de l'activateur est indiquée. La construction CMV est constituée de l'activateur promoteur/immédiat-précoce du cytomégalo virus humain. La construction CB (aussi connue sous le nom de CAG) est constituée de l'activateur immédiat/précoce du CMV lié au promoteur minimal fusionné au premier intron du gène de la β -actine de volaille. La construction MCK contient le fragment en amont de 1,35kb du gène de la créatine kinase musculaire murin et la construction TnIF contient le promoteur minimal du gène de l'isoforme rapide de la troponine I de caille lié à trois copies de l'activateur du premier intron du même gène (IRE) dans une orientation naturelle (+) ou inversée (-).

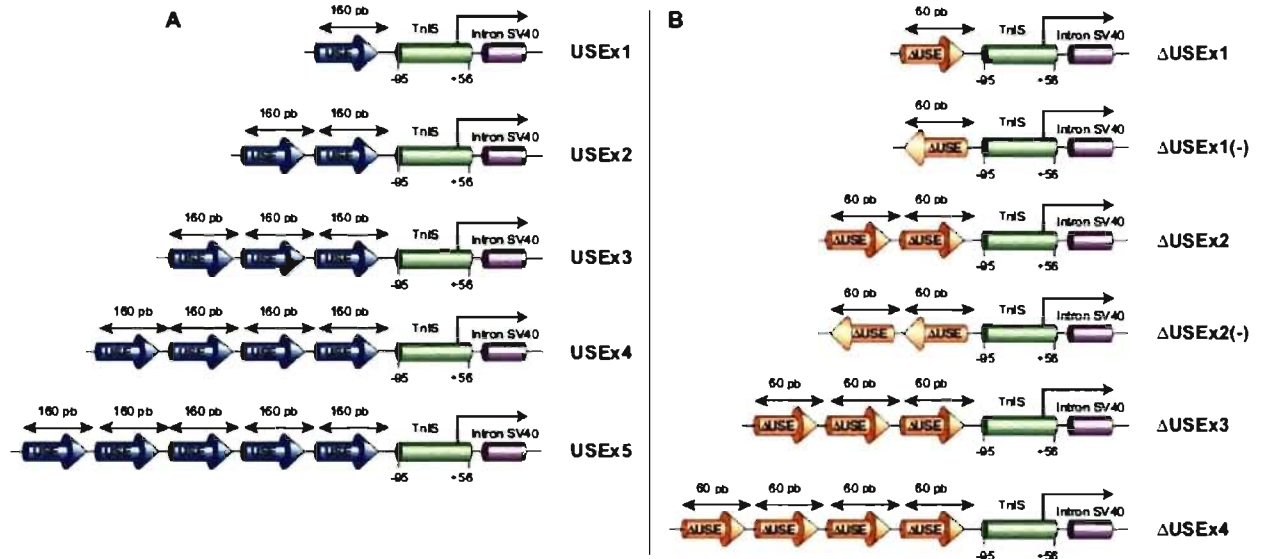


Figure 10 : Structure des constructions dérivées du gène de l'isoforme lent de la troponine I humain

A) Construction contenant l'activateur en amont du gène TnIS (USE) B) Construction contenant l'activateur tronqué en amont du gène TnIS (Δ USE). Toutes les constructions sont constituées d'une fusion du promoteur minimal (région -95 :+56) du gène TnIS humain à une ou cinq copies du USE ou à une à quatre copies du Δ USE. Dans deux constructions Δ USE (Δ USEx1(-) et Δ USEx2(-)), les activateurs sont dans une orientation inversée. Toutes les constructions ont été fusionnées à un intron dérivé du SV40.

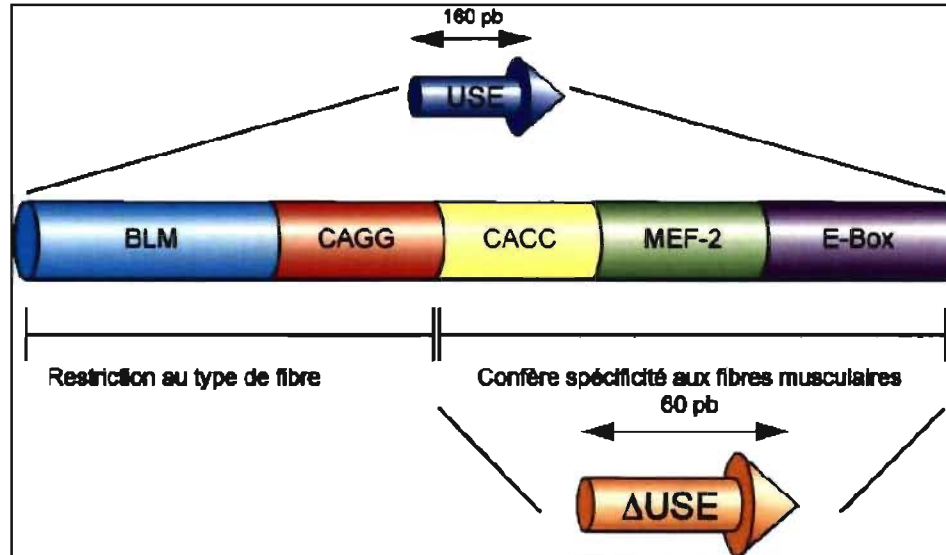


Figure 11 : Structure de l'activateur tronqué du Δ USE

L'activateur tronqué Δ USE confère une spécificité aux fibres musculaires. Il est composé d'un domaine E-Box, MEF-2 et d'un motif CACC liant respectivement les protéines MyoD/Myogénine, MeF-2 et le facteur de transcription Sp1. Entre les domaines MEF-2 et E-box, il y a la présence d'un domaine NFAT.

3.1.2 Effet de la modification de l'ATG intronique du pCMV β

Tout d'abord, nous devons nous assurer que la modification effectuée sur l'intron de 100 pb n'affectait pas l'activité basale du promoteur CMV. Afin de nous en assurer, nous avons comparé parallèlement l'activité du promoteur CMV lié à l'intron modifié (Im) ou lié à l'intron original dans les cellules non musculaires. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules 293A avec les plasmides pCMV β et pCMV(Im) β . Lors de cette transfection, nous avons ajouté le plasmide rapporteur pAdCMV5SEAPDCGFP, codant pour la protéine SEAP, afin de pouvoir normaliser nos données de transfection. Quarante-huit heures suivant la transfection, le surnageant cellulaire a été recueilli. La teneur en SEAP de l'échantillon a été mesurée afin de déterminer l'efficacité de la transfection. La β -gal a aussi été extraite des cellules. La valeur de β -gal déterminée par luminométrie, a été normalisée par la valeur de SEAP de ce même échantillon. Finalement, les valeurs sont normalisées pour une valeur arbitraire de 100 pour le plasmide pCMV(Im) β . Cette méthode de normalisation a été utilisée lors de chacune des transfections transitoires en cultures cellulaires.

Comme nous pouvons le constater à la figure 12, la présence de l'intron modifié ne permet pas une production significativement différente du gène rapporteur à partir du promoteur CMV.

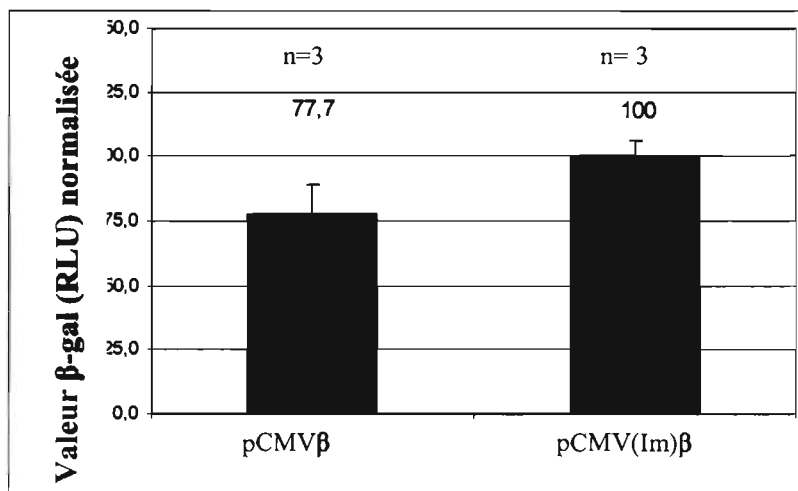


Figure 12 : Comparaison de l'activité du promoteur CMV avec l'intron modifié ou l'intron original dans les cellules 293A

$1,6 \times 10^5$ cellules 293A ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV β ou pCMV(Im) β . Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées deux jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Comme la présence de l'intron modifié n'affecte pas la production du gène rapporteur et que cette modification ne devrait pas permettre la formation d'une protéine de fusion, nous avons décidé d'insérer l'intron modifié dans nos constructions à venir.

3.1.3 Puissance des promoteurs muscles spécifiques TnIF et TnIS en cultures cellulaires

Tel que mentionné dans la section Revue de littérature, nous voulions développer des promoteurs muscles spécifiques puissants actifs à la fois dans les cellules musculaires lentes et rapides. Notre laboratoire possédait déjà le promoteur muscle spécifique MCK. Alors, nous avons cherché à obtenir les promoteurs de l'isoforme rapide et lent de la troponine I. Les éléments régulateurs de ces promoteurs ont été bien caractérisés dans la littérature. De plus, des études ont démontré qu'il s'agit de deux promoteurs muscles spécifiques puissants. Ces deux éléments ont été les principales raisons de notre choix. Lorsque nous avons obtenu les activateurs/promoteurs TnIF et TnIS (gracieusement fournis par le Docteur Ken Hasting de l'Institut de neurologie de Montréal, Université McGill, Montréal, QC, Ca), nous avons décidé d'insérer les activateurs/promoteurs dans le même plasmide de départ (p(Im)-ASXK). De cette façon, l'unique différence entre les diverses constructions muscles spécifiques sera l'activateur/promoteur d'intérêt.

Les constructions contenant les promoteurs MCK, TnIF(-) et USEx1 ont été les premières que nous avons testées. Nous voulions déterminer la spécificité de ces constructions pour les cellules non musculaires. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules 293A avec les plasmides pCMV(Im) β , MCK, TnIF(-) et USEx1. Nous pouvons constater à la figure 13 que l'activité des promoteurs muscles spécifiques MCK, TnIF(-) et USEx1 dans les cellules 293A correspond à environ 0,07 % de l'activité du CMV. Ceci correspond également à l'activité du contrôle négatif de transfection (cellules non transfectées).

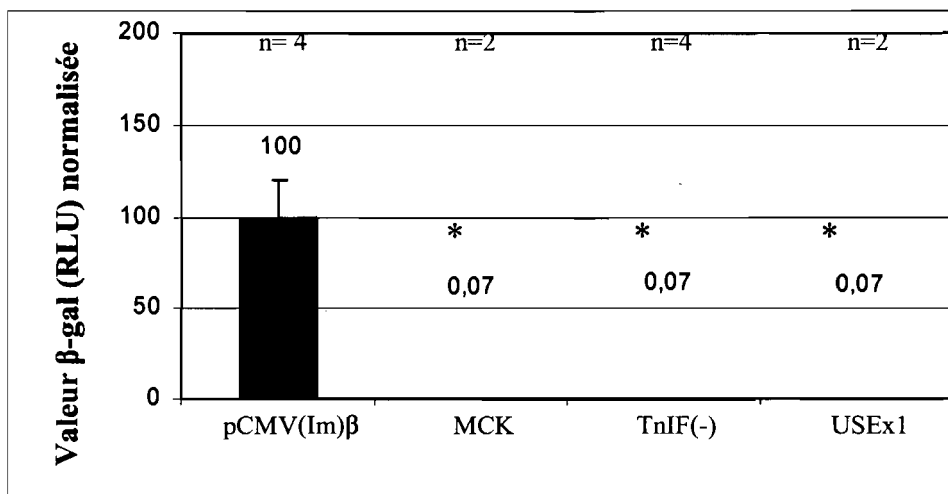


Figure 13 : Comparaison de l'activité des promoteurs MCK, TnIF(-) et USEx1 dans les cellules 293A

$1,6 \times 10^5$ cellules 293A ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im)β, pMCKβ, pTnIF(Im)β(-) ou pTnIS(Im)β. Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées deux jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Après avoir déterminé l'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les cellules non musculaires, nous voulions déterminer leur activité dans les myotubes murins. Pour y parvenir, nous avons transfecté des cellules C2C12 myoblastes dont nous avons induit la différenciation en myotubes sur une période de 10 jours. À la figure 14, nous pouvons constater que l'activité des promoteurs muscles spécifiques MCK et TnIF(-) ou USEx1 dans les cellules C2C12 myotubes correspond respectivement à environ 3 % et 40 % de l'activité du CMV. Il est important de noter que l'activité des promoteurs TnIF(-) et USEx1 est significativement différente de celle du promoteur MCK. Il existe plusieurs versions du promoteur MCK. Celle que nous avons utilisé a déjà été testée à l'aide de vecteur adénovirus de première génération. Un promoteur MCK différent, plus long, a aussi été testé avec des HDAd *in vivo*. Il a été établi qu'il s'agit d'un promoteur muscle spécifique puissant (193).

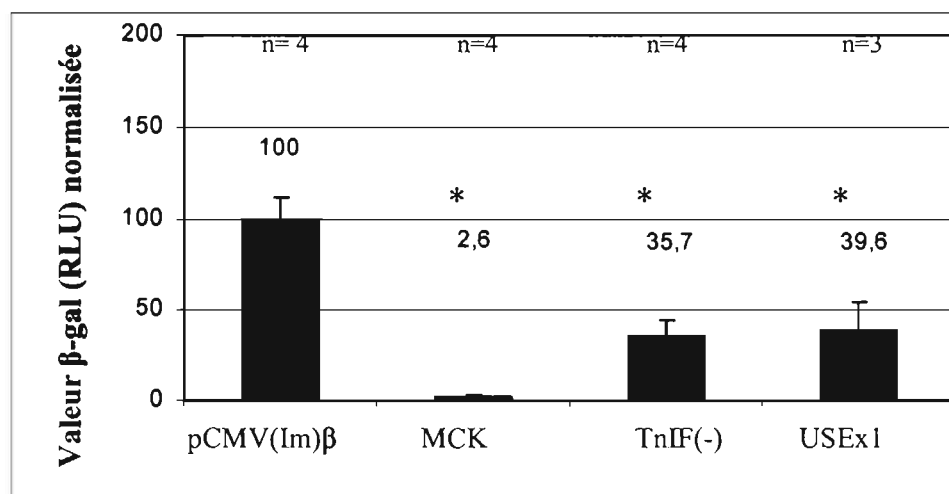


Figure 14 : Comparaison de l'activité des promoteurs MCK, TnIF(-) et USEx1 dans les cellules C2C12 myotubes

8x10⁴ cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec 1 µg du plasmide pCMV(Im)β, pMCKβ, pTnIF(Im)β(-) ou pTnIS(Im)β. Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Vingt-quatre heures suivant la transfection, le milieu de culture a été remplacé afin d'induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été récoltées onze jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Puisque l'activateur/promoteur USEx1 permet une meilleure production de β-gal que le promoteur MCK, nous avons décidé d'utiliser ce dernier afin de développer un promoteur muscle spécifique efficace. Comme nous pouvons le voir à la figure 9, l'activateur/promoteur TnIF comporte trois copies de l'activateur IRE. Nous avons décidé de multimériser l'activateur USE du promoteur USEx1 afin de déterminer l'effet de l'ajout d'un activateur sur l'activité du promoteur TnIS. Parallèlement, nous avons décidé de créer une délétion dans l'activateur USE (ΔUSE). Cette délétion devrait permettre au gène rapporteur d'être exprimé à la fois dans les fibres musculaires lentes et rapides.

3.1.4 Effet de la multimérisation des activateurs USE et ΔUSE *in vitro*

Tel que mentionné précédemment, il a été démontré que l'activateur/promoteur TnIF lié à trois copies de l'activateur IRE est un promoteur muscle spécifique puissant. Puisque l'activité du promoteur USEx1 lié à une copie de l'activateur USE n'est pas statistiquement différente de celle du promoteur TnIF(-) contenant trois copies de l'activateur IRE, nous voulions déterminer si l'ajout

d'activateur USE allait augmenter l'activité de notre promoteur. Cette expérience nous permettra aussi de déterminer l'efficacité du promoteur Δ USEx1 lié à l'activateur tronqué. De plus, nous voulions déterminer si l'orientation de l'activateur Δ USE influençait l'activité du promoteur TnIS. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules C2C12 myoblastes. Dans 50% des puits, nous avons induit la différenciation en myotubes durant 10 jours.

Tel que présenté sur la figure 15, nous pouvons constater que l'activité des promoteurs muscles spécifiques TnIF(-), USEx2, Δ USEx1 et Δ USEx1(-) correspond à environ 12%, 20%, 12% et 24% de l'activité du CMV respectivement dans les cellules C2C12 myoblastes. Il est intéressant de noter que l'orientation inverse de l'activateur Δ USE affecte positivement l'activité du promoteur dans les myoblastes. L'activité du plasmide Δ USEx1(-) est statistiquement différente de son homologue Δ USEx1. Nous pouvons aussi conclure que l'ajout d'un activateur USE a un effet positif sur l'activité du promoteur. En effet, la différence de production du gène rapporteur entre le promoteur USEx1 et USEx2 est statistiquement différente. De plus, on peut voir que l'ajout d'un second USE permet une expression significativement plus élevée que le promoteur TnIF(-).

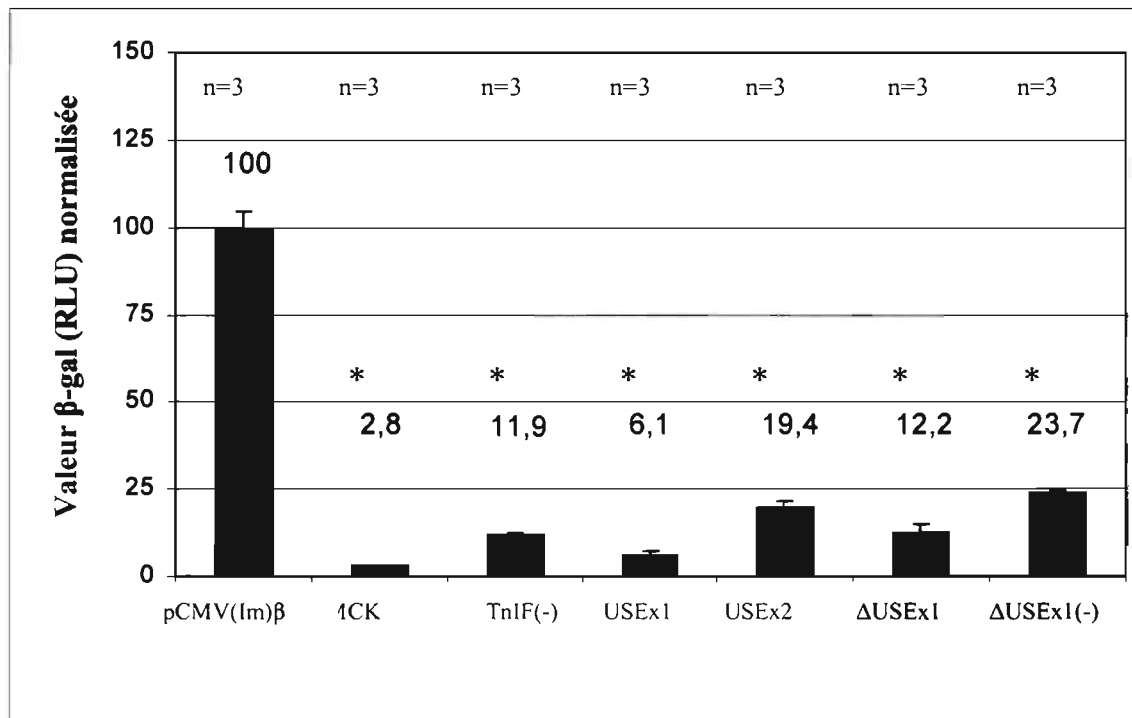


Figure 15 : Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx2, ΔUSEx1 et ΔUSEx1(-) dans les cellules C2C12 myoblastes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(1m)β, pMCKβ, pTnIF(1m)β(-), pTnIS(1m)β, pTnIS(1m)β-USEx2, pTnIS(1m)β-ΔUSEx1, ou pTnIS(1m)β-ΔUSEx1(-). Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées deux jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Tel que présenté à la figure 16, nous pouvons constater que l'activité du promoteur muscle spécifique USEx2 est environ 34 fois plus élevée que l'activité du CMV dans les myotubes. De plus, on constate que l'activité du promoteur ΔUSEx1 n'est pas statistiquement différente de celle du CMV dans les cellules C2C12 myotubes. Contrairement à ce que l'on peut observer sur la figure 14, on constate que dans les myotubes, l'orientation inverse de l'activateur ΔUSE semble affecter négativement l'activité du promoteur TnIS. En effet, l'activité du plasmide ΔUSEx1(-) est significativement plus faible que celle du plasmide ΔUSEx1.

