HAL
open science

Mécanismes moléculaires impliqués dans l'efficacité de transduction des vecteurs AAV dans le muscle dystrophique

Julie Chassagne

To cite this version:

Julie Chassagne. Mécanismes moléculaires impliqués dans l'efficacité de transduction des vecteurs AAV dans le muscle dystrophique. Biologie moléculaire. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS514 . tel-03375648

HAL Id: tel-03375648

https://theses.hal.science/tel-03375648v1

Submitted on 13 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du vivant

U974 – Centre de Recherche en Myologie

Organisation de la cellule musculaire et thérapie de la myopathie centronucléaire dominante

Mécanismes moléculaires impliqués dans l'efficacité de transduction des vecteurs AAV dans le muscle dystrophique

Par Julie Chassagne

Thèse de doctorat de Biologie Cellulaire et Moléculaire

Dirigée par Marc Bitoun

Co-encadrée par Sofia Benkhelifa-Ziyyat

Présentée et soutenue publiquement le 11/10/2019

Devant un jury composé de :

Président :	Pr. Agbulut Onnik
Rapporteurs :	Dr Le Guiner Caroline
	Dr. Buj Bello Ana
Examinateur :	Dr. Morel Etienne
Directeur de thèse :	Dr. Bitoun Marc
Co-encadrant :	Dr. Benkhelifa-Ziyyat Sofia

A ma Maman

Remerciements

Je tiens à remercier les Docteurs Caroline Le Guiner et Ana Buj-Bello d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse et d'évaluer mon travail. Je tiens également à remercier le Professeur Onnik Agbulut d'avoir accepté de présider mon jury de thèse ainsi que le Docteur Etienne Morel pour avoir accepté d'en être l'examinateur.

Je remercie Marc Bitoun, mon directeur de thèse. Merci d'avoir accepté de diriger cette thèse en cours de route et de t'être toujours rendu disponible lorsque j'en ai eu besoin. Je te remercie pour tous les bons conseils que tu m'as donnés, pour l'avancement de mon projet comme pour la rédaction de cette thèse. C'était un plaisir et un honneur de t'avoir comme directeur de thèse. J'espère que tu penseras à moi encore longtemps en utilisant les fonctions zoom et pointeur de PowerPoint.

Je remercie Sofia Benkhelifa-Ziyyat, la co-encadrante de ma thèse. Merci de m'avoir confié ce beau projet et de m'avoir tant appris. Tu m'as toujours poussé à persévérer et à donner le meilleur de moi-même et je t'en remercie.

Je remercie Capucine Trollet, Irene Ceballos-Picot, Stéphanie Lorrain, Sophie Nicole et Emmanuèle Mouchel-Vielh pour leurs participations à mes comités de suivi de thèse. Merci pour toutes vos idées et remarques constructives sur mes travaux.

Je souhaite également remercier tous les membres des deux équipes que j'ai traversées, autant pour leur aide scientifique que pour les bons moments partagés. Je remercie plus particulièrement Bruno, merci pour ton aide précieuse avec le microscope mais aussi avec mes nombreuses quantifications d'endosomes. Nathalie, merci de m'avoir formé et de t'être autant investie sur ce projet, c'est un peu le tien aussi. Stéphane, merci pour toutes tes remarques et conseils lors des réunions qui ont beaucoup apporté à mon projet. Cécile, merci pour ton oreille attentive et pour avoir toujours pris le temps de répondre à mes nombreuses questions, quelles que soit nos équipes respectives. Jeanne, merci de m'avoir fait découvrir la microscopie électronique et pour les belles images que tu as réalisé des mes cellules. Massiré, merci d'avoir été un voisin de bureau si studieux. France, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe en tant que stagiaire puis d'avoir dirigé la première partie de ma thèse. Isa, ma première voisine de bureau, merci pour ta bonne humeur au labo et depuis.

Laura, cette thèse n'aurais pas été la même sans toi ! Ma collègue préférée et mon amie en dehors, merci pour tout ce que tu m'as appris, au labo comme dans la vie. Merci d'avoir été là et de m'avoir toujours encouragé, merci pour ton aide avec les manips, pour avoir relu mon intro et pour tes nombreuses recommandations de resto. Ton rire et tes chansons ont illuminé nombreuses de mes journées. Merci pour tout !

Marine, ma grande sœur de thèse, c'était un bonheur d'avoir partagé les paillasses du fond avec toi. Merci pour tous les conseils que tu m'as donnés.

Donia, ma super stagiaire, c'était un plaisir de t'avoir pendant 6 mois.

Merci également à tous les occupants du 105 et en particulier ceux du grand bureau du 2ème grâce à qui cette thèse s'est toujours déroulée dans la bonne humeur, je vous souhaite à tous des réussites professionnelles et personnelles. Merci également aux résidents de la salle de culture qui ont rendu les nombreuses heures passées dans cette pièce moins monotones.