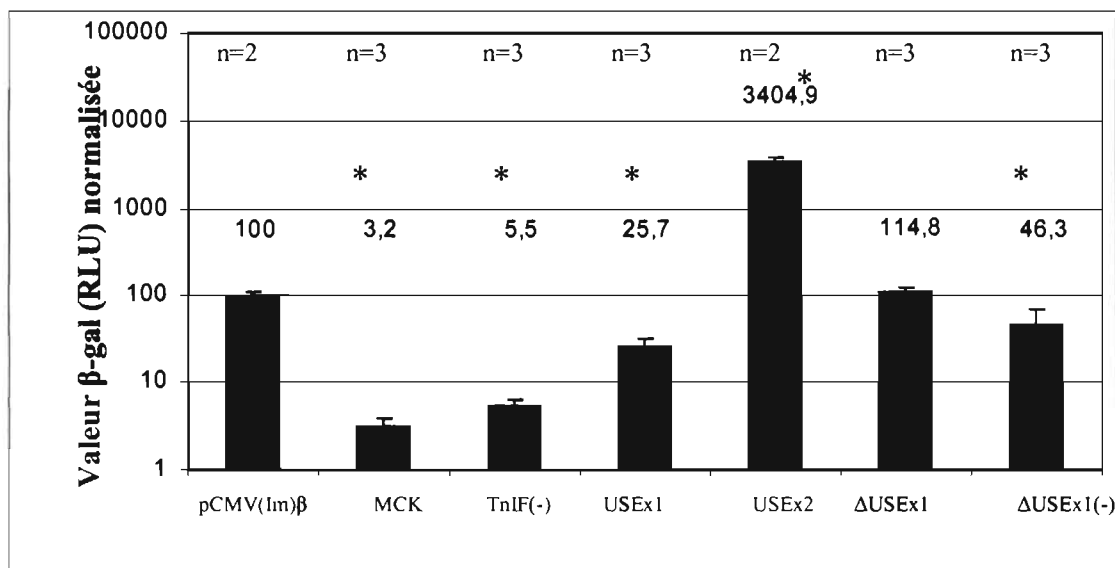


Figure 16 : Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx2, ΔUSEx1 ou ΔUSE(-) dans les cellules C2C12 myotubes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im)β, pMCKβ, pTnIF(Im)β(-), pTnIS(Im)β, pTnIS(Im)β-USEx2, pTnIS(Im)β-ΔUSEx1, ou pTnIS(Im)β-ΔUSEx1(-). Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Vingt-quatre heures suivant la transfection, le milieu de culture a été changé pour induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été récoltées onze jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

À la lumière de ces résultats, nous avons pris la décision de poursuivre la multimérisation des activateurs USE et ΔUSE par l'ajout d'un troisième USE et d'un second ΔUSE. Nous voulions déterminer l'activité de ces nouveaux promoteurs muscles spécifiques dans les cellules musculaires et non musculaires. Puisque nous avons développé un promoteur muscle spécifique dont l'activité est plus puissante que le CMV, nous avons décidé d'inclure dans nos plasmides contrôles, un plasmide contenant le promoteur hybride CB (figure 9). Des études effectuées à l'aide d'HDAd ont démontré que le promoteur CB est plus puissant que le promoteur CMV (218). Nous voulions comparer l'activité de nos promoteurs muscles spécifiques tel que le USEx2 à ce promoteur.

Une fois de plus, nous avons transfecté des cellules 293A et des cellules C2C12 myoblastes dont nous avons induit la différenciation en myotubes sur une période de 10 jours dans 50% des transfections.

Tel que présenté sur la figure 17, nous pouvons constater que l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx2, USEx3 et Δ USEx3 est respectivement 18 fois, 39 fois et 9 fois plus élevée que l'activité du CMV dans les cellules C2C12 myotubes. À noter que l'activité du promoteur USEx3 n'est pas statistiquement différente de l'activité du promoteur CB. Tout comme à la figure 16, on peut observer à la figure 17, que l'orientation inverse de l'activateur Δ USE semble affecter négativement l'activité du promoteur TnIS dans les cellules C2C12 myotubes. L'activité des promoteurs Δ USEx1(-) et Δ USEx2(-) est statistiquement différente de celle des promoteurs Δ USEx1 et Δ USEx2. On remarque aussi que l'activité des promoteurs Δ USEx1, Δ USEx2 et Δ USEx2(-) est statistiquement semblable à celle du promoteur CMV.

Les résultats obtenus lors des transfections des cellules 293A et C2C12 myoblastes nous permettent de déterminer que l'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les cellules non musculaires 293A correspondait à environ 0,1% à 0,6% de l'activité du CMV (données non présentées). Cette activité est significativement semblable à celle du contrôle négatif de transfection. L'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les C2C12 non différenciés correspondait à environ 1% à 4% de l'activité du CMV (données non présentées).

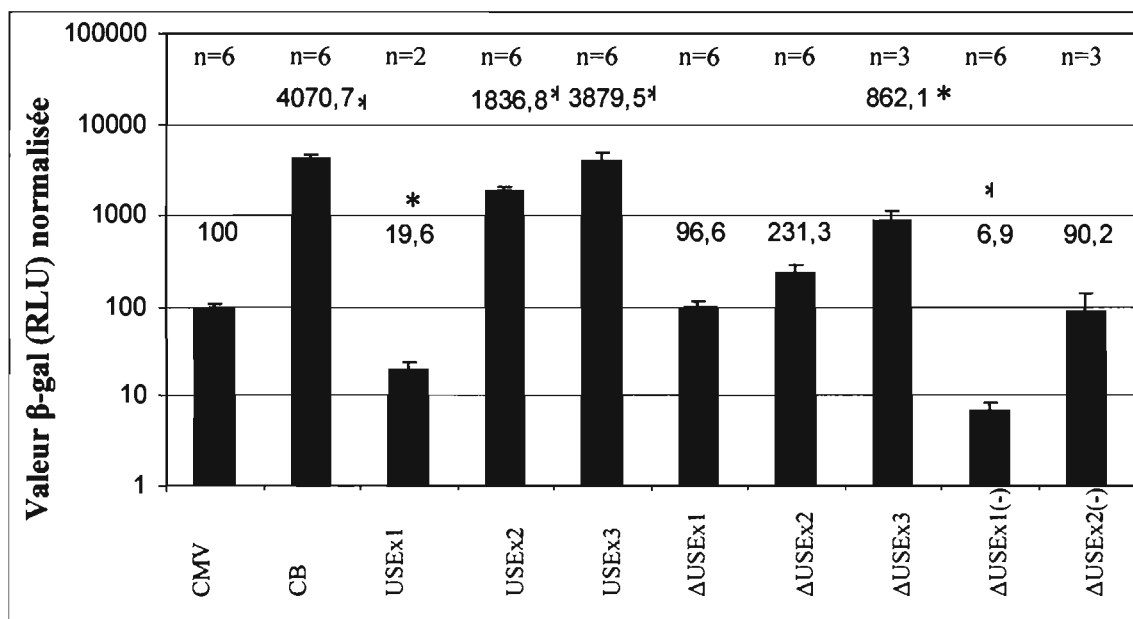


Figure 17 : Comparaison de l'activité des promoteurs USEx2, USEx3, ΔUSEx2, ΔUSEx3 et ΔUSEx2(-) dans les cellules C2C12 myotubes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im) β , pCBLacZ, pTnIS(Im) β , pTnIS(Im) β -USEx2, pTnIS(Im) β -USEx3, pTnIS(Im) β -ΔUSEx1, pTnIS(Im) β -ΔUSEx2, pTnIS(Im) β -ΔUSEx3, pTnIS(Im) β -ΔUSEx1(-) et pTnIS(Im) β -ΔUSEx2(-). Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Vingt-quatre heures suivant la transfection, le milieu de culture a été remplacé afin d'induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été récoltées onze jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Suite à l'obtention de ces résultats, il a été décidé de poursuivre la multimérisation de l'activateur ΔUSE par l'ajout d'un quatrième ΔUSE. Nous voulions, par cet ajout, déterminer si l'activité du promoteur TnIS allait atteindre un plafond. Parallèlement, nous avons développé un plasmide TnIF(+) dont l'orientation des activateurs IRE est naturelle. Nous souhaitons vérifier si l'orientation des activateurs IRE influençait l'activité du promoteur TnIF tel que nous l'observons chez l'activateur ΔUSE. Aux figures 16 et 17, il a été démontré que l'orientation inverse des activateurs ΔUSE influence négativement l'activité des promoteurs dans les cellules C2C12 myotubes.

Tel que mentionné précédemment, nous voulions déterminer l'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les cellules musculaires et non musculaires. Pour ce faire, nous avons transfecté des cellules 293A et des cellules C2C12

myoblastes. Nous avons induit la différenciation en myotubes pendant 10 jours dans 50% des transfections effectuées chez les myoblastes.

À la figure 18, nous pouvons constater que l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx3, ΔUSEx3 et ΔUSEx4 est respectivement 55 fois, 13 fois et 54 fois plus élevée que celle du CMV dans les cellules C2C12 myotubes. Il est intéressant de noter que l'activité des promoteurs USEx3 et ΔUSEx4 n'est pas statistiquement différente à celle du promoteur CB dans les myotubes. On remarque aussi que l'activité du promoteur TnIF(+) ne diffère pas de celle du CMV. L'orientation naturelle des IRE semble avoir un effet positif sur l'activité de promoteur.

Bien que les données ne soient pas présentées, l'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les cellules non musculaires 293A correspondait à environ 0,3% à 0,5% de celle du CMV. L'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les C2C12 non différenciés correspondait en moyenne à environ 5% de celle du CMV (variant de 0,9% (TnIF(+)) à 10% (USEx3)).

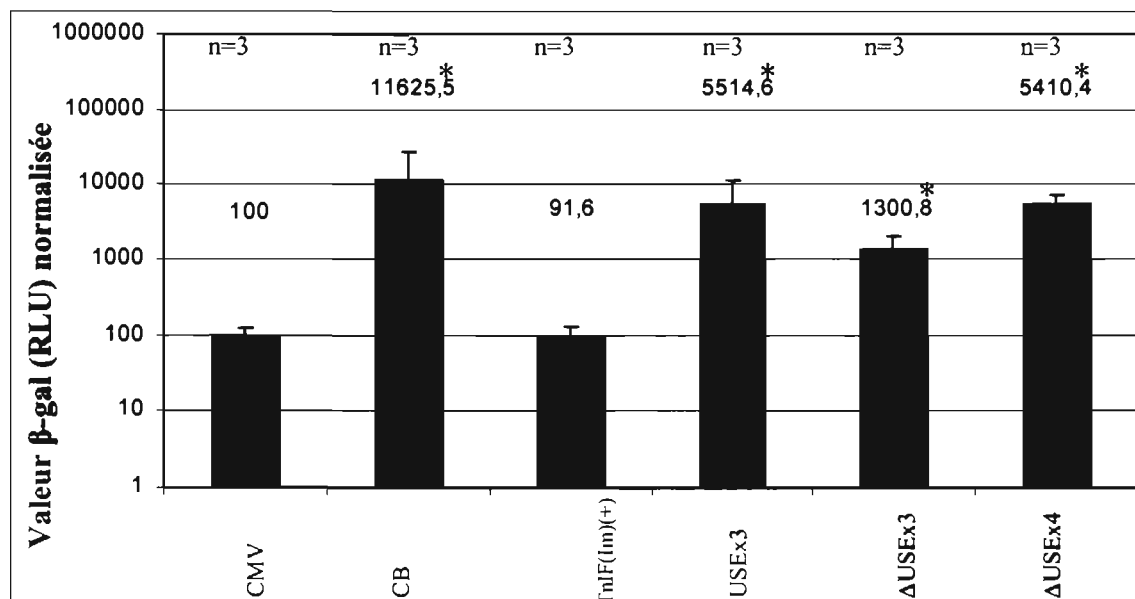


Figure 18 : Comparaison de l'activité des promoteurs USEx3, ΔUSEx3, ΔUSEx4 et TnIF(+) dans les cellules C2C12 myotubes

8x10⁴ cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec 1 μg du plasmide pCMV(Im)β, pCBLacZ, pTnIF(Im)(+), pTnIS(Im)β-USEx3, pTnIS(Im)β-ΔUSEx3 ou pTnIS(Im)β-ΔUSEx4. Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Vingt-quatre heures suivant la transfection, le milieu de culture a été remplacé afin d'induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été récoltées onze jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Afin de confirmer les résultats obtenus à l'aide des valeurs de β -gal normalisée issues de transfections cellulaires, nous avons transfecté des cellules non musculaires 293A et des cellules C2C12 myoblastes dont nous avons induit la différenciation en myotubes sur une période de 10 jours dans 50% des transfections. Quarante-huit heures (293A ou C2C12 myoblastes) ou 10 jours (C2C12 myotubes) suivant la transfection, les cellules transfectées ont été colorées pour la β -gal et des photographies ont été prises. Les cellules positives pour la β -gal sont colorées en bleu. La figure 19b, nous permet d'observer la supériorité de l'activité du promoteur CB telle que nous pouvons l'observer à la figure 18. De plus, nous pouvons observer une intensité similaire entre la coloration des promoteurs CB et l'activateur/promoteur USEx3 (figures 19b et 19c). Nous pouvons aussi observé que l'activité du promoteur Δ USEx3 tout en étant plus forte que l'activité du promoteur CMV, est plus faible que celle du promoteur CB (figures 19a, 19b et 19d). Bien que les photographies prises à la suite de la coloration des transfections transitoires des cultures de cellules 293A et C2C12 myoblastes ne soient pas présentées, elles permettraient elles aussi de confirmer les données obtenues par les mesures de la β -gal.

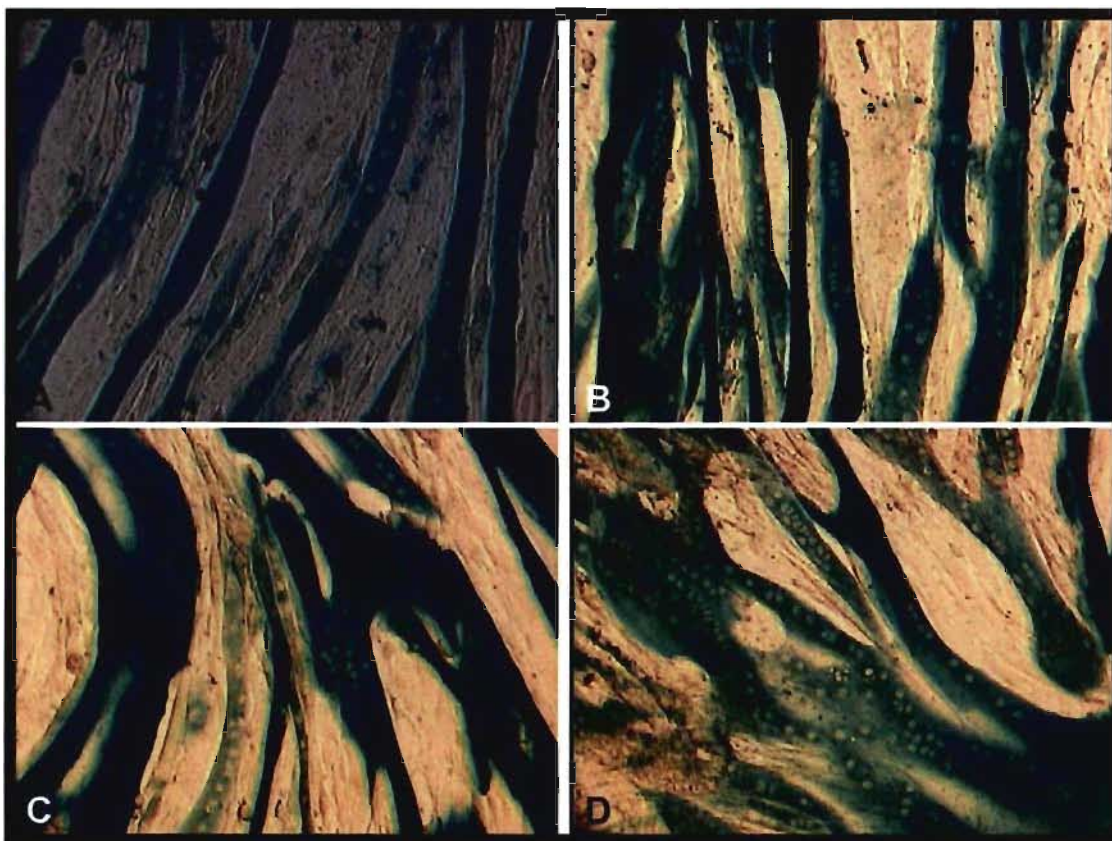


Figure 19 : Distribution de la β -gal dans les cultures de cellules C2C12 myotubes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im) β (A), pCBLacZ (B), pTnIS(Im) β -USEx3 (C) ou pTnIS(Im) β - Δ USEx3 (D). Vingt-quatre heures suivant la transfection, le milieu de culture a été changé pour induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été colorées pour la β -gal onze jours post-transfection. Les myotubes positifs pour la β -gal sont colorés en bleu.

Après avoir établi que l'ajout d'un quatrième activateur Δ USE n'affectait pas négativement l'activité du promoteur TnIS, nous avons décidé d'ajouter un quatrième puis, un cinquième activateur USE. Nous voulions déterminer si un effet plafond allait être observé. Une fois de plus, les transfections transitoires ont été effectuées sur les cellules non musculaires (293A) et musculaires (C2C12 myoblastes et C2C12 myotubes).

Sur la figure 20, on remarque que l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx4 est significativement plus élevée de 1,8 fois que celle du CMV dans les cellules C2C12 myotubes. L'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx3, USEx5 et Δ USEx4 n'est pas statistiquement différente de celle du CMV.

Lors de cette expérience, on constate que la valeur relative du CMV est beaucoup plus élevée que lors des essais précédents. Cette expérience a été répétée deux fois et nous avons obtenu des résultats comparables (voir section Discussion). Bien que les données ne soient pas présentées, l'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les cellules non musculaires 293A correspondait à environ 0,2% à 0,4% de celle du CMV. L'activité des promoteurs muscles spécifiques dans les C2C12 non différenciés correspondait à environ 0,5% à 1% de l'activité du CMV.

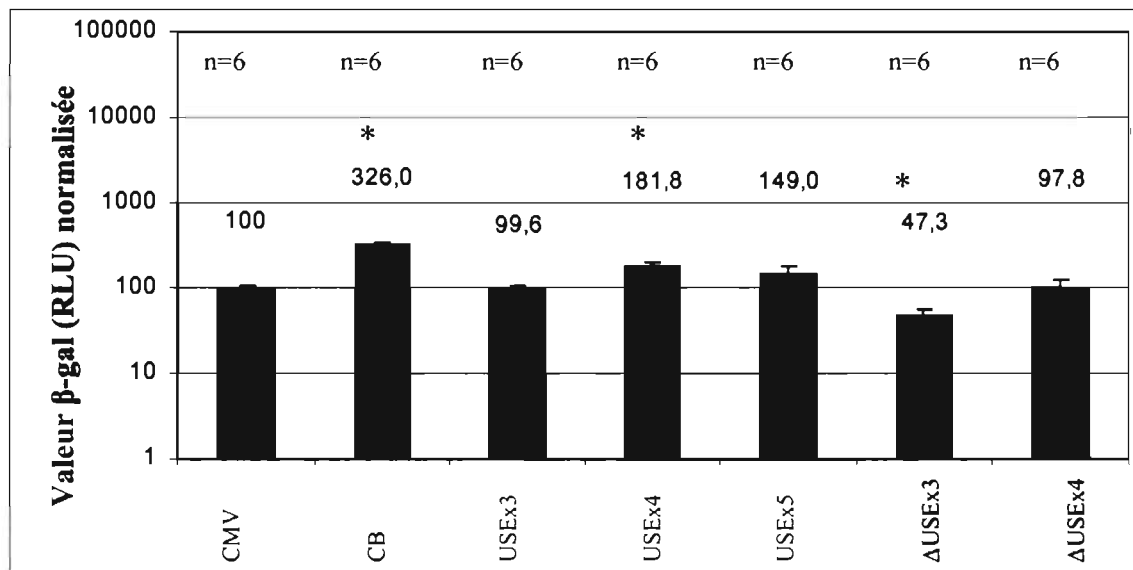


Figure 20 : Comparaison de l'activité des promoteurs USEx3, USEx4, USEx5, Δ USEx3 et Δ USEx4 dans les cellules C2C12 myotubes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im) β , pCBLacZ, pTnIS(Im) β -USEx3, pTnIS(Im) β -USEx4, pTnIS(Im) β -USEx5, pTnIS(Im) β - Δ USEx3 ou pTnIS(Im) β - Δ USEx4. Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Vingt-quatre heures suivant la transfection, le milieu de culture a été changé pour induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été récoltées onze jours post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Une fois de plus, nous voulions confirmer les résultats obtenus suite au dosage de la β -gal normalisée issue de transfections cellulaires. Nous avons transfecté des cellules C2C12 myoblastes dont nous avons induit la différenciation en myotubes durant 10 jours. Suite à cette différenciation, les cellules transfectées ont été colorées pour la β -gal et des photographies ont été prises. Les cellules positives pour la β -gal sont colorées en bleu.

La figure 21 nous permet d'observer une activité élevée du promoteur CB tout comme nous pouvons l'observer à la figure 20. De plus, nous remarquons une certaine similarité entre l'activité du promoteur CB et celle de l'activateur/promoteur USEx4 (figure 21d) et Δ USEx4 (figure 21f) à l'aide de la coloration des myotubes. On peut aussi observer que l'activité des activateurs/promoteurs USEx3 et USEx5 est semblable à celle du CMV.

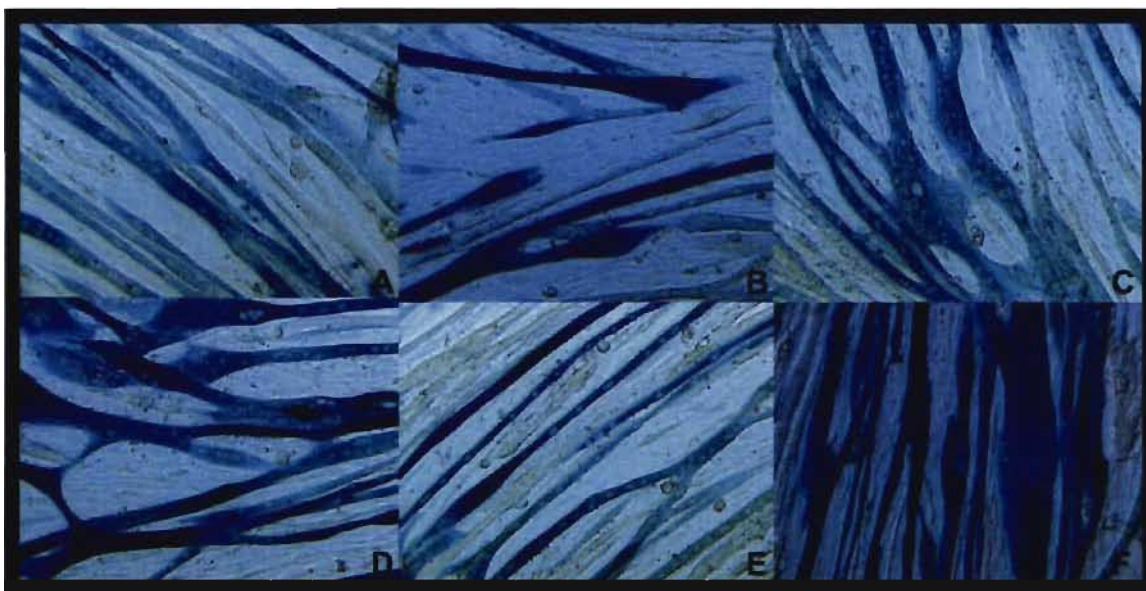


Figure 21 : Distribution de la β -gal dans les cultures de cellules C2C12 myotubes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im) β (A), pCBLacZ (B), pTnIS(Im) β -USEx3 (C), pTnIS(Im) β -USEx4 (D), pTnIS(Im) β -USEx5 (E) ou pTnIS(Im) β - Δ USEx4 (F). Vingt-quatre heures suivant la transfection, le milieu de culture a été changé pour induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été colorées pour la β -gal onze jours post-transfection. Les myotubes positifs pour la β -gal sont colorés en bleu.

Grâce aux nombreuses transfections cellulaires, nous pouvons affirmer que nous avons développé des promoteurs muscles spécifiques puissants en cultures cellulaires dans les cellules C2C12 myotubes.

3.1.5 Puissance des promoteurs muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 dans des cultures de cellules non musculaires

Bien que nous ayons établi que l'activité des divers promoteurs muscles spécifiques est semblable au contrôle négatif dans les cellules non musculaires 293A, nous voulions confirmer la spécificité de ces promoteurs pour les cellules musculaires à l'aide de transfections transitoires effectuées sur d'autres types cellulaires non musculaires telles que les cellules HeLa S3 et les A549. Il est primordial que les promoteurs muscles spécifiques utilisés dans le cadre d'une éventuelle thérapie génique pour traiter la DMD soient inactifs dans les types cellulaires autres que les muscles. Afin de déterminer l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx1, USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules non musculaires autres que 293A, nous avons une fois de plus utilisé la méthode de transfection transitoire. Nous avons donc transfecté des cellules HeLa S3 et A549.

Nous pouvons constater à la figure 22 que l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx1, USEx3 et Δ USEx3 correspond à environ 0,6% de l'activité du CMV dans les cellules A549. Cette activité correspond à celle du contrôle négatif de la transfection.

Nous pouvons aussi remarquer que l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx1, USEx3 et Δ USEx3 correspond respectivement à environ 0,9%, 3% et 4 % de l'activité du CMV dans les cellules HeLa S3 (figure 23). Une fois de plus, cette activité correspond à la valeur du contrôle négatif de la transfection.

Les transfections transitoires effectuées dans les cellules non musculaires A549 et HeLa S3 nous permettent d'affirmer que les promoteurs muscles spécifiques USEx1, USEx3 et Δ USEx3 ne sont pas actifs dans de nombreux types cellulaires non musculaires.

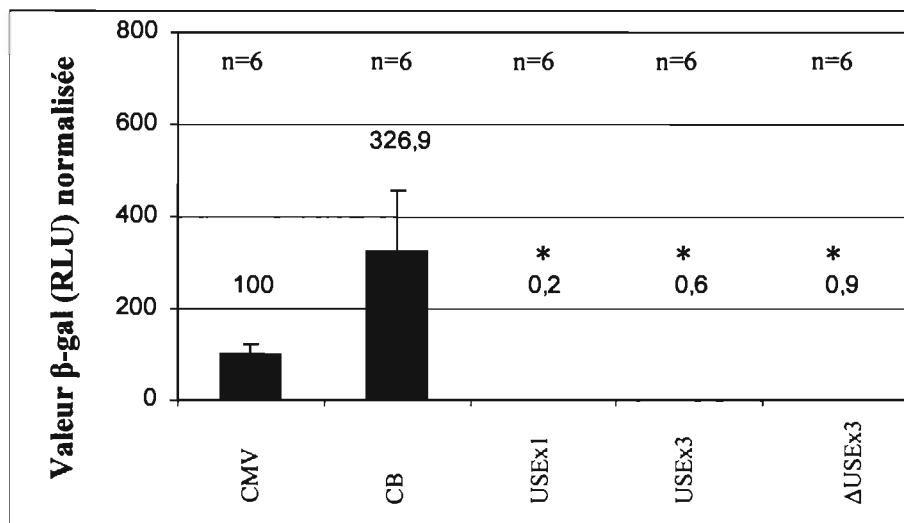


Figure 22 : Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx3 et ΔUSEx3 dans les cellules A549

$1,4 \times 10^5$ cellules A549 ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im) β , pCBLacZ, pTnIS(Im) β -USEx1 pTnIS(Im) β -USEx3 ou pTnIS(Im) β -ΔUSEx3. Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées quarante-huit heures post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

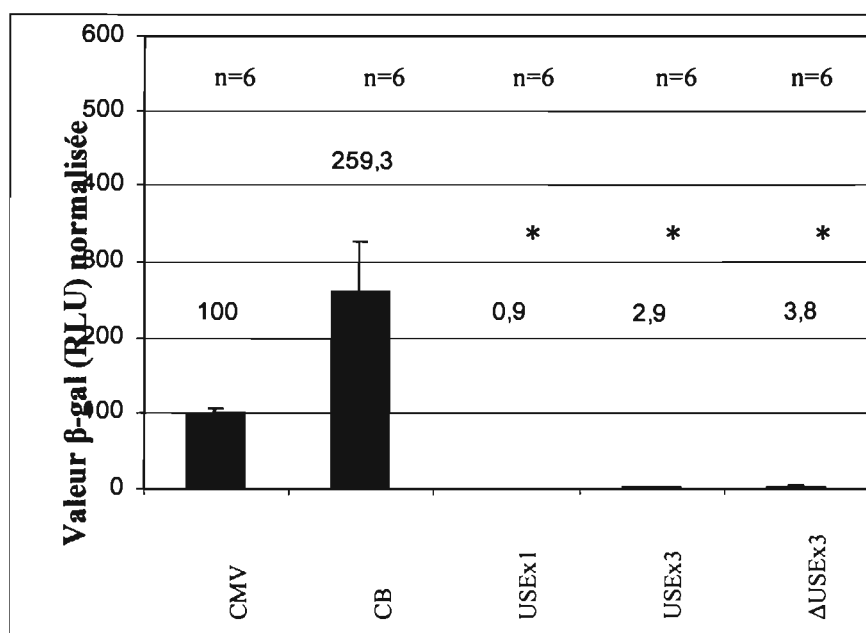


Figure 23 : Comparaison de l'activité des promoteurs USEx1, USEx3 et ΔUSEx3 dans les cellules HeLa S3

$1,4 \times 10^5$ cellules HeLa S3 ont été transfectées à la Lipofectamine 2000 avec $1 \mu\text{g}$ du plasmide pCMV(Im) β , pCBLacZ, pTnIS(Im) β -USEx1 pTnIS(Im) β -USEx3 ou pTnIS(Im) β -ΔUSEx3. Pour chacune des constructions, le nombre (n) de transfections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées quarante-huit heures post-transfection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CMV. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

3.2 Puissance des promoteurs muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 *in vivo*

3.2.1 Étude d'électroporation chez les souris CD1

Suite aux études *in vitro* réalisées sur les différents promoteurs muscles spécifiques, nous avons effectué des études d'électroporation chez les souris normales CD1. Nous avons décidé d'électroporer les muscles TA (droit et gauche) de souris adultes. Par cette expérience, nous souhaitons vérifier la force des promoteurs *in vivo* dans les muscles de souris. Pour ce faire, nous avons injecté les plasmides pCMV(Im) β , pCBLacZ, pTnIS(Im) β -USEx3 et pTnIS(Im) β - Δ USEx3 à une concentration de 1 μ g/ μ L dans le TA de souris CD1. Suite à cette injection, un courant électrique a été appliqué dans le but de permettre une transduction efficace des plasmides dans les muscles. Dix jours post-électroporation, les souris ont été euthanasiées et le TA entier a été prélevé et congelé dans de l'azote liquide. La β -gal a ensuite été extraite des sections cryogénéisées du TA et la teneur totale en protéines de chaque échantillon a été déterminée. La valeur de β -gal déterminée par luminométrie a été normalisée par la quantité de protéines (μ g/ μ L). Finalement, les valeurs sont normalisées une seconde fois pour une valeur arbitraire de 100 pour le CMV (figure 24a). Des sections de muscles injectés ont été colorées pour la β -gal afin de révéler le nombre de fibres transduites (fibres β -gal positives = fibres bleues) (figure 25). Ces fibres ont, par la suite, été dénombrées (figure 24b). L'électroporation a été effectuée à deux reprises. Lors de la première expérience, 3 souris (6 muscles injectés) ont été électroporées. La deuxième expérience a été réalisée sur 4 souris (8 muscles injectés). La figure 24 représente la moyenne de ces deux expériences.

Il n'y a aucune différence significative entre la quantité de β -gal produite suivant l'électrotransfert des 4 constructions examinées (CMV, CB, USEx3 et Δ USEx3). De plus, il n'y a aucune différence significative entre le nombre de fibres transduites suite à l'électroporation. De façon générale, l'efficacité de transduction était élevée puisqu'en moyenne, on dénombre de 150 à 200 fibres positives pour chacun des plasmides. On peut aussi observer que les promoteurs USEx3 et Δ USEx3

sont tous les deux actifs dans le TA, muscle constitué essentiellement de fibres rapides.

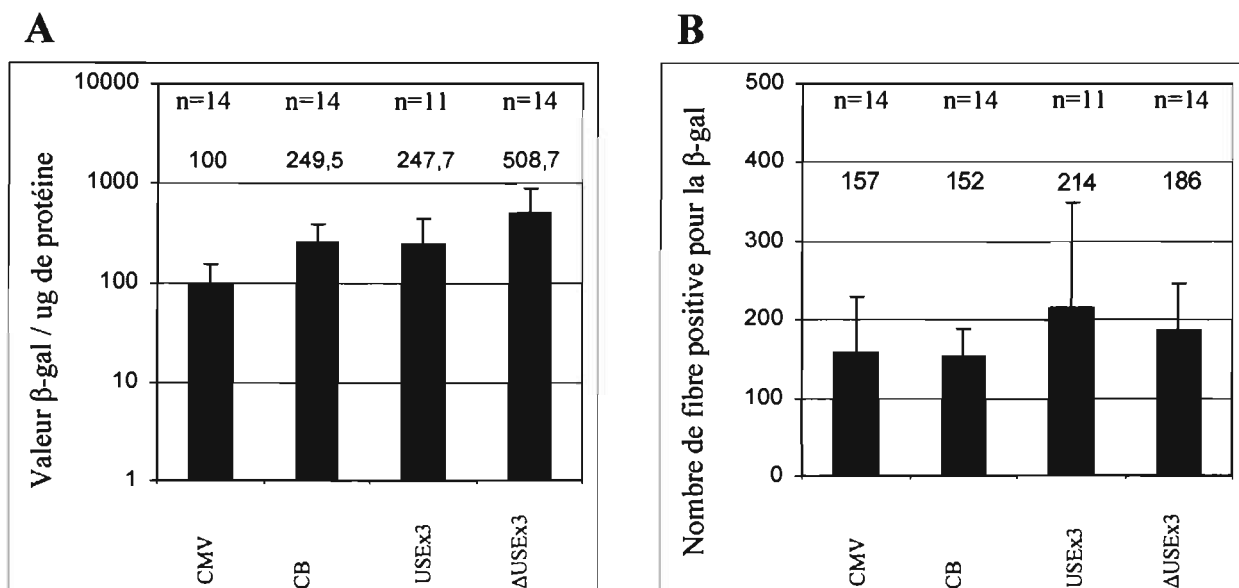


Figure 24 : Distribution de la β -gal suite à l'électroporation des plasmides USEx3 et Δ USEx3 dans les muscles de souris CD1

Les TA des souris CD1 ont été injectés avec les plasmides pCMV(Im) β , pCBLacZ, pTnIS(Im) β -USEx3 ou pTnIS(Im) β - Δ USEx3 suivi de l'application d'un courant électrique qui induit une transduction efficace du plasmide dans les muscles. Dix jours post-électroporation, les souris sont euthanasiées. Le TA est retiré et des sections sont analysées par luminométrie pour la quantité relative en β -gal ainsi que pour la teneur totale en protéines (A). Le nombre de fibres positives à la β -gal pour chacun des plasmides a aussi été analysé (B). Les barres d'erreurs sont les ES(M).

À la figure 25, on peut voir la coloration des sections des muscles du TA suite à l'électroporation. Cette coloration permet de révéler les fibres β -gal positives. On constate que les plasmides USEx3 et Δ USEx3 induisent une expression élevée du gène rapporteur dans le TA des souris CD1. On remarque aussi une infiltration de monocytes et/ou macrophages suite à l'électroporation de chacun des plasmides (figure 25, voir symbole flèche).

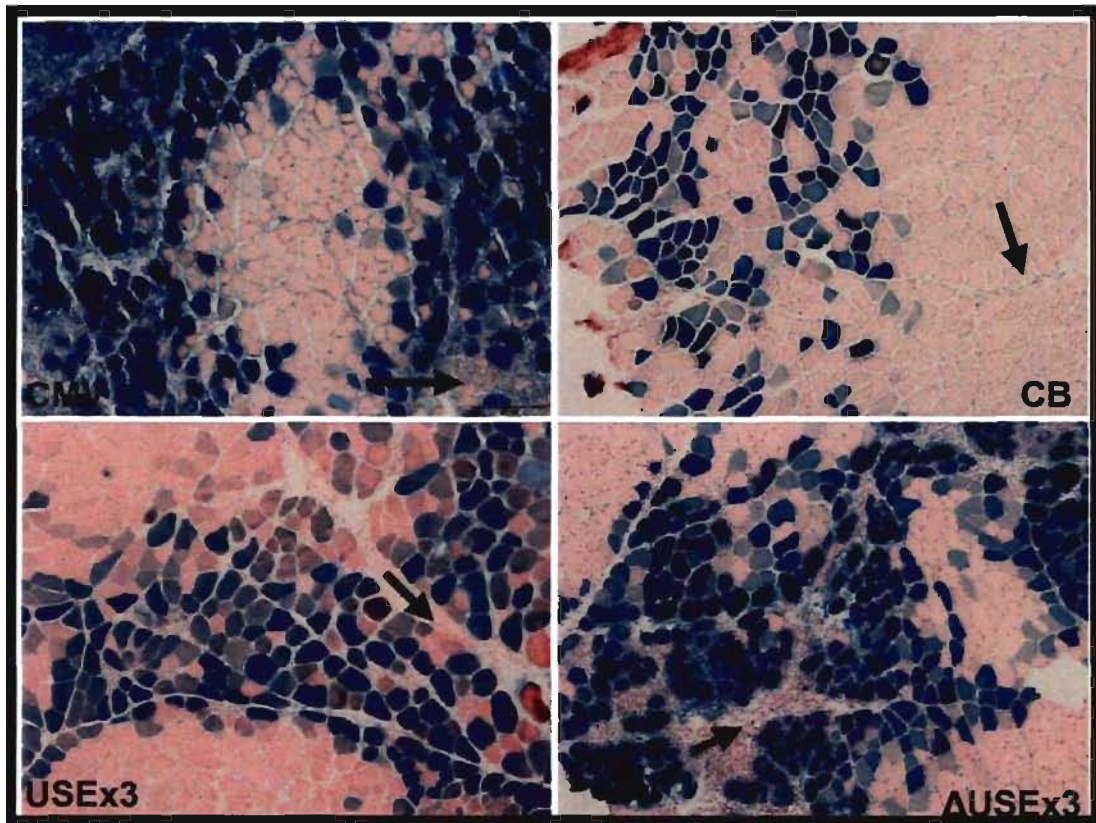


Figure 25 : Distribution de la β -gal dans le muscle TA de souris CD1

Les TA de souris CD1 ont été injectés avec les plasmides pCMV(Im) β , pCBLacZ, pTnIS(Im) β -USEx3 ou pTnIS(Im) β -AUEx3 suivi de l'application d'un courant électrique permettant ainsi une transduction efficace du plasmide dans les muscles. Dix jours post-électroporation, les souris sont euthanasiées, le muscle TA est retiré et des sections ont été colorées pour révéler la β -gal. Les flèches indiquent une infiltration de monocytes et/ou macrophages. Barre = 200 μ m.

Suite aux études *in vivo* chez la souris CD1, nous pouvons conclure que les promoteurs muscles spécifiques développés sont actifs *in vivo* et que leur activité est semblable à celle des promoteurs CB et CMV.

3.3 Puissance des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3

3.3.1 Étude de l'activité des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 *in vitro*

Suite à la détermination de l'activité *in vitro*, des différents promoteurs muscles spécifiques et des études de transduction *in vivo*, nous avons pu établir que les promoteurs développés sont puissants dans les cultures cellulaires de C2C12 myotubes et qu'ils sont actifs lors d'études *in vivo*. Finalement, nous avons pu déterminer que les promoteurs développés ne sont pas actifs dans les cellules non musculaires. Le but ultime de ces travaux étant le développement de promoteurs muscles spécifiques puissants pour l'amélioration de la thérapie génique de la DMD, nous avons entamé la construction de vecteurs adénoviraux de troisième génération contenant les activateurs/promoteurs USEx3 et Δ USEx3. Il s'agissait des meilleurs promoteurs que nous avons développés lorsque la construction des HDAd a débuté. Nous avons aussi choisi de construire un HDAd contrôle CBLacZ afin d'avoir une activité de référence. Ce promoteur a déjà démontré une activité très puissante dans les muscles lors d'étude *in vivo* (218). Les HDAd développés ont tous la même structure, telle que présentée à la figure 26.



Figure 26 : Structure générale des HDAd développés

Suite à l'amplification et à la purification des HDAd CBLacZ, USEx3 et Δ USEx3, nous avons déterminé le nombre de particules virales totales ainsi que le nombre de particules infectieuses pour l'HDAd CBLacZ. Le pourcentage de contamination par le virus auxiliaire a aussi été déterminé. Ce pourcentage est important puisqu'il a été démontré que sa présence peut affecter l'activité du HDAd dans les muscles murins (219). Puisque le virus auxiliaire utilisé lors de l'amplification des HDAd (figure 6) exprime le gène rapporteur de la DsRed, le niveau de contamination pouvait facilement être analysé par cytométrie de flux. Le

pourcentage de contamination est déterminé par le rapport entre le pourcentage de particules infectieuses de virus auxiliaire et le nombre de particules totales virales.

On peut voir dans le tableau I que les trois HDAd possèdent un titre semblable en particules totales. Le titre infectieux des HDAd ne peuvent être comparés puisque ce dernier ne peut être déterminé chez les HDAd muscles spécifiques en raison de leur spécificité pour les cellules musculaires. On note aussi que le pourcentage de contamination par le virus auxiliaire est très semblable dans les HDAd muscles spécifiques. Ce pourcentage est 240 fois plus élevé dans le HDAd CBLacZ. Malgré tout, il est relativement faible soit 1,2%.

HDAd	Titre particules totales	Titre particules infectieuses	% contamination
CBLacZ-ITR	$1,4 \times 10^{12}$	$1,6 \times 10^{11}$	1,2 %
USEx3	$1,3 \times 10^{12}$		0,04 %
Δ USEx3	$1,5 \times 10^{12}$		0,06 %

Tableau I : Comparaison des titres en particules totales ainsi que du pourcentage de contamination du virus auxiliaire chez les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 et Δ USEx3

Le titre en particules totales a été déterminé suite à la mesure de l'absorbance à 260nm au spectrophotomètre. Le titre en particules infectieuses a été déterminé suite au dénombrement de cellules positives pour la β -gal 48 heures après l'infection. Le pourcentage de contamination est déterminé par le pourcentage de particules infectieuses de virus auxiliaire sur le nombre de particules totales.

Par la suite, nous voulions déterminer l'activité des HDAd dans les cellules non musculaires. Tout comme lors des transfections transitoires effectuées à l'aide des plasmides, nous devons nous assurer que les HDAd muscles spécifiques développés ne sont pas actifs dans les cellules non musculaires. Nous avons d'abord testé les HDAd dans des cultures de cellules A549 et HeLa S3. Pour ce faire, nous avons infecté des cellules A549 et HeLa S3 avec les HDAd CBLacZ, USEx3 et Δ USEx3 à une MOI de 5 000. Quarante-huit heures post-infection, la β -gal a été extraite des cellules et la teneur totale en protéines de chaque échantillon a été déterminée. La valeur de β -gal déterminée par luminométrie a été normalisée par la quantité de protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) du même échantillon. Les valeurs sont ensuite normalisées pour une valeur arbitraire de 1 000 pour l'HDAd CBLacZ.

Comme nous pouvons le constater à la figure 27, l'activité des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules non musculaires A549 est faible. Leur activité correspond à environ 0,2% de l'activité de l'HDAd CBLacZ, ce qui n'est pas statistiquement différent de la valeur du contrôle négatif. Ensuite, on peut voir à la figure 28 que l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules HeLa S3 est toute aussi faible que dans les cellules A549. Celle-ci correspond à environ 0,05% de l'activité de l'HDAd CBLacZ. Cette activité est, encore une fois, significativement non différente à celle du contrôle négatif.