Je remercie également mes amis pour leur soutient depuis toujours : Hadjila, Oriana, Mathilde, Raphaël, Jaavar, Tolga, Marion, Coline, Chloé, Rebecca (la prochaine c'est toi !!) et Victoire.

Georges, mon papa d'adoption, tu m'as toujours soutenue et c'est grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui. Merci 1000 fois. Merci aussi d'avoir relu mon manuscrit.

Mon JB, merci pour ton amour et ton soutient inégalable qui m'ont permis de traverser sereinement cette thèse. Je t'aime !

Table des matières

Remerciements 5
Liste des Abréviations 13
Liste des figures et tableaux 17
Introduction 19
Prologue 21
I. Le muscle squelettique 23
1) Structure du muscle squelettique 23
2) Différenciation et régénération musculaire 25
3) Types de fibres 26
II. Les dystrophies musculaires de Duchenne et Becker 28
1) Signes cliniques 29
2) Le gène *DMD* 30
3) Les protéines dystrophines 31
a. La Dp427 31
b. La Dp260 33
c. La Dp140 33
d. La Dp116 33
e. La Dp71 34
f. La Dp40 34
4) Conséquences de l'absence de dystrophine dans le muscle DMD 35
a. Augmentation de Ca^{2+} intracellulaire 35
b. Dérégulations des oxydes nitriques 36
c. Infiltration de fibrose et de tissu adipeux 37
d. Infiltration de cellules immunitaires 37
e. Désorganisations intracellulaires 38
5) Modèles animaux de la DMD 40
a. La souris mdx 40
b. La souris dKO 41
c. Le chien GRMD 41
d. Le rat Dmd^{mdx} 41
6) Pistes thérapeutiques pour la DMD 42
a. Traitements actuels 42
- Traitements pharmacologiques 42

- Prise en charge médicale 43

b. Traitements pharmacologiques en développement 43

- Translecture du codon stop 43
- Surexpression de l'utrophine 44

c. Thérapie cellulaire 45

d. Thérapie génique 46

- Micro-dystrophine 46
- Saut d'exon thérapeutique 48
- Edition de gène à l'aide de CRISPR-Cas9 50

III. Les virus Adéno-associés 51

1) Le virus AAV 51

a. Structure du génome AAV et sa réplication 51

b. Le cycle viral 53

c. Sérotypes et tropisme 55

2) Les vecteurs AAV 56

a. Génome 56

b. Pseudotypes et tropisme 56

c. Production 57

3) Etapes de la transduction des AAV dans les cellules 58

a. Internalisation 58

b. Transport endosomal et maturation 59

c. Import nucléaire 60

d. Synthèse du second brin et expression génique 61

4) L'AAV en thérapie génique 62

a. Thérapies actuelles 62

b. Limites des vecteurs AAV 63

- Capacité d'encapsidation 63
- Réponse immunitaire 63

5) Optimisation des vecteurs AAV en thérapie génique 65

a. Optimisation de la capside 65

- Mutations rationnelles 65
- Evolution dirigée 66

b. Vecteurs AAV auto-complémentaires 69

c. Trans-épissage 69

IV. Le système endosomal 71

1) Les différentes voies d'endocytose 71
a. Endocytose clathrine-dépendante 72
b. Endocytose clathrine-indépendante 73
- Endocytose cavéoline-dépendante 73
- Voie CLIC-GEEC 74
- Endocytose Arf6-dépendante 74
- Voie de l'IL2Rβ ou voie FEME 74
- Endocytose flotilline-dépendante 75
c. Endocytose de grosses molécules ou pathogènes 75
- Macropinocytose 75
- Phagocytose 76
2) Le transport endo-lyososomal 77
a. Déterminants moléculaires des endosomes précoces 77
b. La fusion endosomale des endosomes précoces 78
c. Voie de recyclage 79
d. Voie de dégradation 80
- Maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs 81
- Fusion des endosomes tardifs et autophagosomes avec les lysosomes 83
3) Dérégulations du système endosomal et pathologies 84
- Alzheimer et la trisomie 21 84
- Maladies lysosomales 85
- Tumeurs 86
4) Transport endosomal des vecteurs AAV et efficacité de transduction 87
Objectifs 91
Résultats 95
I. Identification des anomalies cellulaires pouvant impacter le transport du vecteur AAV8 et son expression dans le muscle DMD 97
1) Étude de l'expression du vecteur AAV8 et de son transport dans le muscle dystrophique . 97
a. Efficacité de transduction de l'AAV8 *in vitro*, dans les cellules musculaires de patients DMD 97
b. Analyse de la répartition de l'AAV8 dans les cellules musculaires DMD 98
c. Analyse de la décapsidation de l'AAV8 dans les cellules musculaires DMD 99
d. Analyse des voies endosomales empruntées par l'AAV8 dans les cellules musculaires DMD 102
2) Étude du système endosomal dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne 102

a. Analyse des endosomes précoces et tardifs dans les cellules musculaires de patients DMD 104