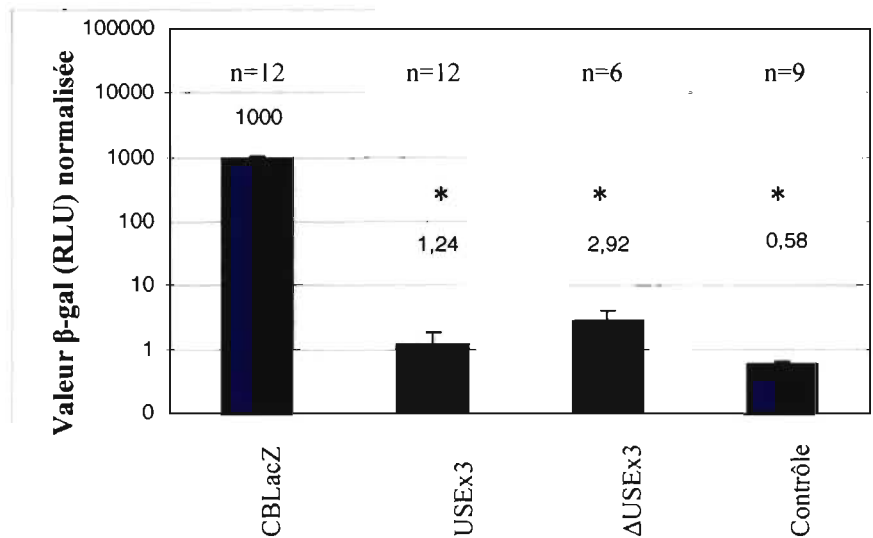


Figure 27 : Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules A549

$1,6 \times 10^5$ cellules A549 ont été infectées avec les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 ou Δ USEx3 avec une MOI de 5 000. Pour chacun des HDAd, le nombre (n) d'infections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées quarante-huit heures post-infection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CBLacZ. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

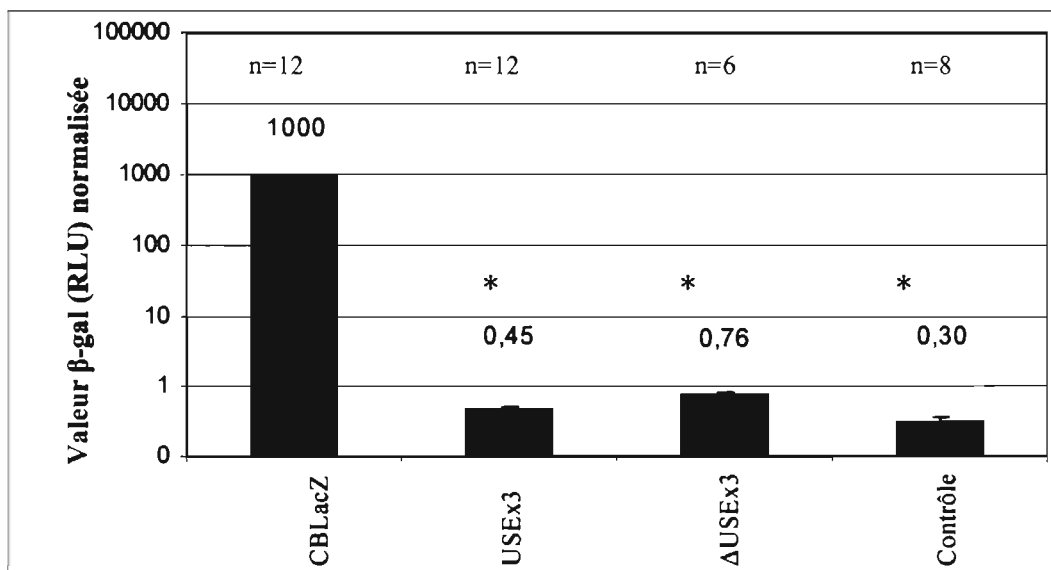


Figure 28 : Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules HeLa S3
 $1,6 \times 10^5$ cellules HeLa S3 ont été infectées avec les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 ou Δ USEx3 avec une MOI de 5 000. Pour chacun des HDAd, le nombre (n) d'infections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées quarante-huit heures post-infection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CBLacZ. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Grâce à ces études, nous pouvons affirmer que l'activité des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 est très faible, voire nulle dans les cellules non musculaires A549 et HeLa S3.

Suite à la détermination de l'activité des HDAd muscles spécifiques dans les cellules non musculaires, nous avons voulu déterminer cette dernière dans les cellules musculaires. Nous avons testé les HDAd dans des cultures de cellules C2C12 myoblastes et cellules C2C12 myotubes. Cette expérience nous permettra de nous assurer que les HDAd muscles spécifiques sont actifs dans les cellules musculaires. Afin d'y parvenir, nous avons infecté des cellules C2C12 myoblastes avec les HDAd CBLacZ, USEx3 et Δ USEx3 à une MOI de 5 000. Vingt-quatre heures post-infection, 50% des cellules ont été mises en présence du milieu de différenciation. Quarante-huit heures (C2C12 myoblastes) ou dix jours (C2C12 myotubes) post-infection, la β -gal a été extraite des cellules et la teneur totale en protéines de chaque échantillon a été déterminée. Encore une fois, la valeur de β -gal déterminée par luminométrie a été normalisée par la quantité de protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) du

même échantillon. Les valeurs sont normalisées, une seconde fois, pour une valeur arbitraire de 1 000 pour l'HDAd CBLacZ.

On observe à la figure 29 que l'activité des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules musculaires C2C12 myoblastes est faible. Celle-ci correspond respectivement à 1,5% et 0,3% de l'activité de l'HDAd CBLacZ. De plus, on peut remarquer que l'activité de l'HDAd USEx3 est significativement différente du Δ USEx3. On note aussi que l'activité de l'HDAd Δ USEx3 n'est pas statistiquement différente du contrôle négatif. Ces résultats sont congruents avec ceux obtenus lors des études *in vitro* de transfections dans les C2C12 myoblastes (l'activité moyenne des promoteurs en transfections transitoires est de 0,9% et 0,4% de l'activité du promoteur CB pour le plasmide USEx3 et Δ USEx3 respectivement).

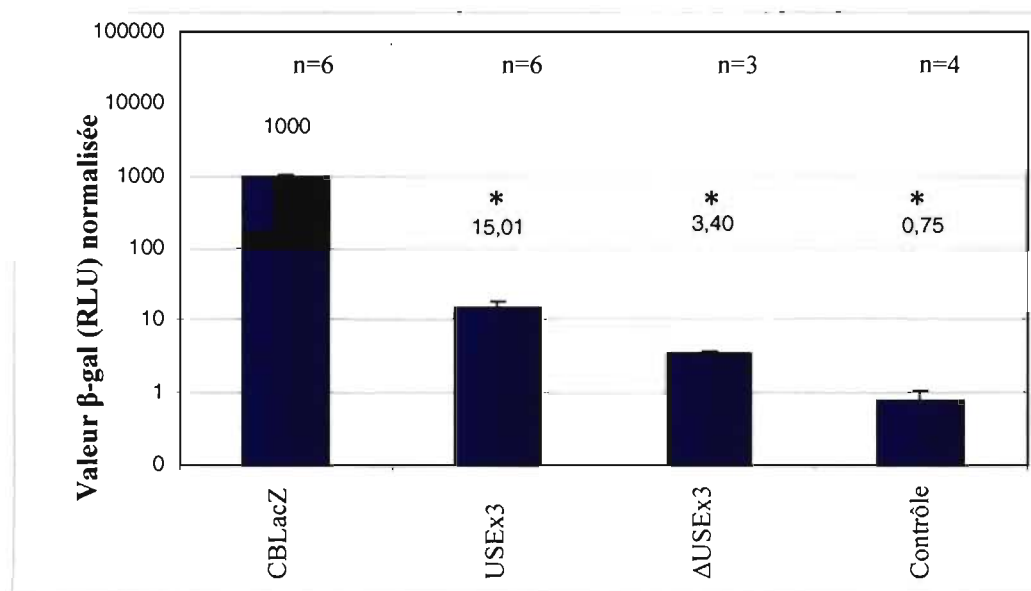


Figure 29 : Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules C2C12 myoblastes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été infectées avec les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 ou Δ USEx3 avec une MOI de 5 000. Pour chacun des HDAd, le nombre (n) d'infections analysées est indiqué. Les cellules ont été récoltées quarante-huit heures post-infection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CBLacZ. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

Par la suite, on remarque à la figure 30 que l'activité des HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules musculaires C2C12 myotubes est faible. Celle-ci correspond à environ à 1,3% de l'activité de l'HDAd CBLacZ. L'activité des HDAd muscles spécifiques n'est pas statistiquement différente. De

plus, bien que l'activité de ces promoteurs soit faible dans les C2C12 myotubes, elle est significativement supérieure au contrôle négatif.

Constatant ces résultats, nous avons infecté des cellules C2C12 myoblastes avec les HDAd CBLacZ, USEx3 et Δ USEx3. Vingt-quatre heures post-infection, nous avons induit la différenciation des myoblastes en myotubes durant une période de 10 jours. Suite à cette différenciation, les cellules infectées ont été colorées pour révéler l'activité de la β -gal et des photographies ont été prises. La figure 31 nous permet d'observer la supériorité de l'activité du promoteur CB tout comme nous pouvons l'observer à la figure 30. De plus, on constate que les fibres β -gal positives sont des cellules multinucléées. On remarque aussi que les HDAd muscles spécifiques ont, encore une fois, une activité faible. On peut voir que la coloration des fibres positives n'est pas aussi prononcée que celle de l'HDAd CBLacZ. De plus, proportionnellement parlant, il semble y avoir plus de cellules positives mononucléées que multinucléées lors de la coloration des C2C12 myotubes infectées par les HDAd USEx3 et Δ USEx3.

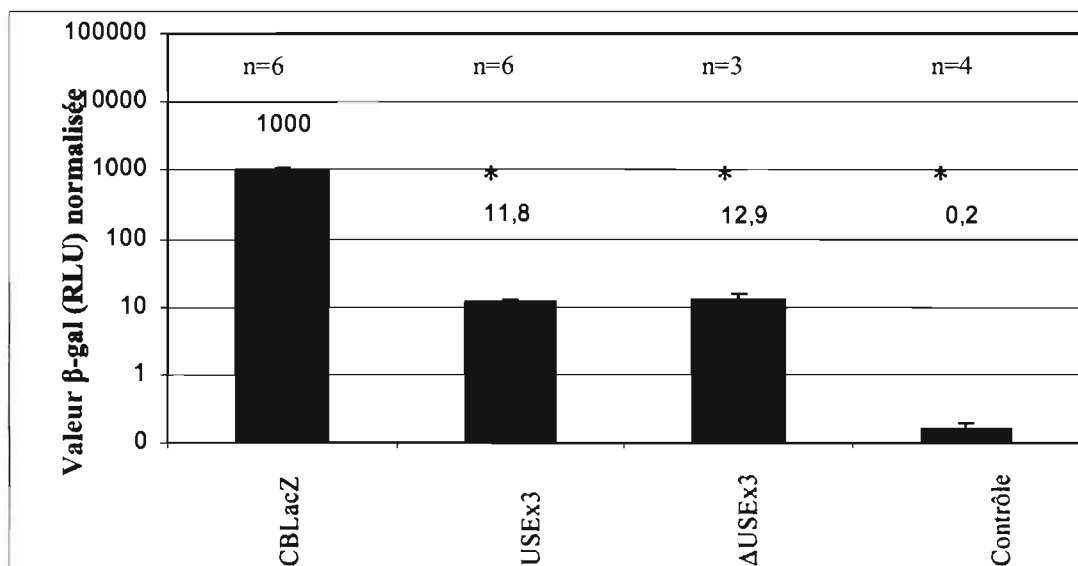


Figure 30 : Comparaison de l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules C2C12 myotubes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été infectées avec les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 ou Δ USEx3 avec une MOI de 5 000. Pour chacun des HDAd, le nombre (n) d'infections analysées est indiqué. Vingt-quatre heures suivant l'infection, le milieu de culture a été remplacé afin d'induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été récoltées onze jours post-infection et analysées par luminométrie. Les valeurs marquées du symbole * sont significativement différentes du CBLacZ. Les barres d'erreurs sont les ES(M).



Figure 31 : Distribution de la β -gal dans les cultures de cellules C2C12 myotubes

8×10^4 cellules C2C12 myoblastes ont été infectées avec les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 ou Δ USEx3 avec une MOI de 5 000. Vingt-quatre heures suivant l'infection, le milieu de culture a été changé pour induire la différenciation des cellules C2C12 myoblastes en cellules C2C12 myotubes. Les cellules ont été colorées pour la β -gal onze jours post-infection. Les myotubes positifs pour la β -gal sont colorés en bleu.

3.4 Puissance des HDAd *in vivo*

3.4.1 Étude de l'efficacité des HDAd chez les souris

Parallèlement aux études *in vitro* en cultures cellulaires des HDAd, nous avons décidé d'étudier l'efficacité des HDAd (HDCBLacZ et HDAd USEx3) *in vivo* dans les muscles de souris CD1. Pour y parvenir, nous avons injecté les HDAd à une concentration de $1,4 \times 10^{12}$ particules totales par μL (HDAd CBLacZ) et $1,3 \times 10^{12}$ particules totales par μL (HDAd USEx3) dans le TA des souris adultes et nouveau-nées. Seize jours post-infection, les souris ont été euthanasiées et le TA entier a été prélevé et congelé dans de l'azote liquide. La β -gal a ensuite été extraite des sections cryogénisées du TA et la teneur totale en protéines de chaque échantillon a été déterminée. La valeur de β -gal déterminée par luminométrie a été normalisée par la quantité de protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Ensuite, les valeurs sont normalisées pour une valeur arbitraire de 1 000 (nouveau-nées) ou 100 (adultes) pour l'HDAd CBLacZ (figures 32a et b). Les sections de muscles injectés ont été colorées pour la β -gal afin de révéler le nombre de fibres transduites (fibres β -gal positives). Suite à cette coloration, les fibres transduites ont été dénombrées.

On peut voir à la figure 32a que l'HDAd USEx3 est significativement plus faible que le contrôle HDAd CBLacZ chez les souris nouveau-nées. Bien que l'activité de l'HDAd USEx3 soit faible, celle-ci est significativement différente du contrôle négatif. Chez les souris CD1 adultes, il n'y avait aucune différence significative entre la quantité de β -gal produite par les HDAd CBLacZ et USEx3. L'activité des HDAd est statistiquement différente du contrôle négatif lors de cette expérience. Tout comme lors de l'étude d'électroporation, le nombre de fibres transduites suivant l'infection par les deux vecteurs adénoviraux a été examinée chez les souris nouveau-nées et chez les adultes. Chez les nouveau-nées, le nombre de fibres positives pour l'HDAd CBLacZ-ITR est de 592 ± 239 . Le nombre de fibres positives pour l'HDAd USEx3 est nul. Chez les souris adultes, le nombre de fibres positives pour l'HDAd CBLacZ-ITR et l'HDAd USEx3 est de 0.

Tel que mentionné précédemment, le TA des souris nouveau-nées a aussi été coloré pour la β -gal (figure 33). On peut distinguer les fibres transduites, positives

pour la β -gal (fibres bleues) des fibres non transduites (fibres roses). À la figure 33a, on peut voir les fibres transduites par l'HDAd CBLacZ et en 33b par l'HDAd USEx3. Les fibres provenant de l'injection contrôle sont similaires à la photographie 33b. On constate que ces photographies confirment les résultats obtenus lors du dosage enzymatique de la β -gal.

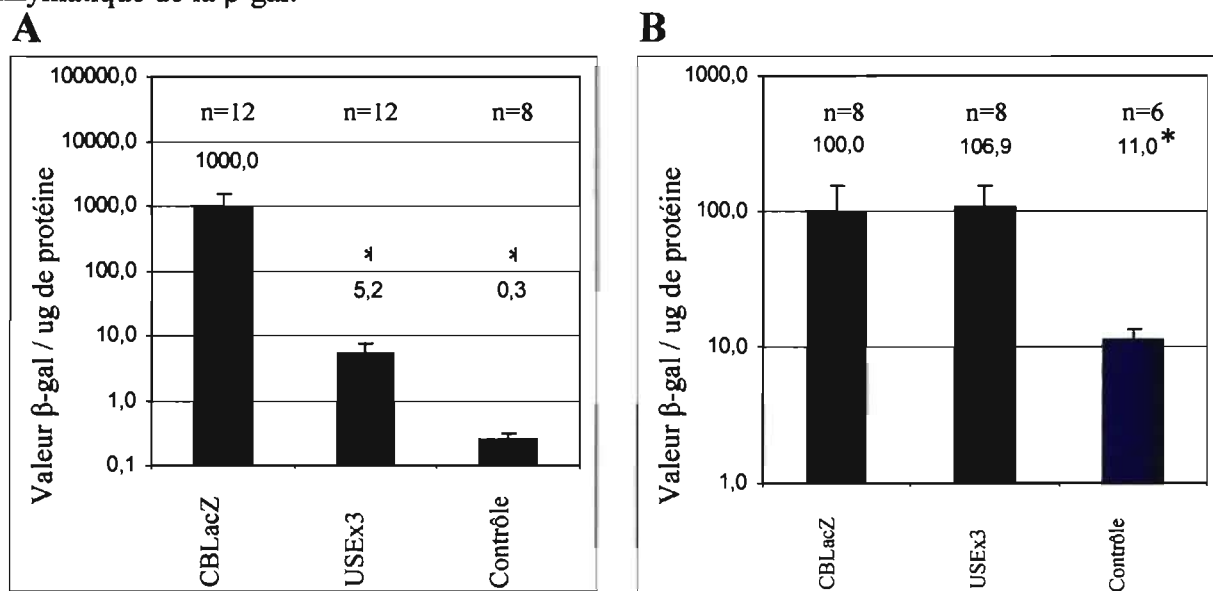


Figure 32 : Distribution de la β -gal suite à l'injection des HDAd CBLacZ et USEx3 dans les muscles TA des souris CD1

Les muscles TA de souris CD1 ont été infectés avec les HDAd CBLacZ-ITR, USEx3 ou tampon de congélation (contrôle). Pour chacun des HDAd, le nombre (n) de muscles analysés est indiqué. Seize jours post-infection, les souris nouveaux-nés (A) et les souris adultes (B) sont euthanasiées. Le muscle TA est retiré et des sections cryogénisées sont analysés par luminométrie pour la quantité relative en β -gal. Les barres d'erreurs sont les ES(M).

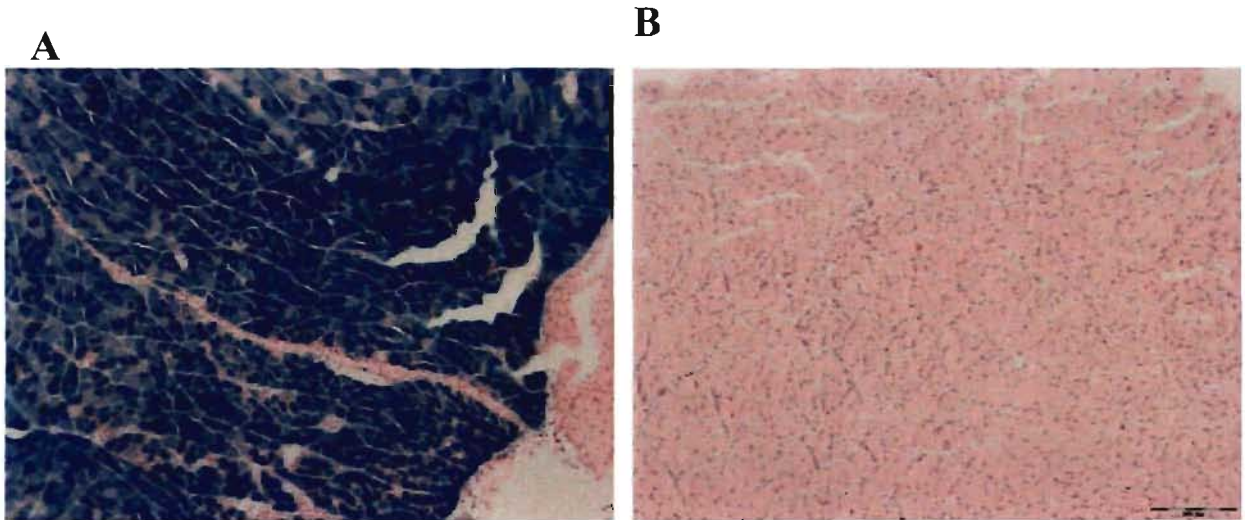


Figure 33 : Distribution de la β -gal dans le muscle TA de souris CD1

Les muscles TA de souris CD1 ont été infectés avec les HDAd CBLacZ (A) ou USEx3 (B). Seize jours post-infection, les souris nouveau-nées sont euthanasiées. Le muscle TA est retiré et des sections sont colorées pour révéler la β -gal. Barre = 200 μ m.

Les études *in vivo* effectuées à l'aide des HDAd nous permettent d'affirmer que l'HDAd CBLacZ est un vecteur puissant. De plus, on peut constater que l'HDAd USEx3 a une activité faible dans le muscle TA, celui-ci étant constitué majoritairement de fibres rapides.

**Section 4 :
Discussion**

L'objectif global de ce projet de maîtrise était de développer des promoteurs efficaces et muscles spécifiques pour la thérapie génique de la dystrophie musculaire de Duchenne.

Les diverses expériences effectuées au cours de cette maîtrise nous permettent d'affirmer que nous sommes parvenus à développer des promoteurs muscles spécifiques puissants grâce à la multimérisation de l'activateur en amont du gène TnIS, tel que démontré dans les phrases suivantes. L'efficacité ainsi que la puissance de ces promoteurs muscles spécifiques furent démontrés *in vitro* grâce à des expériences de transfections transitoires et des infections cellulaires ainsi qu'*in vivo* grâce à des expériences d'électroporations et d'infections chez la souris CD1. Nous avancerons des hypothèses afin d'expliquer la soudaine variation de l'activité du promoteur CMV en transfection transitoire. De plus, la puissance relative de nos promoteurs développés sera comparée à celle des promoteurs muscles spécifiques décrits dans la littérature actuelle. Finalement, nous émettrons des hypothèses pour expliquer la faible puissance des HDAd muscles spécifiques développés. Tout au long de cette discussion, les expériences en cours de manipulation ainsi que les futures expériences de validations seront décrites afin d'aider le lecteur dans sa réflexion quant à l'avenir de ce projet.

La majeure partie de ce travail a été consacrée à la construction de différents promoteurs muscles spécifiques dérivés des éléments génétiques du gène de l'isoforme lente de la troponine I. Pour ce faire, nous avons construit des plasmides contenant le promoteur minimal du gène de l'isoforme lente de la troponine I fusionné à une ou plusieurs copies de l'activateur du gène TnIS (USE). Des études ayant démontré une amélioration du niveau et de la stabilité de l'expression d'un gène *in vivo* grâce à la présence d'intron, nous avons décidé d'insérer après le site d'initiation de la transcription un petit intron de 100 pb dérivé du SV40 (211;212;229).

Tel que mentionné dans la section revue de littérature, trois hypothèses ont été avancées quant aux rôles des introns dans l'amélioration du niveau ou de la stabilité de l'expression d'un gène. Tout d'abord, il est avancé que certains introns pourraient contenir des activateurs ou d'autres éléments agissant en *cis* qui lieraient les

protéines, influençant ainsi l'initiation de la transcription et l'élongation. L'épissage de l'ARNm pourrait également augmenter la stabilité de l'ARNm dans le noyau, ce qui conduirait à une accumulation de plusieurs ARNm matures dans le cytoplasme. Il est aussi avancé que les introns contiennent des séquences qui faciliteraient l'ouverture des domaines chromosomiques, possiblement en affectant la composition, la position ou encore l'organisation (*higher-order packing*) du nucléosome.