- Quantification des endosomes dans les cellules musculaires issues de biopsies humaines 104
- Expression de la dystrophine dans les myoblastes et myotubes humains 104
- Quantification des endosomes dans les myoblastes de deux autres myopathies 106
- Analyse morphométrique des endosomes dans les cellules musculaires issues de biopsies humaines 107

b. Analyse des endosomes précoces par microscopie électronique 107

c. Analyse des endosomes dans les fibres isolées de souris mdx 110

d. Analyse des endosomes précoces dans les coupes musculaires de patients DMD 112

e. Analyse des endosomes dans les muscles de chiens GRMD après restauration de la dystrophine 112

f. Implication de la protéine Rab5 dans l'anomalie endosomale du muscle DMD 115

g. Mesure de l'endocytose 117

h. Analyse de la maturation endo-lysosomale 117

- Analyse de la dégradation de l'EGF et de l'acidité endosomale 119
- Quantification des endosomes hybrides EEA1/CI-MPR 119

3) Matériel et méthodes 123

a. Matériel 123

b. Méthodes 124

II. Les facteurs de transcription Rfx1 et Rfx3 interagissent avec la séquence D de l'AAV et sont capables de moduler son efficacité de transduction 131

1) Contexte 131

2) Résumé 131

3) Contribution au projet 133

4) Article 133

Discussion 155

1) Identification des anomalies cellulaires pouvant impacter le transport du vecteur AAV8 et son expression dans le muscle DMD. 157

- La transduction de l'AAV8 est perturbée dans les cellules musculaires DMD 157
- Le nombre et la tailles des endosomes précoces sont plus élevés dans les cellules musculaires DMD 159
- La protéine Rab5 est surexprimée dans les cellules musculaires DMD 160
- La maturation de la voie endo-lysosomale semble altérée dans la DMD 161
- Le lien entre l'anomalie endosomale observée et l'absence de dystrophine n'a pas encore été établi 162

- Conclusion 163

2) Analyse du rôle des protéines cellulaires RFX1 et RFX3 dans la régulation de l'expression des vecteurs AAV via leur interaction avec l'ITR. 164

3) Conclusion générale 165

Références bibliographiques 167

Liste des Abréviations

AAP	*Assembly-Activating Protein*
AAV	*Adeno-Associated Virus*
AAVr	AAV recombinants
AAVS	*Adeno-associated virus integration site*
ACE	Enzyme de Conversion de l'Angiotensine
AON	Oligonucléotides Anti-sens
AP2	*Adaptor Protein 2*
APC	Cellules Présentatrices d'Antigènes
APP	*Amyloid Precursor Protein*
AQP4	Aquaporine-4
BMD	Dystrophie Musculaire de Becker
CI-MPR	*Cation Independant-Mannose 6 Phosphate Receptor*
CLIC-GEEC	*Clathrin-Independent Carriers-GPI anchored protein Enriched Endocytic Compartments*
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CREB	*Cyclic AMP Response Element-Binding protein*
DAPC	*Dystrophin-Associated Protein Complex*
DBD	Domaine de liaison au β-Dystroglycane
dKO	*Double Knock-Out*
DMD	Dystrophie Musculaire de Duchenne
EDL	*Extensor Carpi Radialis*
EEA1	*Early Endosome Antigen 1*
EGF	Facteur de croissance Epidermique
EGFR	Récepteur à l'EGF
EMA	Agence Médicale Européenne
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FAP	Progéniteurs Fibro-Adipeux
FDA	*Food and Drug Administration*
FEME	*Fast Endophilin-Mediated Endocytosis*
FGFR1	Récepteur du Facteur de Croissance des Fibroblastes
FKBP52	*52-kDa FK506-Binding Protein*
FYVE	*zinc-fingers element*
GAP	*GTPase Activating Protein*
GDF	*GDI-Displacement Factor*
GDI	*GDP Dissociation Inhibitor*
GEF	*Guanine nucleotide Exchange Factor*
GPI	*Glycosyl Phosphatidyl Inositol*

GRMD	*Golden Retriever Muscular Dystrophy Dogs*
GTP	Guanosine Triphosphate
GV	Génomes Viraux
HGFR	Récepteur du Facteur de Croissance des Hépatocytes
HOPS	*Homotypic Fusion and vacuole Protein Sorting*
IgG	Immunoglobuline G
IL	Interleukine
IL2Rβ	Récepteur β de l'Interleukine 2
iNOS	*Inductible Oxyde Synthase*
iPS	*induced Pluripotent Stem Cells*
ITR	*Inverted Terminal Repeat*
Kb	*Kilobase*
LAMP1	*Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*
LamR	*Récepteurs à la Laminine*
LGMD2	*Limb Girdle Muscular Dystrophy type 2*
Mon1-Ccz1	*Monensin Sensitivity 1 - Calcium Cafein Zinc Sensitivity 1*
MTM1	*Myotubularine 1*
MVB	Corps Multivésiculaire
Myf5	*Myogenic Factor 5*
MyoD	*Myogenic Differentiation 1*
MRF4	*Myogenic Regulatory Factor 4*
NF-κB	*Nuclear factor- κB*
NLS	*Signal de Localisation Nucléaire*
nNOS	*Neuronale Nitrique Oxyde Synthase*
NO	Oxydes Nitriques
NOX2	*NADPH oxydase 2*
NPC	*Niemann-Pick type C*
NRF	*NF-kB-repressing factor*
ORF	*Open Reading Frame*
PAR-1B	*Partitioning-defective 1b*
PAX7	*Paired box protein 7*
Pb	*Paire de base*
PI(3)K	Phosphatidylinositol-3-Kinases
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PI3K-C2α	Phosphatidylinositol 3-Kinase de Classe IIα
PMO	*Phosphoroamidate Morpholino Oligomers*
PPMO	*Peptide-Phosphoroamidate Morpholino Oligomers*
Rab11-FIP2	*Rab11 Family of Interacting Proteins 2*
RBD	*Rab-GTPase Bindind Protein*
RBE	*Rep Binding Element*
Ryr1	Récepteur à la Ryanodine

scAAV	*Self-Complementary AAV*
sgRNA	ARN guide simple brin
SMA	Amyotrophie spinale
SNARE	*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors*
snRNA	*small nuclear ARN*
ssAAV	AAV simple brin
TA	*Tibialis Anterior*
TALEN	*Transcription Activator-Like Effector Nuclease*
tcDNA	*Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides*
TFR	Récepteur à la transferrine
TGFβ1	*Transforming growth factor-beta 1*
TNFα	Facteur de Nécrose Tumorale
TRPC	*Transient receptor potential cation channels*
TRS	*Terminal Resolution Site*
WT	*Wild Type*
ZF5	*Zinc Finger 5*

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1: Anatomie du muscle strié squelettique. 23
Figure 2: Organisation des fibres du muscle strié squelettique. 24
Figure 3: Différenciation musculaire et marqueurs cellulaires des différentes étapes de la différenciation. 26
Figure 4 : Représentation de la manière dont les patients DMD s'aident de leurs bras pour se relever du sol par le Dr Gowers. 28
Figure 5 : Représentation du gène DMD et ses 79 exons. 30
Figure 6: Représentation des différentes isoformes de la dystrophine. 31
Figure 7: Représentation de la protéine Dystrophine et de ses domaines d'interactions avec les autres protéines du DAPC. 32
Figure 8: Représentation du complexe DAPC et des interactions de ses différents composants. 33
Figure 9: Histologie du muscle d'un individu sain (à gauche) et d'un patient DMD (à droite) en marquage hématoxyline et éosine. 35
Figure 10: Organisation des microtubules dans des fibres isolées de souris sauvages et mdx. 38
Figure 11: Espérance de survie moyenne des patients DMD par rapport à la population, ainsi que des modèles animaux de la DMD par rapport aux contrôles associés. 42
Figure 12: Représentation de la protéine dystrophine entière et des 3 configurations de microdystrophines actuellement utilisées en essai clinique. 47
Figure 13: Principe du traitement de la DMD par oligonucléotides anti-sens. 49
Figure 14: Représentation du génome de l'AAV. 52
Figure 15: Les régions ITR et réplication de l'ADN viral. 53
Figure 16 : Cycle viral des vecteurs AAV. 54
Figure 17: Entrée et transport intracellulaire des vecteurs AAV. 60
Figure 18: L'immunité anti-capside. 64
Figure 19: Evolution dirigée et criblages des banques de capsides AAV. 68
Figure 20: Conformation du génome des AAV auto-complémentaires. 69
Figure 21: Composition des deux transcrits permettant le trans-épissage. 70
Figure 22: Les différentes voies d'endocytose. 71
Figure 23: Endocytose clathrine-dépendante de la transferrine et protéines associées. 72
Figure 24: Endocytose cavéoline-dépendante de l'albumine et protéines associées. 73
Figure 25: Voie FEME. 75
Figure 26: La macropinocytose. 76
Figure 27: Phagocytose d'une bactérie par l'intermédiaire du récepteur Fc. 76
Figure 28: Devenir des endosomes précoces. 77
Figure 29: Rôle de la protéine EEA1 dans la fusion endosomale. 79
Figure 30: Echange des GTPases Rab5 par Rab7 médié par le complexe Mon1-Ccz1 et activation de Rab7 par le complexe HOPS. 81
Figure 31: Formation des vésicules intraluminales médiée par la machinerie ESCRT. 82
Figure 32: Interconnections des voies endolysosomales et autophagiques. 84
Figure 33: Efficacité de transduction de l'AAV8 et quantification des particules virales dans les cellules musculaires DMD humaines. 98
Figure 34: Analyse de la répartition de l'AAV8 dans les cellules musculaires. 99