Nous avons ensuite développé un activateur tronqué du gène TnIS (Δ USE) par PCR que nous avons, lui aussi, fusionné au promoteur minimal du gène TnIS lui-même lié à l'intron SV40. Nous avons ensuite testé la puissance de ces constructions par transfections transitoires en cultures cellulaires. Les diverses transfections effectuées nous ont permis de déterminer l'efficacité et la spécificité des diverses constructions pour les cellules musculaires.

Préalablement à la construction des divers plasmides muscles spécifiques, nous avons dû effectuer une modification dans l'intron SV40. L'intron original (Clontech Laboratories, Palo Alto, Ca.) contient un ATG pouvant initier la traduction, dans 10% à 20% du temps lorsque le site donneur 19S n'est pas complètement épissé (213). La séquence ATG de l'intron fut modifiée pour la séquence ATA par PCR (voir la section Matériel et méthode). Cette modification devrait prévenir la formation d'une protéine de fusion indésirable. Afin de s'assurer que cette modification n'entraînait aucune répercussion sur l'activité du promoteur, des transfections transitoires ont été effectuées en triplicata dans les cellules non musculaires 293A. Tel que démontré à la figure 12, la modification effectuée dans l'intron SV40 n'affecte pas significativement l'activité basale du promoteur CMV. Cet intron modifié a donc été inclus dans chacune de nos constructions afin d'augmenter et/ou de stabiliser l'expression du gène rapporteur *in vivo*.

Par la suite, nous avons testé la construction plasmidique USEx1 dans les cellules 293A et C2C12 myoblastes dont nous avons induit la différenciation en myotubes. Cette expérience permet de nous assurer que le promoteur muscle spécifique développé était actif seulement dans les cellules musculaires. Nous avons transfecté ces deux types cellulaires avec les plasmides codants pour le gène rapporteur de la β -gal sous le contrôle des promoteurs CMV, MCK, TnIF(-) et

USEx1. Nous avons inclus dans cette expérience le promoteur CMV, afin d'avoir une activité de référence. Il a été démontré, à l'aide de vecteurs adénoviraux de première génération, que le promoteur MCK confère une expression muscle spécifique *in vivo* (193;214). Puisqu'il a aussi été démontré que la fusion de trois copies des activateurs IRE du TnIF de caille confère une expression muscle spécifique *in vivo*, nous avons également inclus le promoteur TnIF(-) dans cette expérience (228). L'activité de ces deux promoteurs muscles spécifiques était notre activité de référence dans les cellules musculaires. Cette expérience nous a démontré que le promoteur muscle spécifique USEx1 est très faiblement actif dans les cellules non musculaires (figure 13). Nous avons aussi constaté que l'activité du promoteur USEx1 est semblable au promoteur TnIF(-) et qu'elle est équivalente à environ 40% de l'activité du promoteur ubiquitaire contrôle CMV dans les cellules musculaires C2C12 myotubes (figure 14). Tel que mentionné précédemment, le plasmide USEx1 ne contient qu'un activateur USE fusionné au promoteur minimal TnIS contrairement au plasmide TnIF(-) qui contient trois activateurs IRE fusionnés au promoteur minimal TnIF. Pourtant, l'activité de ces deux plasmides n'est pas statistiquement différente dans les cellules musculaires C2C12 myotubes. Nous avons donc décidé de multimériser l'activateur USE en émettant l'hypothèse que cette multimérisation affecterait positivement l'activité du promoteur dans les cellules musculaires. Parallèlement à la multimérisation des activateurs USE, nous avons décidé de développer un activateur tronqué Δ USE. L'activateur USE contient des domaines BLM et CAGG responsables de la restriction aux fibres musculaires lentes. Cette restriction est un désavantage considérable dans l'éventualité d'une utilisation pour la thérapie génique de la DMD. En effet, les muscles squelettiques, chez l'homme, sont constitués d'une combinaison de fibres à contractions lente et rapide. Par conséquent, si l'expression du gène thérapeutique est restreinte aux fibres musculaires lentes, le pourcentage de fibres musculaires exprimant le gène d'intérêt est diminué. Une thérapie génique efficace implique que le transgène soit exprimé à la fois dans les fibres de type lentes et rapides afin d'obtenir un maximum de fibres musculaires transduites.

La délétion des domaines BLM et CAGG permet de développer un activateur actif à la fois dans les fibres rapides et lentes puisque les domaines de restriction

musculaire CACC, Mef-2, E-box sont toujours présents dans l'activateur Δ USE (207). Comme l'activateur USE permettait une expression importante du gène rapporteur, nous avons émis l'hypothèse que l'activateur tronqué permettrait une activité toute aussi importante. Cet activateur tronqué a été inséré dans deux orientations possibles soit l'orientation naturelle (5'-3') ou inversée (3'-5'). Ces constructions allaient nous permettre de déterminer si l'orientation des activateurs avait un effet quelconque sur leur activité.

Afin de déterminer l'efficacité des différents promoteurs construits, nous avons transfecté nos constructions USEx2, Δ USEx1 et Δ USEx1(-) dans les C2C12 myoblastes et C2C12 myotubes. Nous avons, une fois encore, transfecté ces cellules avec les plasmides codants pour le gène rapporteur de la β -gal sous le contrôle des promoteurs CMV, MCK, TnIF(-) ainsi que des promoteurs d'intérêts. Cette expérience nous a démontré que tous les promoteurs muscles spécifiques développés étaient faiblement actifs dans les cellules musculaires non différenciées (figure 15). Dans les cultures de myotubes, nous constatons que l'activité du promoteur muscle spécifique USEx2 est environ 34 fois plus élevée que celle du CMV (figure 16). De plus, on remarque que l'activité du promoteur Δ USEx1 n'est pas statistiquement différente de celle du CMV. Ces deux promoteurs sont donc très puissants en comparaison avec les meilleurs promoteurs muscles spécifiques décrits dans la littérature (230-232). On peut aussi constater que l'orientation de l'activateur Δ USE affecte l'activité du promoteur TnIS. En effet, l'activité des plasmides Δ USEx1(-) et Δ USEx2(-) est significativement plus faible que celle des plasmides Δ USEx1 et Δ USEx2. Il est intéressant de mentionner que Salvo *et al*, ont observé des résultats différents *in vivo* en ce qui concerne l'effet de l'orientation des activateurs. En effet, suite à l'injection de deux vecteurs viraux AAV contenant le même promoteur et le même activateur du complexe de la chaîne lourde de l' α -myosine dans l'orientation naturelle ou inverse, aucune différence significative dans l'activité de ces promoteurs dans divers organes de la souris n'a été observée (233). De plus, aucune différence entre les deux AAV n'a été démontrée suite à la transduction des cultures de cellules musculaires MM14 (233).

Suite aux résultats obtenus avec les constructions USEx2 et Δ USEx2, nous avons décidé de poursuivre la multimérisation des activateurs Δ USE et USE afin de déterminer si nous pouvions augmenter l'activité de nos promoteurs. Nous avons aussi inclus dans nos plasmides contrôles, un plasmide contenant le promoteur hybride CB (figure 10). Des études ayant démontré que le promoteur ubiquitaire CB est plus puissant que le promoteur CMV (218), nous voulions comparer la puissance de nos promoteurs muscles spécifiques avec l'un des meilleurs promoteurs connus jusqu'à présent.

Nous avons, une fois de plus, transfecté des cultures de cellules C2C12 myoblastes, différenciées en myotubes, avec les plasmides codants pour le gène rapporteur de la β -gal sous le contrôle des promoteurs CMV, CB et des promoteurs d'intérêts. Ces diverses expériences démontrent que tous les promoteurs muscles spécifiques développés sont très peu actifs dans les cellules non musculaires. De plus, ils sont tous moyennement actifs dans les cellules musculaires non différenciées. Dans les cultures de cellules myotubes, nous constatons que l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx2 (18 fois), USEx3 (39 et 55 fois), Δ USEx2 (2,3 fois), Δ USEx3 (9 et 13 fois) et Δ USEx4 (54 fois) est supérieure à celle du CMV (figures 17 et 18). De plus, on remarque que l'activité du promoteur CB est plus puissante d'environ 40 et 116 fois comparativement à celle du CMV. Deux des promoteurs muscles spécifiques, USEx3 et Δ USEx4, ont une activité statistiquement non différente à celle du promoteur CB. Ces résultats montrent que certains des promoteurs muscles spécifiques que nous avons développés sont parmi les plus puissants en comparaison aux promoteurs décrits dans la littérature.

De plus, nous sommes parvenus à démontrer, encore une fois, que l'orientation des activateurs Δ USE a un effet non négligeable sur l'activité des promoteurs. En effet, on constate à la figure 17 que l'activité des plasmides Δ USEx1(-) et Δ USEx2(-) est significativement plus faible que celle de leurs homologues respectifs dont les activateurs sont dans l'orientation naturelle.

Nous avons, à la lumière de ces résultats, poursuivi la multimérisation dans le but d'augmenter une fois de plus la puissance de nos promoteurs. Nous avons procédé de nouveau à des transfections transitoires de cultures de cellules C2C12

myoblastes dont nous avons induit la différenciation en myotubes. Nous avons effectué une série de deux expériences au cours desquelles l'activité du promoteur CMV s'est révélée beaucoup plus importante que lors des expériences précédentes. On remarque à la figure 20 que l'activité du promoteur USEx4 est significativement plus élevée de 1,8 fois par rapport à celle du CMV. On constate aussi que l'activité des promoteurs muscles spécifiques USEx3, USEx5 et Δ USEx4 n'est pas statistiquement différente de celle du CMV. On remarque aussi que l'activité du promoteur CB est de 3 fois supérieure à celle du CMV comparativement à 40 fois et 116 fois lors des expériences précédentes. Ces observations indiquent que dans les dernières expériences, l'activité du promoteur CMV avait considérablement augmentée. Afin d'expliquer ce phénomène, plusieurs lots d'ADN des plasmides CB et CMV ont été préparés. Chacune de ces préparations a été dosée par spectrophotomètre afin de déterminer la concentration d'ADN contenue dans ces dernières. Le dosage de la concentration d'ADN a aussi été réalisé à l'aide d'un gel d'agarose. Ces diverses préparations ont ensuite été testées en parallèle par transfections transitoires dans les cellules 293A et dans les C2C12 myotubes. De nouvelles préparations du plasmide contenant la phosphatase alcaline ont aussi été réalisées. Les résultats de transfections transitoires de ces nouvelles préparations furent les mêmes que ceux obtenus lors des dernières expériences, soit une différence d'environ trois fois entre le CB et le CMV. En dépit de recherches pouvant expliquer les variations dans l'activité du promoteur CMV, nous ne sommes pas parvenus à identifier la source de cette soudaine augmentation.

Nos résultats concernant la puissance comparative du CMV et CB dans des cultures de cellules non-musculaires sont en accord avec l'équipe de Xu *et al* suite à des études de transfections en culture cellulaire (234). En 2001, cette équipe a démontré que le promoteur hybride CB (nommé CA dans l'expérimentation en question) était plusieurs fois supérieur dans des cellules Hela comparativement au promoteur CMV conventionnel (234).

Nous pouvons toutefois émettre quelques hypothèses sur les raisons probables de cette soudaine variation. Tout d'abord, nous pouvons constater suite à l'analyse des diverses figures, que l'activité relative des promoteurs suite aux transfections

transitoires effectuées dans les mêmes conditions, varie très peu dans les myotubes. Nous pouvons constater qu'à la figure 20, l'activité du promoteur CMV est beaucoup plus importante que lors des transfections précédentes, (Pour comparaison voir figure 18). Nous constatons également que l'activité relative des autres promoteurs muscles spécifiques et celle du promoteur CB demeurent relativement semblables. Par exemple, nous pouvons constater que l'activité du promoteur Δ USEx4 est toujours comparable à celle du promoteur USEx3 (figures 18 et 20). Nous ne sommes pas parvenus à expliquer cette soudaine augmentation de l'activité du promoteur CMV. Les préparations plasmidiques ont toutes été préparées de façon identique et chacune des concentrations obtenues par spectrophotomètre a ensuite été vérifiée sur un gel d'agarose. Cette soudaine augmentation de l'activité du promoteur CMV ne peut donc pas être la résultante d'une mauvaise préparation plasmidique. Nous ne croyons pas que les préparations d'ADN soient responsables de cette soudaine variabilité.

De plus, bien que les conditions de transfections soient toujours les mêmes, les lots de Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, Ca.) changent au cours des transfections. Puisque les changements de la composition de Lipofectamine 2000 ne sont pas communiqués au grand public, il est aussi possible qu'il se soit produit un changement dans la composition de la Lipofectamine 2000 qui affecterait l'activité du promoteur CMV ou les niveaux de différenciation des myotubes, ce qui pourrait affecter la force relative des différents promoteurs.

Malgré ces derniers résultats, nous pouvons affirmer que nous sommes parvenus à développer des promoteurs muscles spécifiques dont l'activité dans les cultures de myotubes est aussi ou plus puissante que le promoteur CMV. De plus, certains des promoteurs développés ont une activité aussi importante que le promoteur CB. Ceci suggère que les constructions que nous avons développées sont parmi les plus efficaces entre celles décrites dans la littérature. En effet, l'un des meilleurs éléments régulateurs muscles spécifiques décrits dans la littérature est la construction artificielle SpC5-12 composée d'environ 365 pb. Cette construction fut générée grâce à une fusion aléatoire de divers éléments régulateurs myogéniques. Dans les cultures de myotubes de volaille, cette construction est 6 fois plus puissante

que le CMV (232). Une seconde construction muscle spécifique puissante, dérivée du promoteur muscle spécifique squelettique de l' α -actine, a une activité comparable à celle du CMV dans les cellules musculaires en cultures (231). Plusieurs constructions muscles spécifiques ont été développées grâce à la combinaison d'activateur fusionné au promoteur minimal MCK. L'une des meilleures constructions, nommée CK6, a une activité correspondant à 8% du CMV dans les cultures musculaires (230). Une seconde construction, CK2, très semblable à notre construction MCK, possède une activité correspondant à 1,3% de l'activité du CMV. Cette activité est similaire à celle que nous avons obtenue suite à la transfection transitoire des cultures de cellules C2C12 (3,2%). Ce même groupe a, par la suite, développé deux constructions dérivées des activateurs et du promoteur minimal MCK ainsi que des gènes de la chaîne lourde de l' α -myosine (233). La première construction, nommée CK7, est dérivée de la construction CK1. Certaines modifications ont été effectuées sur CK1 dans le but d'améliorer son activité dans les fibres musculaires cardiaques (233). La seconde construction, MHCK7, est le résultat de l'ajout de l'activateur du complexe de la chaîne lourde de l' α -myosine à la construction CK7. Ces deux constructions, CK7 et MHCK7, ont une activité comparable aux promoteurs viraux CMV et RSV (virus sarcome rous ou Rous sarcoma virus) dans les cultures de cellules squelettiques MM14 (233). Il existe d'autres constructions muscles spécifiques créées suite à la combinaison du promoteur de l' α -actine squelettique et de l'activateur de la β -enolase ou de l'activateur MCK (235). Ces constructions sont respectivement 2 fois et 6 fois plus puissantes que les séquences terminales longues répétées (Long Terminal Repeat Sequence ou LTR) du RSV. D'autres constructions hybrides produites grâce à la fusion de l'activateur de la chaîne légère de myosine au promoteur MCK, au promoteur de la chaîne lourde de myosine ou au promoteur de la chaîne légère de myosine sont aussi actives que le promoteur précoce du SV40 dans les cultures de myotubes (236). Il faut noter que le promoteur contrôle LTR RSV et le promoteur précoce du SV40 sont tous deux plus faibles que le promoteur CMV dans les cultures de cellules musculaires (234;237). Bien qu'il soit préférable de comparer parallèlement l'activité de différents promoteurs sous les mêmes conditions de transfections, les données tirées de la littérature scientifique suggèrent fortement que

nous avons développé des promoteurs muscles spécifiques très efficaces. Cependant, pour en être définitivement certains, il faudrait tester les divers promoteurs muscles spécifiques simultanément sous les mêmes conditions.

Toutes les constructions dérivant du TnIS, testées lors de ce projet, sont considérées comme étant muscles spécifiques puisqu'elles sont toutes très actives dans les cultures de cellules C2C12 myotubes et très faiblement actives dans les cultures de cellules non musculaires 293A suite à une transfection transitoire (figure 13). L'activité des promoteurs muscles spécifiques n'a jamais dépassé 1% de l'activité du promoteur CMV dans les cellules non musculaires. Les promoteurs étaient aussi faiblement actifs dans les cellules musculaires non différenciées C2C12 myoblastes. Au plus fort de leur activité, ces promoteurs ne dépassaient guère 20% de celle du CMV. L'activité moyenne de ces promoteurs dans les myoblastes variait entre 5% à 9% de l'activité du CMV. Des études supplémentaires de transfusions transitoires sur des cultures de cellules non musculaires (A549 et HeLa S3) ont confirmé la spécificité musculaire des promoteurs USEx3 et Δ USEx3. En effet, l'activité de ces promoteurs dans les cellules non musculaires était respectivement d'environ 1% et 3% dans les cellules A549 et HeLa S3. Ces nombreux résultats indiquent que la multimérisation des activateurs USE ou Δ USE n'altère pas significativement la spécificité tissulaire.

Les divers activateurs/promoteurs USE et Δ USE pourront, dans un avenir prochain, être optimisés afin qu'ils puissent être utilisés lors de la construction de vecteurs viraux ayant une capacité d'encapsidation très limitée tel que les AAV. Bien que nous ne l'ayons pas indiqué sur la figure 9, il y a entre 100 et 150 pb entre chacun des activateurs USE ou Δ USE. L'ajout de ces paires de bases supplémentaires est le résultat de la stratégie de construction de ces plasmides. Théoriquement, ces paires de bases ne sont pas essentielles à la fonctionnalité des activateurs/promoteurs. Nous pourrions donc déléter ces paires de bases supplémentaires afin de diminuer la taille des activateurs/promoteurs pour ainsi permettre leur utilisation dans les vecteurs viraux ayant une capacité d'encapsidation limitée. Bien entendu, l'activité de ces plasmides délétés devra être comparée à celle des plasmides non délétés afin de déterminer si ces délétions affectent négativement l'activité de ces derniers.

Il a déjà été démontré qu'une copie de l'activateur USE confère une expression aux fibres lentes et qu'une copie de l'activateur Δ USE confère une expression dans les fibres lentes et rapides (207;210;217). Si cette propriété est préservée suite à la multimérisation, l'utilisation de constructions contenant plusieurs copies de l'activateur tronqué Δ USE sera un avantage précieux lors de la thérapie génique. En effet, elles permettront une expression dans toutes les fibres musculaires du corps indépendamment de leur type. Suite aux études d'électroporation chez les souris CD1, on remarque que l'activité des constructions USEx3 et Δ USEx3 est très forte dans le muscle TA (figure 24). Puisque le muscle TA est majoritairement constitué de fibres de type rapides, on peut affirmer que les constructions USEx3 et Δ USEx3 sont actives dans ce type de fibres. Bien que la construction USEx3 contient les régions de l'activateur conférant une expression restreinte aux fibres de type lentes, on peut voir à la figure 24, que celle-ci est fortement active dans les fibres rapides. Il est donc possible que la multimérisation de l'activateur ait modifié la spécificité relative aux types de fibres. Il est aussi possible que l'électroporation ne soit pas une méthode suffisamment sensible pour détecter une subtile variation dans l'activité *in vivo* des promoteurs. Cette hypothèse pourrait aussi expliquer la raison pour laquelle l'activité des quatre constructions testées *in vivo* (CMV, CB, USEx3 et Δ USEx3) par électroporation soit comparable malgré que les résultats moyens des transfections cellulaires démontraient une différence entre l'activité de certains d'entre elles. On constate aussi que l'électroporation est une méthode très dommageable. On peut voir à la figure 25, une infiltration de macrophages et/ou de monocytes suite à la coloration des fibres musculaires du TA après l'électroporation. On peut voir, suite à l'électroporation du CMV, que certains macrophages/monocytes sont positifs pour la β -gal. Cela signifie que certains d'entre eux ont incorporé le plasmide ou la β -gal. Puisqu'il est possible que l'électroporation ne soit pas une méthode assez sensible pour détecter la différence entre l'activité des promoteurs et qu'elle soit une méthode dommageable pour les fibres musculaires (183), nous avons décidé de tester ces constructions à l'aide de vecteurs viraux, les HDAd.

La seconde partie de ce travail a donc été consacrée à la construction de différents HDAd muscles spécifiques contenant des éléments génétiques du gène de l'isoforme lente de la Troponine I. Pour ce faire, nous avons construit des HDAd à

partir des activateurs/promoteurs USEx3 et Δ USEx3. Nous avons choisi ces deux activateurs/promoteurs puisque leur activité *in vitro* dans les cellules musculaires C2C12 myotubes était élevée et qu'ils étaient actifs *in vivo* dans les muscles de souris normales CD1. De plus, il s'agissait des meilleurs promoteurs que nous avons développés lorsque la construction des HDAd a débuté. Un HDAd contrôle CBLacZ a aussi été construit afin d'avoir une activité de référence lors des essais *in vitro* et *in vivo*. Il a déjà été démontré que le promoteur CB possède une activité très puissante dans les muscles suite à des études *in vivo* (218).