Figure 35: La décapsidation de l'AAV8 est perturbée dans les cellules musculaires DMD humaines et les souris mdx. 101
Figure 36: Analyse de la localisation endosomale de l'AAV8 dans les cellules musculaires. 103
Figure 37: Le nombre d'endosomes est plus élevé dans les cellules musculaires DMD humaines. ... 105
Figure 38: La dystrophine Dp427 est exprimée dans les myoblastes issus d'individus sains. 106
Figure 39: L'anomalie endosomale semble spécifique de la pathologie DMD. 107
Figure 40: La taille moyenne des endosomes précoces est plus élevée dans les cellules musculaires DMD humaines. 108
Figure 41: Les endosomes précoces sont plus larges dans les myoblastes DMD humains. 109
Figure 42: Le nombre d'endosomes précoces est augmenté dans les myofibres de souris mdx. 111
Figure 43: Le nombre d'endosomes précoces est augmenté dans les fibres de patients DMD. 113
Figure 44: La restauration de la dystrophine chez le chien GRMD permet de diminuer le nombre d'endosomes précoces et tardifs. 115
Figure 45: Rab5 est surexprimée dans les cellules musculaires DMD humaines in vitro et dans les muscles de souris mdx. 116
Figure 46: Le traitement des cellules DMD avec un siRNA Rab5 rétablit le nombre et la taille des endosomes à un niveau équivalent à celui des cellules contrôles. 116
Figure 47: L'endocytose est réduite dans les myoblastes DMD humains. 118
Figure 48: La dégradation de l'EGF et l'acidité endosomale sont perturbées dans les myoblastes DMD humains. 120
Figure 49: Le pourcentage d'endosomes hybrides EEA1/CI-MPR est plus important dans les myoblastes DMD. 121
Figure 50: LAMP1, un marqueur lysosomal est moins exprimé dans les cellules musculaires DMD. 121

Liste des tableaux

Tableau 1: Récepteurs et co-récepteurs des différents sérotypes d'AAV. 55
Tableau 2: Tropismes identifiés des différents vecteurs AAV 57

Introduction

Prologue

La dystrophie musculaire de Duchenne est une maladie génétique grave causant une dégénérescence musculaire sévère. Cette maladie est causée par des mutations dans le gène *DMD* provoquant l'absence de la protéine dystrophine. L'une des thérapies les plus prometteuses pour le traitement de la DMD est basée sur les vecteurs dérivés des virus adéno-associés (AAV) pour l'expression d'une isoforme plus courte de la dystrophine. Malgré l'efficacité bien établie de l'AAV de sérotype 8 (AAV8) pour le transfert de gènes dans le muscle, de fortes doses de vecteurs sont nécessaires pour obtenir une efficacité thérapeutique dans des modèles animaux de la DMD. Pour comprendre cette limitation, mon équipe a comme objectif d'étudier les mécanismes qui peuvent limiter l'efficacité de transduction du vecteur AAV8 dans le muscle dystrophique.

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps au devenir du vecteur AAV8 dans les cellules musculaires DMD. Nous avons ensuite caractérisé le système endosomal, essentiel à la transduction des vecteurs AAV, dans les cellules de patients DMD mais également dans plusieurs modèles animaux de cette pathologie.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés au rôle des protéines cellulaires RFX1 et RFX3 dans la régulation de l'expression des vecteurs AAV *via* leur interaction avec l'ITR.

Ce manuscrit de thèse a été écrit en 3 parties : une introduction contenant une synthèse des connaissances sur le muscle squelettique, la dystrophie musculaire de Duchenne, les vecteurs AAV et le système endosomal, les résultats obtenus ont ensuite été présentés puis discutés dans une dernière partie où les perspectives de ce travail ont également été abordées.

I. Le muscle squelettique

Le tissu musculaire, capable de contraction, est réparti en trois grandes catégories :

- Le tissu musculaire lisse, formé par des léiomyocytes, compose les parois des vaisseaux et des viscères. Il se contracte de manière involontaire.
- Le tissu musculaire cardiaque, formé par les cardiomyocytes, se trouve uniquement au niveau du myocarde. Il se caractérise par sa contraction rythmique involontaire.
- Le tissu musculaire squelettique, présent dans tous les muscles locomoteurs, se contracte de manière volontaire. Nous allons le décrire davantage ci-dessous.