Suite à l'amplification et à la purification des HDAd, le nombre de particules virales totales ainsi que le pourcentage de contamination par le virus auxiliaire a été déterminé. Le nombre de particules infectieuses a aussi été déterminé suite à la purification de l'HDAd CBLacZ. Le pourcentage de contamination est important puisqu'il a été démontré que la présence du virus auxiliaire peut affecter positivement l'activité du HDAd dans les muscles murins (219). Afin de minimiser le pourcentage de contamination, nous avons choisi de travailler à l'aide de la recombinaison FLPe puisqu'il a jadis été établi que celle-ci était très efficace (161). On peut voir dans le tableau I que le pourcentage de contamination par le virus auxiliaire est relativement faible, moins de 1,2%, suite à la purification des trois HDAd. On constate toutefois que l'HDAd CBLacZ a un pourcentage de contamination plus élevé, d'environ 240 fois, comparativement aux HDAd muscles spécifiques. Bien que ce taux de contamination soit plus important que celui des HDAd muscles spécifiques, il ne devrait pas augmenter significativement la transduction des fibres musculaires *in vivo*, puisqu'il a été démontré qu'un taux de contamination en deçà de 5% n'affecte pas significativement le nombre de fibres transduites (219). Toutefois, cette forte différence entre les taux de contamination soulève des questions quant à l'activité des HDAd muscles spécifiques. En effet, ce taux de contamination pourrait être un repère interne quant au taux de particules viables de HDAd. Ainsi puisque le taux de contamination des HDAd muscles spécifiques est très faible, ceci pourrait refléter le fait que ces préparations d'HDAd soient plus faiblement actives.

Par la suite, nous avons testé les HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 dans les cellules A549, HeLa S3 et C2C12 afin de nous assurer que le

promoteur muscle spécifique développé était actif seulement dans les cellules musculaires. Pour ce faire, nous avons infecté ces divers types cellulaires avec les HDAd codants pour le gène rapporteur de la β -gal sous le contrôle des promoteurs CBLacZ, USEx3 et Δ USEx3. Tel que démontré à la figure 34, chacun des HDAd comporte une double cassette du gène rapporteur et de l'activateur/promoteur dans des directions opposées.

Il est à noter que les résultats obtenus lors de cette expérience soient difficilement interprétable en raison de l'inefficacité possible des HDAd muscles spécifiques. Toutefois, si l'on admet l'hypothèse selon laquelle les HDAd muscles spécifiques sont efficaces, cette expérience nous permet de démontrer que les HDAd muscles spécifiques USEx3 et Δ USEx3 sont très faiblement actifs dans les cellules non musculaires A549 et HeLa S3 (figures 27 et 28). Leur activité n'est pas statistiquement différente de la valeur du contrôle négatif suite à l'infection à une MOI de 5000 des deux types cellulaires. Des cellules non infectées constituent le contrôle négatif lors de cette expérience. Celle-ci nous démontre aussi que les HDAd muscles spécifiques développés sont faiblement actifs dans les cellules musculaires non différenciées (figure 29). Bien que l'activité des deux HDAd soit faible dans les myoblastes, l'HDAd USEx3 est significativement plus élevée que celle de l'HDAd Δ USEx3. L'activité de l'HDAd Δ USEx3 n'est pas statistiquement différente au contrôle négatif lors de cette expérience. Les résultats obtenus sont congruents avec ceux obtenus lors des études *in vitro* de transfections dans les C2C12 myoblastes. En effet, on constate que l'activité des HDAd USEx3 et Δ USEx3 correspond respectivement à 1,5% et 0,3% de celle de l'HDAd CBLacZ (figure 29) suite à l'infection des myoblastes. L'activité moyenne des activateurs/promoteurs USEx3 et Δ USEx3, suite à la transfection transitoire des C2C12 myoblastes, correspond respectivement à environ 0,9% et 0,4% de celle du plasmide CB.

Nous avons aussi observé que l'activité des HDAd muscles spécifiques dans les cellules musculaires C2C12 myotubes est très faible. Celle-ci correspond à environ à 1,3% de l'activité du HDAd CBLacZ. L'activité des HDAd muscles spécifiques, bien que faible, était toutefois significativement différente du contrôle négatif. Cette expérience effectuée en triplicata a été répétée à deux reprises. Nous

avons aussi coloré des myotubes suite à l'infection par les HDAd afin de visualiser les cellules infectées par ceux-ci. On remarque que les myotubes positifs pour la β -gal, suite à l'infection par l'HDAd CBLacZ, sont très abondants et qu'il s'agit de cellules multinucléées. De plus, on constate que la coloration des fibres, suite à l'infection par les HDAd muscles spécifiques, est d'une faible intensité. Il semble aussi y avoir une plus grande proportion de cellules mononucléées positives. Cette coloration confirme les résultats obtenus précédemment grâce au dosage du gène rapporteur, la β -gal. Toutefois, il est possible qu'une complication soit survenue lors de l'amplification ou de la purification des HDAd muscles spécifiques. Nous pouvons avancer cette hypothèse en raison du très faible taux de contamination par le virus auxiliaire de ces préparations. Malgré tout, nous pouvons avancer que les protocoles de construction, d'amplification et de purification ne semblent pas être responsables de cette faible activité des HDAd muscles spécifiques puisque l'HDAd contrôle, l'HDAd CBLacZ, a une activité très élevée dans tous les types cellulaires. De plus, la coloration des myotubes confirme bien l'efficacité de cet HDAd. Il est donc très probable que ces préparations virales contiennent un faible taux de particules infectieuses, ce qui expliquerait l'inefficacité des HDAd muscles spécifiques. Afin de vérifier l'exactitude de cette hypothèse, nous pourrions déterminer les titres infectieux des HDAd muscles spécifiques grâce à la méthode d'hybridation *in situ* (219). Cette méthode permet de déterminer le nombre de copies du génome viral contenu dans chacune des cellules. Ainsi, le titre viral peut être déterminé suite à une infection cellulaire.

S'il s'avère que la faible activité des HDAd n'est pas attribuable à un faible taux de particules infectieuse, nous envisageons trois explications plausibles: a) une mutation peut être survenue dans les promoteurs lors de l'amplification, b) une recombinaison des activateurs lors de la construction c) une stimulation du promoteur CB par la présence d'une séquence virale. Afin de s'assurer qu'il n'y a pas eu de mutation dans les régions des activateurs et des promoteurs, les séquences de ces derniers devront être vérifiées par séquençage.

Ensuite, il est possible qu'il se soit produit une recombinaison au niveau des activateurs des HDAd lors de leur construction. Chacun des HDAd comporte une

double cassette du gène rapporteur et de l'activateur/promoteur dans des directions opposées (figure 34).



Figure 34 : Structure générale des HDAd développés

Il est possible que la présence de 6 activateurs, 3 dans une direction et 3 dans l'autre, soit favorable à la recombinaison. Au cours de mes travaux de maîtrise, j'ai pu observer à quelques reprises, une recombinaison telle que celle-ci. La présence de 6 activateurs entraînait souvent une recombinaison dans les divers plasmides dérivés des éléments génétiques de TnIS que j'ai eu à construire. Un *Southern blot* devra être effectué sur l'ADN virale afin de confirmer la structure prévue présentée à la figure 34.

Pour terminer, s'il s'avère que le problème ne se situe pas au niveau de la préparation virale ni au niveau de mutation ou de recombinaison au niveau des promoteurs/activateurs, nous pouvons envisager que le problème se situe au niveau de l'HDAd CBLacZ et non des HDAd muscles spécifiques. En effet, il est possible que le promoteur CB soit stimulé par la présence d'un activateur. Lieber *et al* ont démontré, en 1999, que les éléments régulateurs peuvent interférer avec les promoteurs tissus spécifiques (238). Ces éléments régulateurs sont principalement retrouvés dans la séquence allant de 1 à 341 du génome adénoviral. Cette région est présente dans les vecteurs adénoviraux de troisième génération puisque c'est cette dernière qui contient les séquences ITR nécessaires à l'encapsidation des particules virales ainsi qu'une partie de la région E1A. Bien que cette équipe n'a pas démontré l'effet possible de ces séquences adénovirales sur l'activité de promoteur ubiquitaire tel que le CB, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse selon laquelle le promoteur CB pourrait être stimulé par une région du vecteur adénoviral. Toutefois, avant de s'engager dans cette voie, nous devons vérifier parallèlement l'activité du promoteur CB dans un vecteur adénoviral et dans un plasmide. Bien que nos résultats aux

figures 21 et 31 ne semblent pas différents, ceux-ci restent à confirmer avant d'étudier plus en profondeur cette hypothèse.

Avant de poursuivre les expériences à l'aide de ces HDAd, les problèmes quant à la variation des titres infectieux ainsi que des taux de contamination devront être résolus. En ce moment même, un HDAd contenant une copie du promoteur fusionné à l'activateur USE ou Δ USE contrôlant le gène rapporteur de la β -gal et une copie du promoteur CB contrôlant le gène rapporteur de la GFP est en construction. Grâce à la présence de la protéine GFP, il sera ainsi plus facile de suivre l'évolution de l'amplification de l'HDAd. De plus, il n'y aura que trois copies de l'activateur USE ou Δ USE dans ce nouvel HDAd. L'activité de ce nouvel HDAd pourra être comparée aux HDAd présentés dans ces travaux. Grâce à cette nouvelle construction, nous pourrions déterminer le titre infectieux des préparations virales qui pourront être comparées entre eux. Ceci nous fournira un très grand avantage puisque nous pourrions infecter les préparations cellulaires par les mêmes titres infectieux des différentes préparations d'adénovirus.

Suite à l'injection des HDAd USEx3 et CBLacZ chez les souris CD1 nouveaux-nées, on remarque que l'activité du HDAd CBLacZ est considérablement forte dans le muscle TA (figure 32). Un total de 592 ± 239 fibres positives a été dénombré suite à l'injection de cet HDAd chez la souris CD1. On remarque aussi que l'activité du HDAd USEx3 est faible dans le muscle du TA. Toutefois, cette activité est significativement plus élevée comparativement à celle du contrôle lors de l'injection. Nous pouvons interpréter ces résultats de deux façons. Tout d'abord, il était prévu que l'activité de l'HDAd USEx3 soit faible dans le muscle du TA puisque ce muscle est constitué essentiellement de fibres rapides. À la lumière des résultats issus des essais *in vitro* dans les cellules myotubes, l'expression faible de l'HDAd USEx3 peut aussi être attribuable à sa non fonctionnalité. On ne peut donc pas affirmer avec certitude que l'HDAd USEx3 est non fonctionnel dans les fibres rapides.

Contrairement aux résultats observés chez les souris nouveaux-nées, chez la souris CD1 adulte, on remarque que les HDAd USEx3 et CBLacZ ont une activité qui ne diffère pas statistiquement dans le muscle du TA. Bien que cette activité soit

significativement différente du contrôle négatif, elle n'en demeure pas moins très faible comparativement à celle mesurée suite à l'injection des nouveaux-nés. De plus, le nombre de fibres positives suite à l'injection des deux HDAd chez les souris adultes était de zéro. Cette faible efficacité des HDAd dans les muscles de souris adultes peut s'expliquer par le stade de maturation des fibres musculaires. Tel que mentionné précédemment, le récepteur de surface naturel des Adv, CAR, est régulé négativement dans les cellules musculaires matures. Cette diminution de l'expression de ce récepteur prévient ainsi l'attachement efficace des HDAd ainsi que l'infection des cellules musculaires matures (156). De plus, on observe une perte des intégrines $\alpha\beta$ -3 et $\alpha\beta$ -5, responsables de l'internalisation des Ad, lors de la maturation des fibres musculaires, ce qui contribue aussi à l'inefficacité de l'infection des fibres musculaires matures par les HDAd ou par les Adv (157). Celle-ci a été démontrée plus d'une fois par le passé (22). On ne peut donc pas affirmer si la faible activité de l'HDAd USEx3 est une conséquence de la faible efficacité de l'infection des fibres musculaires matures ou bien si celle-ci est due à une inefficacité de l'HDAd lui-même.

Il serait intéressant, dans un avenir prochain, d'effectuer des essais *in vitro* à l'aide des HDAd muscles spécifiques sur des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) telle que la lignée cellulaire Molt-4. En effet, l'un des avantages de l'utilisation de promoteurs muscles spécifiques est l'absence d'expression du gène rapporteur dans les CPA évitant ainsi une éventuelle reconnaissance du transgène par le système immunitaire de l'hôte. Ceci est un aspect important pour la thérapie génique puisque le rejet de la protéine thérapeutique par le système immunitaire est à éviter à tout prix. Bien sûr, ces tests devront être effectués suite à la validation de la structure des HDAd.

4.2 Conclusion

Pour conclure, nous sommes parvenus à développer des promoteurs efficaces et muscles spécifiques qui pourraient être utilisés dans le cadre d'une thérapie génique pour traiter la dystrophie musculaire de Duchenne. Nous avons démontré qu'une expression puissante et muscle spécifique peuvent être obtenues grâce à la multimérisation des activateurs USE et Δ USE. Les activateurs/promoteurs USEx3, USEx4, USEx5 et Δ USEx4 sont parmi les promoteurs les plus puissants décrits jusqu'à présent dans la littérature. Nous avons aussi pu établir que deux de ces promoteurs muscles spécifiques puissants USEx3 et Δ USEx3 étaient actifs *in vivo* dans les muscles de souris suite à l'électroporation. Finalement, ces deux activateurs/promoteurs ont servi à développer des vecteurs adénoviraux de troisième génération. Nous avons pu observer que les HDAd muscles spécifiques étaient faiblement actifs dans les cellules non musculaires et musculaires non différenciées. Malheureusement, pour des raisons encore sous investigation, ces HDAd présentent aussi une faible activité dans les cellules musculaires différenciées. De plus, leur spécificité musculaire (fibres lentes vs rapides) et leur efficacité *in vivo* restent encore à démontrer.

Références

1. Tortora, G.J., Grabowski S.R., *et al.* Principes d'anatomie et de physiologie. Anjou, CEC collégial et universitaire, 1994.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter P. Molecular Biology of the Cell, Fourth Edition. Garland Science Taylor & Francis Group, 2002.
3. Hauschka SD. The embryonic origin of muscle. Myology basic and clinical, Edited by Engel AG, Franzini-Armstrong C,. New York: McGraw-Hill, Inc., 3-73, 1994.
4. Campbell, N.A. Biologie. The Benjamin/Cummings Publishing Compagny, Inc., 1993.
5. Koppe, R. I., Hallauer, P. L., Karpati, G., and Hastings, K. E. cDNA clone and expression analysis of rodent fast and slow skeletal muscle troponin I mRNAs. J Biol Chem, 264: 14327-14333, 1989.
6. Wilkinson, J. M. and Grand, R. J. Comparison of amino acid sequence of troponin I from different striated muscles. Nature, 271: 31-35, 1978.
7. Dhoot, G. K. and Perry, S. V. Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. Nature, 278: 714-718, 1979.
8. Criswell, D. S., Hodgson, V. R., Hardeman, E. C., and Booth, F. W. Nerve-responsive troponin I slow promoter does not respond to unloading. J Appl Physiol, 84: 1083-1087, 1998.
9. Dhoot, G. K. and Perry, S. V. The components of the troponin complex and development in skeletal muscle. Exp Cell Res, 127: 75-87, 1980.
10. Brooke M.M., Kaiser, K. Muscle fiber type: how many and what kind? Arch. Neurology, 23, 369-370, 1970.
11. Pette, D. and Staron, R.S. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. Rev Physiol Biochem Pharmacol 116:1-76, 1990.
12. Martini, R. Fundamentals of Anatomy & Physiology. Prentice-Hall, Inc. A Pearson Company, tome 10, 1999.
13. Allbrook, D. Skeletal muscle regeneration. Muscle Nerve, 4: 234-245, 1981.
14. Duchenne, G.B.A Recherches sur la paralysie musculaires pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique. Arch Gen Med 11:5-528, 1868.
15. Bogdanovich, S., Perkins, K. J., Krag, T. O., and Khurana, T. S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. J Mol Med, 82: 102-115, 2004.

16. Monaco, A. P., Neve, R. L., Colletti-Feener, C., Bertelson, C. J., Kurnit, D. M., and Kunkel, L. M. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature*, 323: 646-650, 1986.
17. Hoffman, E. P., Brown, R. H., Jr., and Kunkel, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell*, 51: 919-928, 1987.
18. Prella, A., Medori, R., Moggio, M., Chan, H. W., Gallanti, A., Scarlato, G., and Bonilla, E. Dystrophin deficiency in a case of congenital myopathy. *J Neurol*, 239: 76-78, 1992.
19. Eiholzer, U., Boltshauser, E., Frey, D., Molinari, L., and Zachmann, M. Short stature: a common feature in Duchenne muscular dystrophy. *Eur J Pediatr*, 147: 602-605, 1988.
20. Firth, M., Gardner-Medwin, D., Hosking, G., and Wilkinson, E. Interviews with parents of boys suffering from Duchenne muscular dystrophy. *Dev Med Child Neurol*, 25: 466-471, 1983.
21. Jennekens, F. G., ten Kate, L. P., de, V. M., and Wintzen, A. R. Diagnostic criteria for Duchenne and Becker muscular dystrophy and myotonic dystrophy. *Neuromuscul Disord*, 1: 389-391, 1991.
22. Chakkalakal, J. V., Thompson, J., Parks, R. J., and Jasmin, B. J. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *FASEB J*, 19: 880-891, 2005.
23. Kapsa, R., Kornberg, A. J., and Byrne, E. Novel therapies for Duchenne muscular dystrophy. *Lancet Neurol*, 2: 299-310, 2003.
24. Wrogemann, K. and Pena, S. D. Mitochondrial calcium overload: A general mechanism for cell-necrosis in muscle diseases. *Lancet*, 1: 672-674, 1976.
25. Turner, P. R., Fong, P. Y., Denetclaw, W. F., and Steinhardt, R. A. Increased calcium influx in dystrophic muscle. *J Cell Biol*, 115: 1701-1712, 1991.
26. Fong, P. Y., Turner, P. R., Denetclaw, W. F., and Steinhardt, R. A. Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. *Science*, 250: 673-676, 1990.
27. Kumar, A., Khandelwal, N., Malya, R., Reid, M. B., and Boriek, A. M. Loss of dystrophin causes aberrant mechanotransduction in skeletal muscle fibers. *FASEB J*, 18: 102-113, 2004.
28. Mukoyama, M., Kondo, K., Hizawa, K., and Nishitani, H. Life spans of Duchenne muscular dystrophy patients in the hospital care program in Japan. *J Neurol Sci*, 81: 155-158, 1987.

29. Lescaut, W., Butori, C., Soriani, M. H., and Desnuelles, C. [Report of four women with Duchenne or Becker muscular dystrophy]. *Rev Med Interne*, 25: 464-467, 2004.
30. Lindenbaum, R. H., Clarke, G., Patel, C., Moncrieff, M., and Hughes, J. T. Muscular dystrophy in an X; 1 translocation female suggests that Duchenne locus is on X chromosome short arm. *J Med Genet*, 16: 389-392, 1979.
31. Greenstein, R. M., Reardon, M. P., Chan, T. S., Middleton, A. B., Mulivor, R. A., Greene, A. E., and Coriell, L. L. An (X;11) translocation in a girl with Duchenne muscular dystrophy. Repository identification No. GM1695. *Cytogenet Cell Genet*, 27: 268, 1980.
32. Jacobs, P. A., Hunt, P. A., Mayer, M., and Bart, R. D. Duchenne muscular dystrophy (DMD) in a female with an X/autosome translocation: further evidence that the DMD locus is at Xp21. *Am J Hum Genet*, 33: 513-518, 1981.
33. Zatz, M., Vianna-Morgante, A. M., Campos, P., and Diament, A. J. Translocation (X;6) in a female with Duchenne muscular dystrophy: implications for the localisation of the DMD locus. *J Med Genet*, 18: 442-447, 1981.
34. Gomez, M. R., Engel, A. G., Dewald, G., and Peterson, H. A. Failure of inactivation of Duchenne dystrophy X-chromosome in one of female identical twins. *Neurology*, 27: 537-541, 1977.
35. Emery, A. E. Duchenne muscular dystrophy. Genetic aspects, carrier detection and antenatal diagnosis. *Br Med Bull*, 36: 117-122, 1980.
36. Moser, H. Duchenne muscular dystrophy: pathogenetic aspects and genetic prevention. *Hum Genet*, 66: 17-40, 1984.
37. Gardner-Medwin, D. Mutation rate in Duchenne type of muscular dystrophy. *J Med Genet*, 7: 334-337, 1970.
38. Nicholson, L. V., Davison, K., Falkous, G., Harwood, C., O'Donnell, E., Slater, C. R., and Harris, J. B. Dystrophin in skeletal muscle. I. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci*, 94: 125-136, 1989.
39. North, A. J., Galazkiewicz, B., Byers, T. J., Glenney, J. R., Jr., and Small, J. V. Complementary distributions of vinculin and dystrophin define two distinct sarcolemma domains in smooth muscle. *J Cell Biol*, 120: 1159-1167, 1993.
40. Byers, T. J., Kunkel, L. M., and Watkins, S. C. The subcellular distribution of dystrophin in mouse skeletal, cardiac, and smooth muscle. *J Cell Biol*, 115: 411-421, 1991.

41. Coffey, A. J., Roberts, R. G., Green, E. D., Cole, C. G., Butler, R., Anand, R., Giannelli, F., and Bentley, D. R. Construction of a 2.6-Mb contig in yeast artificial chromosomes spanning the human dystrophin gene using an STS-based approach. *Genomics*, *12*: 474-484, 1992.
42. Boyce, F. M., Beggs, A. H., Feener, C., and Kunkel, L. M. Dystrophin is transcribed in brain from a distant upstream promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*: 1276-1280, 1991.
43. Gorecki, D. C., Monaco, A. P., Derry, J. M., Walker, A. P., Barnard, E. A., and Barnard, P. J. Expression of four alternative dystrophin transcripts in brain regions regulated by different promoters. *Hum Mol Genet*, *1*: 505-510, 1992.
44. Koenig, M., Monaco, A. P., and Kunkel, L. M. The complete sequence of dystrophin predicts a rod-shaped cytoskeletal protein. *Cell*, *53*: 219-228, 1988.
45. Davison, M. D. and Critchley, D. R. alpha-Actinins and the DMD protein contain spectrin-like repeats. *Cell*, *52*: 159-160, 1988.
46. Winder, S. J., Gibson, T. J., and Kendrick-Jones, J. Dystrophin and utrophin: the missing links! *FEBS Lett*, *369*: 27-33, 1995.
47. Cross, R. A., Stewart, M., and Kendrick-Jones, J. Structural predictions for the central domain of dystrophin. *FEBS Lett*, *262*: 87-92, 1990.
48. Koenig, M. and Kunkel, L. M. Detailed analysis of the repeat domain of dystrophin reveals four potential hinge segments that may confer flexibility. *J Biol Chem*, *265*: 4560-4566, 1990.
49. Bork, P. and Sudol, M. The WW domain: a signalling site in dystrophin? *Trends Biochem Sci*, *19*: 531-533, 1994.
50. Ponting, C. P., Blake, D. J., Davies, K. E., Kendrick-Jones, J., and Winder, S. J. ZZ and TAZ: new putative zinc fingers in dystrophin and other proteins. *Trends Biochem Sci*, *21*: 11-13, 1996.
51. Tinsley, J. M., Blake, D. J., Roche, A., Fairbrother, U., Riss, J., Byth, B. C., Knight, A. E., Kendrick-Jones, J., Suthers, G. K., Love, D. R., and . Primary structure of dystrophin-related protein. *Nature*, *360*: 591-593, 1992.
52. Love, D. R., Hill, D. F., Dickson, G., Spurr, N. K., Byth, B. C., Marsden, R. F., Walsh, F. S., Edwards, Y. H., and Davies, K. E. An autosomal transcript in skeletal muscle with homology to dystrophin. *Nature*, *339*: 55-58, 1989.
53. Khurana, T. S., Hoffman, E. P., and Kunkel, L. M. Identification of a chromosome 6-encoded dystrophin-related protein. *J Biol Chem*, *265*: 16717-16720, 1990.

54. Suzuki, A., Yoshida, M., Yamamoto, H., and Ozawa, E. Glycoprotein-binding site of dystrophin is confined to the cysteine-rich domain and the first half of the carboxy-terminal domain. *FEBS Lett*, *308*: 154-160, 1992.
55. Matsumura, K., Tome, F. M., Ionasescu, V., Ervasti, J. M., Anderson, R. D., Romero, N. B., Simon, D., Recan, D., Kaplan, J. C., Fardeau, M., and . Deficiency of dystrophin-associated proteins in Duchenne muscular dystrophy patients lacking COOH-terminal domains of dystrophin. *J Clin Invest*, *92*: 866-871, 1993.
56. Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol*, *122*: 809-823, 1993.
57. Bies, R. D., Caskey, C. T., and Fenwick, R. An intact cysteine-rich domain is required for dystrophin function. *J Clin Invest*, *90*: 666-672, 1992.
58. D'Souza, V. N., Nguyen, T. M., Morris, G. E., Karges, W., Pillers, D. A., and Ray, P. N. A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. *Hum Mol Genet*, *4*: 837-842, 1995.
59. Lidov, H. G., Selig, S., and Kunkel, L. M. Dp140: a novel 140 kDa CNS transcript from the dystrophin locus. *Hum Mol Genet*, *4*: 329-335, 1995.
60. Byers, T. J., Lidov, H. G., and Kunkel, L. M. An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. *Nat Genet*, *4*: 77-81, 1993.
61. Feener, C. A., Koenig, M., and Kunkel, L. M. Alternative splicing of human dystrophin mRNA generates isoforms at the carboxy terminus. *Nature*, *338*: 509-511, 1989.
62. Muntoni, F., Torelli, S., and Ferlini, A. Dystrophin and mutations: one gene, several proteins, multiple phenotypes. *Lancet Neurol*, *2*: 731-740, 2003.
63. Hugnot, J. P., Gilgenkrantz, H., Vincent, N., Chafey, P., Morris, G. E., Monaco, A. P., Berwald-Netter, Y., Koulakoff, A., Kaplan, J. C., Kahn, A., and . Distal transcript of the dystrophin gene initiated from an alternative first exon and encoding a 75-kDa protein widely distributed in nonmuscle tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*: 7506-7510, 1992.
64. Bar, S., Barnea, E., Levy, Z., Neuman, S., Yaffe, D., and Nudel, U. A novel product of the Duchenne muscular dystrophy gene which greatly differs from the known isoforms in its structure and tissue distribution. *Biochem J*, *272*: 557-560, 1990.
65. Nudel, U., Zuk, D., Einat, P., Zeelon, E., Levy, Z., Neuman, S., and Yaffe, D. Duchenne muscular dystrophy gene product is not identical in muscle and brain. *Nature*, *337*: 76-78, 1989.

66. Barnea, E., Zuk, D., Simantov, R., Nudel, U., and Yaffe, D. Specificity of expression of the muscle and brain dystrophin gene promoters in muscle and brain cells. *Neuron*, 5: 881-888, 1990.
67. Durbeej, M., Jung, D., Hjalt, T., Campbell, K. P., and Ekblom, P. Transient expression of Dp140, a product of the Duchenne muscular dystrophy locus, during kidney tubulogenesis. *Dev Biol*, 181: 156-167, 1997.
68. Ahn, A. H. and Kunkel, L. M. The structural and functional diversity of dystrophin. *Nat Genet*, 3: 283-291, 1993.
69. Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Karpati, G., Burghes, A. H., Belfall, B., Klamut, H. J., Talbot, J., Hodges, R. S., Ray, P. N., and Worton, R. G. The Duchenne muscular dystrophy gene product is localized in sarcolemma of human skeletal muscle. *Nature*, 333: 466-469, 1988.
70. Samitt, C. E. and Bonilla, E. Immunocytochemical study of dystrophin at the myotendinous junction. *Muscle Nerve*, 13: 493-500, 1990.
71. Arahata, K., Ishiura, S., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Suhara, Y., Eguchi, C., Ishihara, T., Nonaka, I., Ozawa, E., and Sugita, H. Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide. *Nature*, 333: 861-863, 1988.
72. Klamut, H. J., Zubrzycka-Gaarn, E. E., Bulman, D. E., Malhotra, S. B., Bodrug, S. E., Worton, R. G., and Ray, P. N. Myogenic regulation of dystrophin gene expression. *Br Med Bull*, 45: 681-702, 1989.
73. Cox, G. A., Cole, N. M., Matsumura, K., Phelps, S. F., Hauschka, S. D., Campbell, K. P., Faulkner, J. A., and Chamberlain, J. S. Overexpression of dystrophin in transgenic mdx mice eliminates dystrophic symptoms without toxicity. *Nature*, 364: 725-729, 1993.
74. Carlson, C. G. and Makiejus, R. V. A noninvasive procedure to detect muscle weakness in the mdx mouse. *Muscle Nerve*, 13: 480-484, 1990.
75. Torres, L. F. and Duchon, L. W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. *Brain*, 110 (Pt 2): 269-299, 1987.
76. Koenig, M., Hoffman, E. P., Bertelson, C. J., Monaco, A. P., Feener, C., and Kunkel, L. M. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50: 509-517, 1987.
77. Baumbach, L. L., Chamberlain, J. S., Ward, P. A., Farwell, N. J., and Caskey, C. T. Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies. *Neurology*, 39: 465-474, 1989.

78. Battaloglu, E., Telatar, M., Deymeer, F., Serdaroglu, P., Kuseyri, F., Ozdemir, C., Apak, M., and Tolun, A. DNA analysis in Turkish Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *Hum Genet*, 89: 635-639, 1992.
79. Bushby, K. M., Gardner-Medwin, D., Nicholson, L. V., Johnson, M. A., Haggerty, I. D., Cleghorn, N. J., Harris, J. B., and Bhattacharya, S. S. The clinical, genetic and dystrophin characteristics of Becker muscular dystrophy. II. Correlation of phenotype with genetic and protein abnormalities. *J Neurol*, 240: 105-112, 1993.
80. Den Dunnen, J. T., Grootsholten, P. M., Bakker, E., Blonden, L. A., Ginjaar, H. B., Wapenaar, M. C., van Paassen, H. M., van, B. C., Pearson, P. L., and van Ommen, G. J. Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene: FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet*, 45: 835-847, 1989.
81. Beggs, A. H., Koenig, M., Boyce, F. M., and Kunkel, L. M. Detection of 98% of DMD/BMD gene deletions by polymerase chain reaction. *Hum Genet*, 86: 45-48, 1990.
82. Oudet, C., Hanauer, A., Clemens, P., Caskey, T., and Mandel, J. L. Two hot spots of recombination in the DMD gene correlate with the deletion prone regions. *Hum Mol Genet*, 1: 599-603, 1992.
83. Nobile, C., Galvagni, F., Marchi, J., Roberts, R., and Vitiello, L. Genomic organization of the human dystrophin gene across the major deletion hot spot and the 3' region. *Genomics*, 28: 97-100, 1995.
84. Hu, X. Y., Ray, P. N., Murphy, E. G., Thompson, M. W., and Worton, R. G. Duplicational mutation at the Duchenne muscular dystrophy locus: its frequency, distribution, origin, and phenotype/genotype correlation. *Am J Hum Genet*, 46: 682-695, 1990.
85. Hiraishi, Y., Kato, S., Ishihara, T., and Takano, T. Quantitative Southern blot analysis in the dystrophin gene of Japanese patients with Duchenne or Becker muscular dystrophy: a high frequency of duplications. *J Med Genet*, 29: 897-901, 1992.
86. Prior, T. W., Papp, A. C., Snyder, P. J., Burghes, A. H., Sedra, M. S., Western, L. M., Bartello, C., and Mendell, J. R. Identification of two point mutations and a one base deletion in exon 19 of the dystrophin gene by heteroduplex formation. *Hum Mol Genet*, 2: 311-313, 1993.
87. Matsuo, M., Masumura, T., Nishio, H., Nakajima, T., Kitoh, Y., Takumi, T., Koga, J., and Nakamura, H. Exon skipping during splicing of dystrophin mRNA precursor due to an intraexon deletion in the dystrophin gene of Duchenne muscular dystrophy kobe. *J Clin Invest*, 87: 2127-2131, 1991.

88. Bulman, D. E., Gangopadhyay, S. B., Bebhuck, K. G., Worton, R. G., and Ray, P. N. Point mutation in the human dystrophin gene: identification through western blot analysis. *Genomics*, 10: 457-460, 1991.
89. Kilimann, M. W., Pizzuti, A., Grompe, M., and Caskey, C. T. Point mutations and polymorphisms in the human dystrophin gene identified in genomic DNA sequences amplified by multiplex PCR. *Hum Genet*, 89: 253-258, 1992.
90. Roberts, R. G., Bobrow, M., and Bentley, D. R. Point mutations in the dystrophin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 2331-2335, 1992.
91. Monaco, A. P., Bertelson, C. J., Liechti-Gallati, S., Moser, H., and Kunkel, L. M. An explanation for the phenotypic differences between patients bearing partial deletions of the DMD locus. *Genomics*, 2: 90-95, 1988.
92. Mostacciolo, M. L., Lombardi, A., Cambissa, V., Danieli, G. A., and Angelini, C. Population data on benign and severe forms of X-linked muscular dystrophy. *Hum Genet*, 75: 217-220, 1987.
93. Bushby, K. M. The limb-girdle muscular dystrophies-multiple genes, multiple mechanisms. *Hum Mol Genet*, 8: 1875-1882, 1999.
94. Emery, A. E. The muscular dystrophies. *Lancet*, 359: 687-695, 2002.
95. Cohn, R. D. and Campbell, K. P. Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 23: 1456-1471, 2000.
96. Ervasti, J. M. and Campbell, K. P. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell*, 66: 1121-1131, 1991.
97. Ibraghimov-Beskrovnya, O., Ervasti, J. M., Leveille, C. J., Slaughter, C. A., Sernett, S. W., and Campbell, K. P. Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature*, 355: 696-702, 1992.
98. Winder, S. J. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci*, 26: 118-124, 2001.
99. Ishikawa-Sakurai, M., Yoshida, M., Imamura, M., Davies, K. E., and Ozawa, E. ZZ domain is essentially required for the physiological binding of dystrophin and utrophin to beta-dystroglycan. *Hum Mol Genet*, 13: 693-702, 2004.
100. Henry, M. D. and Campbell, K. P. A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell*, 95: 859-870, 1998.
101. Ozawa, E., Mizuno, Y., Hagiwara, Y., Sasaoka, T., and Yoshida, M. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve*, 32: 563-576, 2005.

102. Albrecht, D. E. and Froehner, S. C. Syntrophins and dystrobrevins: defining the dystrophin scaffold at synapses. *Neurosignals*, 11: 123-129, 2002.
103. Matsumura, K., Burghes, A. H., Mora, M., Tome, F. M., Morandi, L., Cornello, F., Leturcq, F., Jeanpierre, M., Kaplan, J. C., Reinert, P., and . Immunohistochemical analysis of dystrophin-associated proteins in Becker/Duchenne muscular dystrophy with huge in-frame deletions in the NH2-terminal and rod domains of dystrophin. *J Clin Invest*, 93: 99-105, 1994.
104. Straub, V. and Campbell, K. P. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol*, 10: 168-175, 1997.
105. Rando, T. A. The dystrophin-glycoprotein complex, cellular signaling, and the regulation of cell survival in the muscular dystrophies. *Muscle Nerve*, 24: 1575-1594, 2001.
106. Hoffman, E. P. and Dressman, D. Molecular pathophysiology and targeted therapeutics for muscular dystrophy. *Trends Pharmacol Sci*, 22: 465-470, 2001.
107. Culligan, K. G., Mackey, A. J., Finn, D. M., Maguire, P. B., and Ohlendieck, K. Role of dystrophin isoforms and associated proteins in muscular dystrophy (review). *Int J Mol Med*, 2: 639-648, 1998.
108. Michalak, M. and Opas, M. Functions of dystrophin and dystrophin associated proteins. *Curr Opin Neurol*, 10: 436-442, 1997.
109. Petrof, B. J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. *Am J Phys Med Rehabil*, 81: S162-S174, 2002.
110. Lavidor, K. A., Kakkar, R., and McNally, E. M. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res*, 94: 1023-1031, 2004.
111. Abramovici, H., Hogan, A. B., Obagi, C., Topham, M. K., and Gee, S. H. Diacylglycerol kinase-zeta localization in skeletal muscle is regulated by phosphorylation and interaction with syntrophins. *Mol Biol Cell*, 14: 4499-4511, 2003.
112. Yang, B., Jung, D., Motto, D., Meyer, J., Koretzky, G., and Campbell, K. P. SH3 domain-mediated interaction of dystroglycan and Grb2. *J Biol Chem*, 270: 11711-11714, 1995.
113. Brenman, J. E., Chao, D. S., Xia, H., Aldape, K., and Bretz, D. S. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell*, 82: 743-752, 1995.

114. Sicinski, P., Geng, Y., Ryder-Cook, A. S., Barnard, E. A., Darlison, M. G., and Barnard, P. J. The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. *Science*, 244: 1578-1580, 1989.
115. Bulfield, G., Siller, W. G., Wight, P. A., and Moore, K. J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81: 1189-1192, 1984.
116. Ohlendieck, K., Ervasti, J. M., Matsumura, K., Kahl, S. D., Leveille, C. J., and Campbell, K. P. Dystrophin-related protein is localized to neuromuscular junctions of adult skeletal muscle. *Neuron*, 7: 499-508, 1991.
117. Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Gaver, M. G., and Campbell, K. P. Deficiency of a glycoprotein component of the dystrophin complex in dystrophic muscle. *Nature*, 345: 315-319, 1990.
118. Rafael, J. A. and Brown, S. C. Dystrophin and utrophin: genetic analyses of their role in skeletal muscle. *Microsc Res Tech*, 48: 155-166, 2000.
119. Cooper, B. J., Winand, N. J., Stedman, H., Valentine, B. A., Hoffman, E. P., Kunkel, L. M., Scott, M. O., Fischbeck, K. H., Kornegay, J. N., Avery, R. J., and . The homologue of the Duchenne locus is defective in X-linked muscular dystrophy of dogs. *Nature*, 334: 154-156, 1988.
120. Schatzberg, S. J., Olby, N. J., Breen, M., Anderson, L. V., Langford, C. F., Dickens, H. F., Wilton, S. D., Zeiss, C. J., Binns, M. M., Kornegay, J. N., Morris, G. E., and Sharp, N. J. Molecular analysis of a spontaneous dystrophin 'knockout' dog. *Neuromuscul Disord*, 9: 289-295, 1999.
121. Shimatsu, Y., Katagiri, K., Furuta, T., Nakura, M., Tanioka, Y., Yuasa, K., Tomohiro, M., Kornegay, J. N., Nonaka, I., and Takeda, S. Canine X-linked muscular dystrophy in Japan (CXMDJ). *Exp Anim*, 52: 93-97, 2003.
122. Nguyen, F., Cherel, Y., Guigand, L., Goubault-Leroux, I., and Wyers, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. *J Comp Pathol*, 126: 100-108, 2002.
123. Kohn, B., Guscetti, F., Waxenberger, M., and Augsburger, H. [Muscular dystrophy in a cat]. *Tierarztl Prax*, 21: 451-457, 1993.
124. Gaschen, F. and Burgunder, J. M. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. *Acta Neuropathol (Berl)*, 101: 591-600, 2001.
125. Guyon, J. R., Mosley, A. N., Zhou, Y., O'Brien, K. F., Sheng, X., Chiang, K., Davidson, A. J., Volinski, J. M., Zon, L. I., and Kunkel, L. M. The dystrophin associated protein complex in zebrafish. *Hum Mol Genet*, 12: 601-615, 2003.

126. Gieseler, K., Bessou, C., and Segalat, L. Dystrobrevin- and dystrophin-like mutants display similar phenotypes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Neurogenetics*, 2: 87-90, 1999.
127. Bessou, C., Giuglia, J. B., Franks, C. J., Holden-Dye, L., and Segalat, L. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* dystrophin-like gene *dys-1* lead to hyperactivity and suggest a link with cholinergic transmission. *Neurogenetics*, 2: 61-72, 1998.
128. Fenichel, G. M., Florence, J. M., Pestronk, A., Mendell, J. R., Moxley, R. T., III, Griggs, R. C., Brooke, M. H., Miller, J. P., Robison, J., King, W., and . Long-term benefit from prednisone therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, 41: 1874-1877, 1991.
129. Mendell, J. R., Moxley, R. T., Griggs, R. C., Brooke, M. H., Fenichel, G. M., Miller, J. P., King, W., Signore, L., Pandya, S., Florence, J., and . Randomized, double-blind six-month trial of prednisone in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 320: 1592-1597, 1989.
130. DeSilva, S., Drachman, D. B., Mellits, D., and Kuncl, R. W. Prednisone treatment in Duchenne muscular dystrophy. Long-term benefit. *Arch Neurol*, 44: 818-822, 1987.
131. Biggar, W. D., Gingras, M., Fehlings, D. L., Harris, V. A., and Steele, C. A. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr*, 138: 45-50, 2001.
132. Zammit, P. S. and Partridge, T. A. Sizing up muscular dystrophy. *Nat Med*, 8: 1355-1356, 2002.
133. Barton-Davis, E. R., Cordier, L., Shoturma, D. I., Leland, S. E., and Sweeney, H. L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. *J Clin Invest*, 104: 375-381, 1999.
134. Wagner, K. R., Hamed, S., Hadley, D. W., Gropman, A. L., Burstein, A. H., Escolar, D. M., Hoffman, E. P., and Fischbeck, K. H. Gentamicin treatment of Duchenne and Becker muscular dystrophy due to nonsense mutations. *Ann Neurol*, 49: 706-711, 2001.
135. Tinsley, J. M. and Davies, K. E. Utrophin: a potential replacement for dystrophin? *Neuromuscul Disord*, 3: 537-539, 1993.
136. Matsumura, K., Ervasti, J. M., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., and Campbell, K. P. Association of dystrophin-related protein with dystrophin-associated proteins in mdx mouse muscle. *Nature*, 360: 588-591, 1992.

137. Chaubourt, E., Fossier, P., Baux, G., Leprince, C., Israel, M., and De La, P. S. Nitric oxide and l-arginine cause an accumulation of utrophin at the sarcolemma: a possible compensation for dystrophin loss in Duchenne muscular dystrophy. *Neurobiol Dis*, 6: 499-507, 1999.
138. Beauchamp, J. R., Morgan, J. E., Pagel, C. N., and Partridge, T. A. Dynamics of myoblast transplantation reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol*, 144: 1113-1122, 1999.
139. Miller, R. G., Sharma, K. R., Pavlath, G. K., Gussoni, E., Mynhier, M., Lanctot, A. M., Greco, C. M., Steinman, L., and Blau, H. M. Myoblast implantation in Duchenne muscular dystrophy: the San Francisco study. *Muscle Nerve*, 20: 469-478, 1997.
140. Partridge, T. A., Morgan, J. E., Coulton, G. R., Hoffman, E. P., and Kunkel, L. M. Conversion of mdx myofibres from dystrophin-negative to -positive by injection of normal myoblasts. *Nature*, 337: 176-179, 1989.
141. Salminen, A., Elson, H. F., Mickley, L. A., Fojo, A. T., and Gottesman, M. M. Implantation of recombinant rat myocytes into adult skeletal muscle: a potential gene therapy. *Hum Gene Ther*, 2: 15-26, 1991.
142. Moisset, P. A., Skuk, D., Asselin, I., Goulet, M., Roy, B., Karpati, G., and Tremblay, J. P. Successful transplantation of genetically corrected DMD myoblasts following ex vivo transduction with the dystrophin minigene. *Biochem Biophys Res Commun*, 247: 94-99, 1998.
143. Endesfelder, S., Bucher, S., Kliche, A., Reszka, R., and Speer, A. Transfection of normal primary human skeletal myoblasts with p21 and p57 antisense oligonucleotides to improve their proliferation: a first step towards an alternative molecular therapy approach of Duchenne muscular dystrophy. *J Mol Med*, 81: 355-362, 2003.
144. Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., and Tremblay, J. P. Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol*, 155: 22-30, 1999.
145. Cousins, J. C., Woodward, K. J., Gross, J. G., Partridge, T. A., and Morgan, J. E. Regeneration of skeletal muscle from transplanted immortalised myoblasts is oligoclonal. *J Cell Sci*, 117: 3259-3269, 2004.
146. Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Piette, V., Cote, C. H., Chapdelaine, P., Hogrel, J. Y., Paradis, M., Bouchard, J. P., Sylvain, M., Lachance, J. G., and Tremblay, J. P. 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: 38-46, 2007.