1) Structure du muscle squelettique

Le muscle squelettique est un organe strié à contraction volontaire. Chaque muscle est inséré sur l'os par l'intermédiaire de tendons constitués essentiellement de tissus fibreux. Le muscle squelettique est composé de fibres musculaires qui sont entourées d'un tissu conjonctif appelé endomysium (Figure 1). Une autre couche de tissu conjonctif, appelée périmysium, assemble les fibres en faisceaux. Enfin, une troisième couche de tissus conjonctif, appelée épimysium, recouvre l'ensemble du muscle. Les moto-neurones traversent les 3 couches de tissus conjonctifs pour innerver chaque fibre par l'intermédiaire

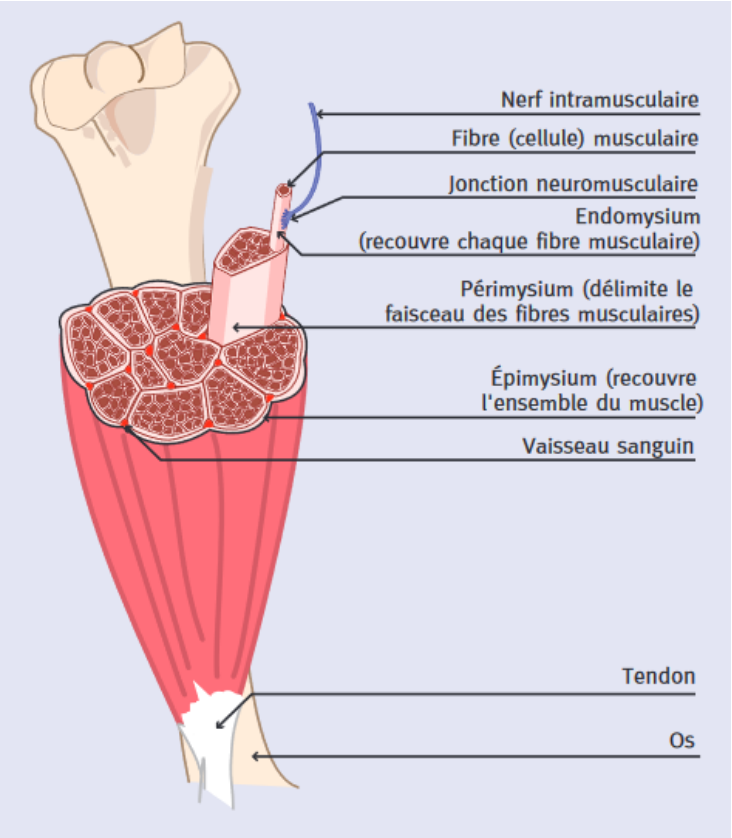


Figure 1: Anatomie du muscle strié squelettique.
Le muscle squelettique est composé de fibres musculaires recouvertes par 3 membranes successives : l'endomysium recouvre chaque fibre, le périmysium délimite les fibres en faisceau et l'épimysium recouvre l'ensemble du muscle. AFM Téléthon

d'une jonction neuromusculaire. Également présents dans le muscle, les vaisseaux sanguins s'organisent en un fin réseau de capillaires, permettant de vasculariser chaque fibre.