147. Skuk, D., Goulet, M., Roy, B., Chapdelaine, P., Bouchard, J. P., Roy, R., Dugre, F. J., Sylvain, M., Lachance, J. G., Deschenes, L., Senay, H., and Tremblay, J. P. Dystrophin expression in muscles of duchenne muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65: 371-386, 2006.
148. Skuk, D., Roy, B., Goulet, M., Chapdelaine, P., Bouchard, J. P., Roy, R., Dugre, F. J., Lachance, J. G., Deschenes, L., Helene, S., Sylvain, M., and Tremblay, J. P. Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. *Mol Ther*, 9: 475-482, 2004.
149. Molinier-Frenkel V, Boulanger P. Les adénovirus : de la structure à la vectorisation de gènes et à la vaccinologie. I. Virologie des adénovirus et des adénovirus recombinants. *Virologie*, 7, 267-279, 2003.
150. Russell, W. C. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol*, 81: 2573-2604, 2000.
151. Acsadi, G., Lochmuller, H., Jani, A., Huard, J., Massie, B., Prescott, S., Simoneau, M., Petrof, B. J., and Karpati, G. Dystrophin expression in muscles of mdx mice after adenovirus-mediated in vivo gene transfer. *Hum Gene Ther*, 7: 129-140, 1996.
152. Vincent, N., Ragot, T., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Chafey, P., Gregoire, A., Briand, P., Kaplan, J. C., Kahn, A., and Perricaudet, M. Long-term correction of mouse dystrophic degeneration by adenovirus-mediated transfer of a minidystrophin gene. *Nat Genet*, 5: 130-134, 1993.
153. Ragot, T., Vincent, N., Chafey, P., Vigne, E., Gilgenkrantz, H., Couton, D., Cartaud, J., Briand, P., Kaplan, J. C., Perricaudet, M., and . Efficient adenovirus-mediated transfer of a human minidystrophin gene to skeletal muscle of mdx mice. *Nature*, 361: 647-650, 1993.
154. Amalfitano, A., Hauser, M. A., Hu, H., Serra, D., Begy, C. R., and Chamberlain, J. S. Production and characterization of improved adenovirus vectors with the E1, E2b, and E3 genes deleted. *J Virol*, 72: 926-933, 1998.
155. Parks, R. J., Chen, L., Anton, M., Sankar, U., Rudnicki, M. A., and Graham, F. L. 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: 13565-13570, 1996.
156. Nalbantoglu, J., Pari, G., Karpati, G., and Holland, P. C. 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: 1009-1019, 1999.

157. Acsadi, G., Jani, A., Massie, B., Simoneau, M., Holland, P., Blaschuk, K., and Karpati, G. A differential efficiency of adenovirus-mediated in vivo gene transfer into skeletal muscle cells of different maturity. *Hum Mol Genet*, 3: 579-584, 1994.
158. Gilbert, R., Dudley, R. W., Liu, A. B., Petrof, B. J., Nalbantoglu, J., and Karpati, G. Prolonged dystrophin expression and functional correction of mdx mouse muscle following gene transfer with a helper-dependent (guttated) adenovirus-encoding murine dystrophin. *Hum Mol Genet*, 12: 1287-1299, 2003.
159. Mullick, A., Xu, Y., Warren, R., Koutroumanis, M., Guilbault, C., Broussau, S., Malenfant, F., Bourget, L., Lamoureux, L., Lo, R., Caron, A. W., Pilote, A., and Massie, B. The cumate gene-switch: a system for regulated expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol*, 6: 43, 2006.
160. Zhou, H. S., Zhao, T., Rao, X. M., and Beaudet, A. L. Production of helper-dependent adenovirus vector relies on helper virus structure and complementing. *J Gene Med*, 4: 498-509, 2002.
161. Umana, P., Gerdes, C. A., Stone, D., Davis, J. R., Ward, D., Castro, M. G., and Lowenstein, P. R. Efficient FLPe recombinase enables scalable production of helper-dependent adenoviral vectors with negligible helper-virus contamination. *Nat Biotechnol*, 19: 582-585, 2001..
162. Dunkley, M. G., Wells, D. J., Walsh, F. S., and Dickson, G. Direct retroviral-mediated transfer of a dystrophin minigene into mdx mouse muscle in vivo. *Hum Mol Genet*, 2: 717-723, 1993.
163. Kafri, T., Blomer, U., Peterson, D. A., Gage, F. H., and Verma, I. M. Sustained expression of genes delivered directly into liver and muscle by lentiviral vectors. *Nat Genet*, 17: 314-317, 1997.
164. Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M., and Trono, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272: 263-267, 1996.
165. Kobinger, G. P., Weiner, D. J., Yu, Q. C., and Wilson, J. M. Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol*, 19: 225-230, 2001.
166. Kobinger, G. P., Louboutin, J. P., Barton, E. R., Sweeney, H. L., and Wilson, J. M. Correction of the dystrophic phenotype by in vivo targeting of muscle progenitor cells. *Hum Gene Ther*, 14: 1441-1449, 2003.
167. Wang, Z., Zhu, T., Qiao, C., Zhou, L., Wang, B., Zhang, J., Chen, C., Li, J., and Xiao, X. Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nat Biotechnol*, 23: 321-328, 2005.

168. Chao, H., Liu, Y., Rabinowitz, J., Li, C., Samulski, R. J., and Walsh, C. E. Several log increase in therapeutic transgene delivery by distinct adeno-associated viral serotype vectors. *Mol Ther*, 2: 619-623, 2000.
169. Blankinship, M. J., Gregorevic, P., Allen, J. M., Harper, S. Q., Harper, H., Halbert, C. L., Miller, D. A., and Chamberlain, J. S. Efficient transduction of skeletal muscle using vectors based on adeno-associated virus serotype 6. *Mol Ther*, 10: 671-678, 2004.
170. Inagaki, K., Fuess, S., Storm, T. A., Gibson, G. A., Mctiernan, C. F., Kay, M. A., and Nakai, H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther*, 14: 45-53, 2006.
171. Pacak, C. A., Mah, C. S., Thattaliyath, B. D., Conlon, T. J., Lewis, M. A., Cloutier, D. E., Zolotukhin, I., Tarantal, A. F., and Byrne, B. J. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res*, 99: e3-e9, 2006.
172. Yuasa, K., Sakamoto, M., Miyagoe-Suzuki, Y., Tanouchi, A., Yamamoto, H., Li, J., Chamberlain, J. S., Xiao, X., and Takeda, S. Adeno-associated virus vector-mediated gene transfer into dystrophin-deficient skeletal muscles evokes enhanced immune response against the transgene product. *Gene Ther*, 9: 1576-1588, 2002.
173. Gregorevic, P., Blankinship, M. J., Allen, J. M., Crawford, R. W., Meuse, L., Miller, D. G., Russell, D. W., and Chamberlain, J. S. Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat Med*, 10: 828-834, 2004.
174. Pruchnic, R., Cao, B., Peterson, Z. Q., Xiao, X., Li, J., Samulski, R. J., Epperly, M., and Huard, J. The use of adeno-associated virus to circumvent the maturation-dependent viral transduction of muscle fibers. *Hum Gene Ther*, 11: 521-536, 2000.
175. Dong, J. Y., Fan, P. D., and Frizzell, R. A. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. *Hum Gene Ther*, 7: 2101-2112, 1996.
176. Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., and Felgner, P. L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247: 1465-1468, 1990.
177. Acsadi, G., Dickson, G., Love, D. R., Jani, A., Walsh, F. S., Gurusinghe, A., Wolff, J. A., and Davies, K. E. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature*, 352: 815-818, 1991.

178. Liu, F., Nishikawa, M., Clemens, P. R., and Huang, L. Transfer of full-length Dmd to the diaphragm muscle of Dmd(mdx/mdx) mice through systemic administration of plasmid DNA. *Mol Ther*, 4: 45-51, 2001.
179. Liang, K. W., Nishikawa, M., Liu, F., Sun, B., Ye, Q., and Huang, L. Restoration of dystrophin expression in mdx mice by intravascular injection of naked DNA containing full-length dystrophin cDNA. *Gene Ther*, 11: 901-908, 2004.
180. Zhang, G., Ludtke, J. J., Thioudellet, C., Kleinpeter, P., Antoniou, M., Herweijer, H., Braun, S., and Wolff, J. A. Intraarterial delivery of naked plasmid DNA expressing full-length mouse dystrophin in the mdx mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, 15: 770-782, 2004.
181. Romero, N. B., Benveniste, O., Payan, C., Braun, S., Squiban, P., Herson, S., and Fardeau, M. Current protocol of a research phase I clinical trial of full-length dystrophin plasmid DNA in Duchenne/Becker muscular dystrophies. Part II: clinical protocol. *Neuromuscul Disord*, 12 Suppl 1: S45-S48, 2002.
182. Romero, N. B., Braun, S., Benveniste, O., Leturcq, F., Hogrel, J. Y., Morris, G. E., Barois, A., Eymard, B., Payan, C., Ortega, V., Boch, A. L., Lejean, L., Thioudellet, C., Mourot, B., Escot, C., Choquel, A., Recan, D., Kaplan, J. C., Dickson, G., Klatzmann, D., Molinier-Frenckel, V., Guillet, J. G., Squiban, P., Herson, S., and Fardeau, M. Phase I study of dystrophin plasmid-based gene therapy in Duchenne/Becker muscular dystrophy. *Hum Gene Ther*, 15: 1065-1076, 2004.
183. Molnar, M. J., Gilbert, R., Lu, Y., Liu, A. B., Guo, A., Larochelle, N., Orlopp, K., Lochmuller, H., Petrof, B. J., Nalbantoglu, J., and Karpati, G. Factors influencing the efficacy, longevity, and safety of electroporation-assisted plasmid-based gene transfer into mouse muscles. *Mol Ther*, 10: 447-455, 2004.
184. Vitadello, M., Schiaffino, M. V., Picard, A., Scarpa, M., and Schiaffino, S. Gene transfer in regenerating muscle. *Hum Gene Ther*, 5: 11-18, 1994.
185. Morishita, R., Gibbons, G. H., Kaneda, Y., Ogihara, T., and Dzau, V. J. Novel and effective gene transfer technique for study of vascular renin angiotensin system. *J Clin Invest*, 91: 2580-2585, 1993.
186. Tomita, N., Higaki, J., Morishita, R., Kato, K., Mikami, H., Kaneda, Y., and Ogihara, T. Direct in vivo gene introduction into rat kidney. *Biochem Biophys Res Commun*, 186: 129-134, 1992.
187. Hartigan-O'Connor, D., Kirk, C. J., Crawford, R., Mule, J. J., and Chamberlain, J. S. Immune evasion by muscle-specific gene expression in dystrophic muscle. *Mol Ther*, 4: 525-533, 2001.

188. Johnson, J. E., Wold, B. J., and Hauschka, S. D. Muscle creatine kinase sequence elements regulating skeletal and cardiac muscle expression in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 9: 3393-3399, 1989.
189. Jaynes, J. B., Chamberlain, J. S., Buskin, J. N., Johnson, J. E., and Hauschka, S. D. Transcriptional regulation of the muscle creatine kinase gene and regulated expression in transfected mouse myoblasts. *Mol Cell Biol*, 6: 2855-2864, 1986.
190. Jaynes, J. B., Johnson, J. E., Buskin, J. N., Gartside, C. L., and Hauschka, S. D. The muscle creatine kinase gene is regulated by multiple upstream elements, including a muscle-specific enhancer. *Mol Cell Biol*, 8: 62-70, 1988.
191. Sternberg, E. A., Spizz, G., Perry, W. M., Vizard, D., Weil, T., and Olson, E. N. Identification of upstream and intragenic regulatory elements that confer cell-type-restricted and differentiation-specific expression on the muscle creatine kinase gene. *Mol Cell Biol*, 8: 2896-2909, 1988.
192. Lee, C. C., Pons, F., Jones, P. G., Bies, R. D., Schlang, A. M., Leger, J. J., and Caskey, C. T. Mdx transgenic mouse: restoration of recombinant dystrophin to the dystrophic muscle. *Hum Gene Ther*, 4: 273-281, 1993.
193. Larochelle, N., Lochmuller, H., Zhao, J., Jani, A., Hallauer, P., Hastings, K. E., Massie, B., Prescott, S., Petrof, B. J., Karpati, G., and Nalbantoglu, J. Efficient muscle-specific transgene expression after adenovirus-mediated gene transfer in mice using a 1.35 kb muscle creatine kinase promoter/enhancer. *Gene Ther*, 4: 465-472, 1997.
194. Konieczny, S. F. and Emerson, C. P., Jr. Complex regulation of the muscle-specific contractile protein (troponin I) gene. *Mol Cell Biol*, 7: 3065-3075, 1987.
195. Yutzey, K. E., Kline, R. L., and Konieczny, S. F. An internal regulatory element controls troponin I gene expression. *Mol Cell Biol*, 9: 1397-1405, 1989.
196. Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, 51: 987-1000, 1987.
197. Wright, W. E., Sassoon, D. A., and Lin, V. K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, 56: 607-617, 1989.
198. Edmondson, D. G. and Olson, E. N. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Dev*, 3: 628-640, 1989.
199. Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., and Arnold, H. H. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J*, 8: 701-709, 1989.

200. Salminen, M., Spitz, F., Fiszman, M. Y., Demignon, J., Kahn, A., Daegelen, D., and Maire, P. Myotube-specific activity of the human aldolase A M-promoter requires an overlapping binding site for NF1 and MEF2 factors in addition to a binding site (M1) for unknown proteins. *J Mol Biol*, 253: 17-31, 1995.
201. Rhodes, S. J. and Konieczny, S. F. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Dev*, 3: 2050-2061, 1989.
202. Braun, T., Winter, B., Bober, E., and Arnold, H. H. Transcriptional activation domain of the muscle-specific gene-regulatory protein myf5. *Nature*, 346: 663-665, 1990.
203. Calvo, S., Venepally, P., Cheng, J., and Buonanno, A. Fiber-type-specific transcription of the troponin I slow gene is regulated by multiple elements. *Mol Cell Biol*, 19: 515-525, 1999.
204. Hidaka, K., Yamamoto, I., Arai, Y., and Mukai, T. The MEF-3 motif is required for MEF-2-mediated skeletal muscle-specific induction of the rat aldolase A gene. *Mol Cell Biol*, 13: 6469-6478, 1993.
205. Parmacek, M. S., Ip, H. S., Jung, F., Shen, T., Martin, J. F., Vora, A. J., Olson, E. N., and Leiden, J. M. A novel myogenic regulatory circuit controls slow/cardiac troponin C gene transcription in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*, 14: 1870-1885, 1994.
206. Wade, R., Eddy, R., Shows, T. B., and Kedes, L. cDNA sequence, tissue-specific expression, and chromosomal mapping of the human slow-twitch skeletal muscle isoform of troponin I. *Genomics*, 7: 346-357, 1990.
207. Calvo, S., Vullhorst, D., Venepally, P., Cheng, J., Karavanova, I., and Buonanno, A. Molecular dissection of DNA sequences and factors involved in slow muscle-specific transcription. *Mol Cell Biol*, 21: 8490-8503, 2001.
208. Smale, S. T. and Baltimore, D. The "initiator" as a transcription control element. *Cell*, 57: 103-113, 1989.
209. Banerjee-Basu, S. and Buonanno, A. cis-acting sequences of the rat troponin I slow gene confer tissue- and development-specific transcription in cultured muscle cells as well as fiber type specificity in transgenic mice. *Mol Cell Biol*, 13: 7019-7028, 1993.
210. Nakayama, M., Stauffer, J., Cheng, J., Banerjee-Basu, S., Wawrousek, E., and Buonanno, A. Common core sequences are found in skeletal muscle slow- and fast-fiber-type-specific regulatory elements. *Mol Cell Biol*, 16: 2408-2417, 1996.

211. Okayama, H. and Berg, P. A cDNA cloning vector that permits expression of cDNA inserts in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, 3: 280-289, 1983.
212. Brinster, R. L., Allen, J. M., Behringer, R. R., Gelinas, R. E., and Palmiter, R. D. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85: 836-840, 1988.
213. Palmiter, R. D., Sandgren, E. P., Avarbock, M. R., Allen, D. D., and Brinster, R. L. Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 478-482, 1991.
214. Larochelle, N., Oualikene, W., Dunant, P., Massie, B., Karpati, G., Nalbantoglu, J., and Lochmuller, H. The short MCK1350 promoter/enhancer allows for sufficient dystrophin expression in skeletal muscles of mdx mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 292: 626-631, 2002.
215. Massie, B., Mosser, D.D., Koutroumanis, M., Vitte-Mony, I., Lamoureux, L., Couture, F., Paquet, L., Guilbault, C., Dionne, J., Chahla, D., Jolicoeur, P. and Langelier, Y. . New adenovirus vectors for protein production and gene transfer. *Cytotechnology*, 28: 53-64, 1998.
216. Kumar, A. Fast skeletal muscle fiber-type-specificity of the troponin I (fast) gene IRE enhancer resides in a 30 base-pair region. McGill University, M.Sc Thesis, 2003.
217. Corin, S. J., Levitt, L. K., O'Mahoney, J. V., Joya, J. E., Hardeman, E. C., and Wade, R. Delineation of a slow-twitch-myofiber-specific transcriptional element by using in vivo somatic gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 6185-6189, 1995.
218. Gilbert, R., Liu, A., Petrof, B., Nalbantoglu, J., and Karpati, G. Improved performance of a fully gutted adenovirus vector containing two full-length dystrophin cDNAs regulated by a strong promoter. *Mol Ther*, 6: 501-509, 2002.
219. Gilbert, R., Nalbantoglu, J., Howell, J. M., Davies, L., Fletcher, S., Amalfitano, A., Petrof, B. J., Kamen, A., Massie, B., and Karpati, G. Dystrophin expression in muscle following gene transfer with a fully deleted ("gutted") adenovirus is markedly improved by trans-acting adenoviral gene products. *Hum Gene Ther*, 12: 1741-1755, 2001.
220. Massie, B., Dionne, J., Lamarche, N., Fleurent, J., and Langelier, Y. Improved adenovirus vector provides herpes simplex virus ribonucleotide reductase R1 and R2 subunits very efficiently. *Biotechnology (N Y)*, 13: 602-608, 1995.
221. Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., and Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36: 59-74, 1977.

222. Giard, D. J., Aaronson, S. A., Todaro, G. J., Arnstein, P., Kersey, J. H., Dosik, H., and Parks, W. P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst*, *51*: 1417-1423, 1973.
223. Puck, T. T., Marcus, P. I., and Cieciura, S. J. Clonal growth of mammalian cells in vitro; growth characteristics of colonies from single HeLa cells with and without a feeder layer. *J Exp Med*, *103*: 273-283, 1956.
224. Yaffe, D. and Saxel, O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature*, *270*: 725-727, 1977.
225. Pilotte, A. Production de vecteurs viraux efficaces pour la transduction de cellules transformées et de cellules primaires. Département de Biologie Moléculaire, Faculté des études supérieures, Université de Montréal, 2005
226. Sambrook, F. M. *Molecular Cloning a laboratory manual second edition*, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
227. Cote, J., Bourget, L., Garnier, A., and Kamen, A. Study of adenovirus production in serum-free 293SF suspension culture by GFP-expression monitoring. *Biotechnol Prog*, *13*: 709-714, 1997.
228. Hallauer, P. L. and Hastings, K. E. TnIfast IRE enhancer: multistep developmental regulation during skeletal muscle fiber type differentiation. *Dev Dyn*, *224*: 422-431, 2002.
229. Furger, A., O'Sullivan, J. M., Binnie, A., Lee, B. A., and Proudfoot, N. J. Promoter proximal splice sites enhance transcription. *Genes Dev*, *16*: 2792-2799, 2002.
230. Hauser, M. A., Robinson, A., Hartigan-O'Connor, D., Williams-Gregory, D. A., Buskin, J. N., Apone, S., Kirk, C. J., Hardy, S., Hauschka, S. D., and Chamberlain, J. S. Analysis of muscle creatine kinase regulatory elements in recombinant adenoviral vectors. *Mol Ther*, *2*: 16-25, 2000.
231. Li, S., MacLaughlin, F. C., Fewell, J. G., Li, Y., Mehta, V., French, M. F., Nordstrom, J. L., Coleman, M., Belagali, N. S., Schwartz, R. J., and Smith, L. C. Increased level and duration of expression in muscle by co-expression of a transactivator using plasmid systems. *Gene Ther*, *6*: 2005-2011, 1999.
232. Li, X., Eastman, E. M., Schwartz, R. J., and Draghia-Akli, R. Synthetic muscle promoters: activities exceeding naturally occurring regulatory sequences. *Nat Biotechnol*, *17*: 241-245, 1999.

233. Salva, M. Z., Himeda, C. L., Tai, P. W., Nishiuchi, E., Gregorevic, P., Allen, J. M., Finn, E. E., Nguyen, Q. G., Blankinship, M. J., Meuse, L., Chamberlain, J. S., and Hauschka, S. D. Design of tissue-specific regulatory cassettes for high-level rAAV-mediated expression in skeletal and cardiac muscle. *Mol Ther*, 15: 320-329, 2007.
234. Xu, Z. L., Mizuguchi, H., Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mayumi, T., and Hayakawa, T. Optimization of transcriptional regulatory elements for constructing plasmid vectors. *Gene*, 272: 149-156, 2001.
235. Frauli, M., Ribault, S., Neuville, P., Auge, F., and Calenda, V. Adenoviral-mediated skeletal muscle transcriptional targeting using chimeric tissue-specific promoters. *Med Sci Monit*, 9: BR78-BR84, 2003.
236. Skarli, M., Kiri, A., Vrbova, G., Lee, C. A., and Goldspink, G. Myosin regulatory elements as vectors for gene transfer by intramuscular injection. *Gene Ther*, 5: 514-520, 1998.
237. Danko, I., Williams, P., Herweijer, H., Zhang, G., Latendresse, J. S., Bock, I., and Wolff, J. A. High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents. *Hum Mol Genet*, 6: 1435-1443, 1997.
238. Steinwaerder, D. S. and Lieber, A. Insulation from viral transcriptional regulatory elements improves inducible transgene expression from adenovirus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther*, 7: 556-567, 2000.
239. Imperiale, M. J., Hart, R. P., and Nevins, J. R. An enhancer-like element in the adenovirus E2 promoter contains sequences essential for uninduced and E1A-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82: 381-385, 1985.
240. Ptashne, M. How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, 335: 683-689, 2008.
241. Udvardy, A. Dividing the empire: boundary chromatin elements delimit the territory of enhancers. *EMBO J*, 18: 1-8, 1999.
242. Felsenfeld, G., Boyes, J., Chung, J., Clark, D., and Studitsky, V. Chromatin structure and gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 9384-9388, 1996.