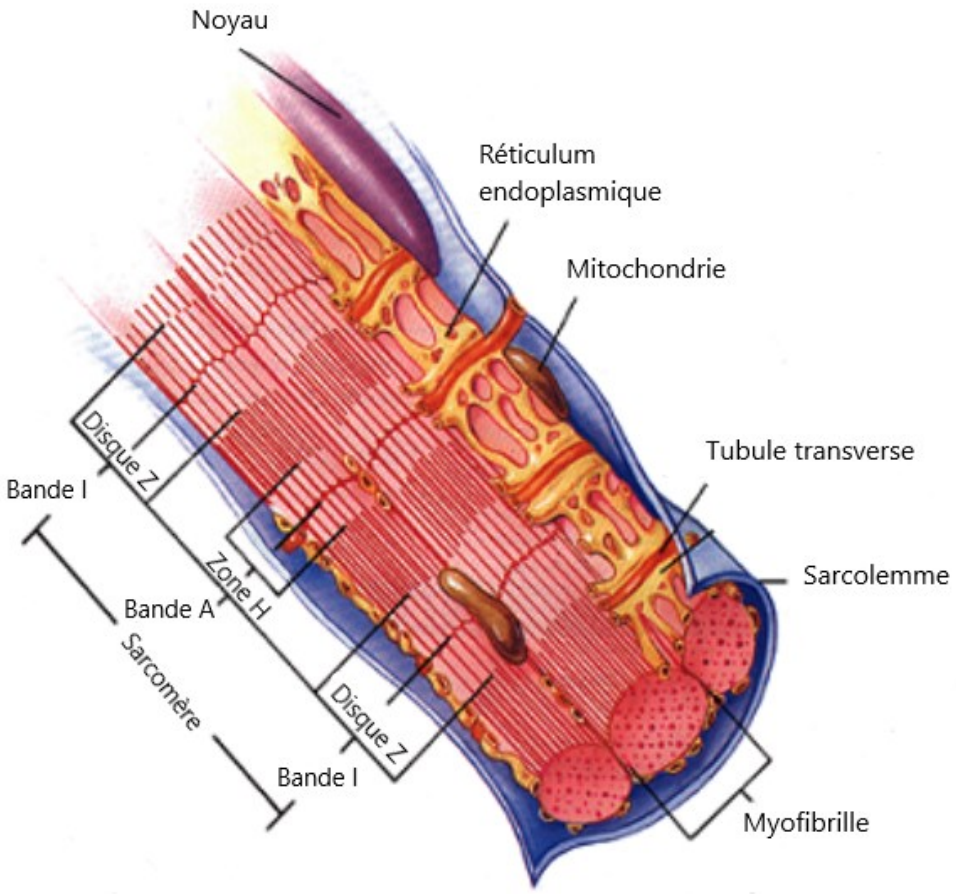


Figure 2: Organisation des fibres du muscle strié squelettique.
Les fibres musculaires sont délimitées par leur membrane appelée sarcolemme, qui présente de fines invaginations appelées tubule transverse. Les fibres musculaires possèdent dans leur sarcoplasme, une répétition de sarcomères qui sont les unités contractiles présentant une alternance de bandes claires (bandes I) et de bandes foncées (bande H). Chaque bande I est coupée en son milieu par une strie Z plus foncée. C'est la région comprise entre deux stries Z successives qui représente un sarcomère. (Tortura and Grabowski 1994)

Chaque fibre musculaire est délimitée par sa membrane appelée sarcolemme. Le sarcolemme présente de fines invaginations appelées tubule T, qui sont réparties de long de la fibre (Figure 2). Le réticulum sarcoplasmique, entoure le tubule T pour former la triade, une structure qui permet le passage du signal nerveux et la libération du calcium nécessaire à la contraction. Le cytoplasme des fibres musculaires, appelé sarcoplasme, contient des myofibrilles, qui sont les éléments contractiles. Ces myofibrilles sont organisées en une répétition de sarcomères qui sont les unités fonctionnelles du muscle lui donnant son aspect strié au microscope électronique, avec une alternance de bandes claires (bandes I) et foncées (bandes A) (Figure

2). Chaque bande I est coupée en son milieu par une zone plus foncée appelée strie Z. C'est la région comprise entre deux stries Z successives qui représente un sarcomère. Au niveau de cette strie Z se trouve une structure protéique sub-sarcolemale appelée costamère, qui relie les unités contractiles au sarcolemme. De nombreuses protéines impliquées dans les myopathies, dont la dystrophine, sont présentes au niveau des costamères. Au niveau moléculaire, les sarcomères sont principalement composés d'une association de filaments d'actine (bande I) et de myosine (bande A). C'est le glissement des filaments les uns sur les autres qui donne la contraction musculaire.

2) Différenciation et régénération musculaire

Les cellules souches musculaires appelées cellules satellites sont présentes de manière quiescente dans le muscle, entre les fibres musculaires et la lame basale. Elles sont caractérisées par l'expression de la protéine PAX7 (paired box protein 7) (Figure 3) (Tidball et al. 2014). En réponse à un stimulus extérieur, les cellules satellites s'activent et expriment la protéine myogenic differentiation 1 (MyoD) (Zammit et al. 2004). Les cellules souches activées ont une forte capacité de prolifération. Une partie de ces cellules va inhiber l'expression de MyoD et retourner à un état quiescent pour maintenir le pool de cellules satellites tandis que l'autre partie va quitter le cycle cellulaire et activer l'expression de myogénine pour se différencier en myocytes. Les myocytes vont ensuite fusionner entre eux pour former des myotubes plurinuclées (Abmayr and Pavlath 2012). A ce stade, les cellules expriment les facteurs de différenciation myogénine et myogenic regulatory factor 4 (MRF4). Suite à la fusion des myocytes, les noyaux des myotubes se regroupent au centre des cellules. Au cours de la différenciation, ces noyaux s'alignent et se dispersent le long du myotube puis migrent vers la périphérie des cellules (Cadot et al. 2015). La présence de noyaux centraux dans les fibres musculaires d'un muscle mature est un marqueur de régénération musculaire normale ou pathologique, mais leur présence est également retrouvée dans des myopathies en absence de régénération comme la myopathie centronucléaire.

Le muscle squelettique possède une grande capacité de régénération. Suite à une lésion musculaire, l'inflammation se met en place. Les cellules neutrophiles vont envahir le muscle abimé, remplacées ensuite par les macrophages phagocytaires (M1) puis par les macrophages non phagocytaires (M2) (Tidball and Villalta 2010). Ces cellules vont avoir pour rôle de

dégrader les débris cellulaires mais également d'activer les cellules satellites grâce à la sécrétion de cytokines dont le Facteur de Nécrose Tumorale α (TNFα) et les Interleukines IL-6 et IL-1 (Tidball and Villalta 2010). Ces cytokines induisent l'expression des facteurs de transcription MyoD et Myogenic Factor 5 (Myf5) par les cellules satellites, enclenchant leur activation et leur prolifération en un grand nombre de cellules myogéniques (Tidball and Villalta 2010). Elles vont également induire l'expression de myogénine, qui permettra ensuite la fusion cellulaire afin de former des myotubes. Les myoblastes nouvellement formés fusionnent ensuite, soit avec les fibres endommagées pour réparer la lésion, soit entre eux pour créer de nouvelles fibres musculaires.

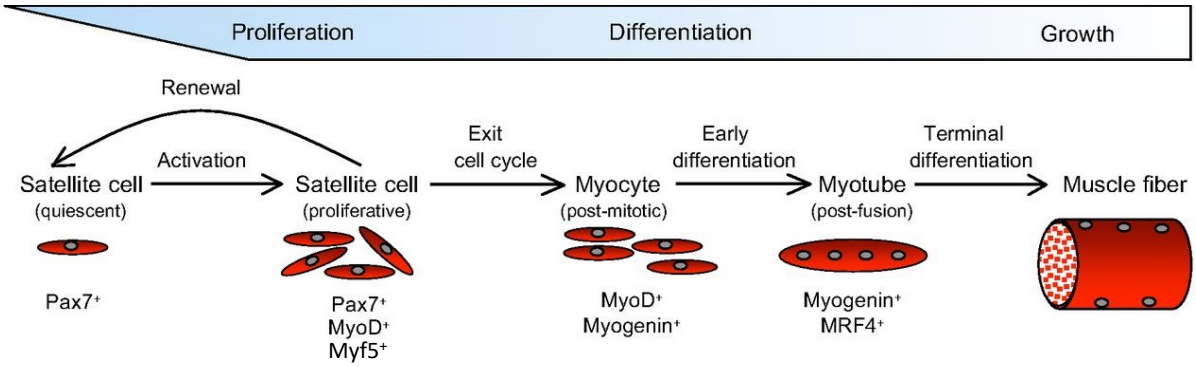


Figure 3: Différenciation musculaire et marqueurs cellulaires des différentes étapes de la différenciation.
Les cellules satellites, caractérisées par l'expression de Pax7, ont la capacité de s'auto-renouveler ou de s'activer, et sont alors caractérisées par l'expression des protéines MyoD, Myf5 et Pax7. Les cellules satellites activées peuvent sortir du cycle cellulaire pour devenir des myocytes, caractérisés par l'expression des protéines MyoD et Myogénine. Les myocytes peuvent fusionner et se différencier en myotubes, alors caractérisés par l'expression des protéines Myogénine et MRF4, puis devenir des fibres musculaires, dont les noyaux sont localisés à la périphérie. Adapté de Tidball et al. 2014

3) Types de fibres

Le muscle squelettique est composé de 3 types de fibres musculaires, dont le pourcentage varie selon le muscle et l'individu (Schiaffino 2010).

Les fibres de type I ou à contraction lente sont des fibres de petit diamètre qui sont très vascularisées. Ces fibres contiennent de nombreuses mitochondries et peu de glycogène. Leur métabolisme est oxydatif. Elles sont essentiellement utilisées pour des exercices peu puissants et prolongés comme le maintien de la posture (Rivera-Brown and Frontera 2012; Schiaffino 2010).

Les fibres de type IIb ou à contraction rapide sont de plus grand diamètre et peu vascularisées. Contrairement aux fibres de type I, elles sont pauvres en mitochondries et riches en glycogène. Leur métabolisme est glycolytique. Ces fibres sont très fatigables mais très puissantes et sollicitées lors d'exercices brefs mais intenses.

Les fibres de type IIa, sont des fibres intermédiaires. Elles ont un diamètre moyen et leur métabolisme est oxydatif et glycolytique. Elles sont utilisées pour des exercices d'intensité modérée.

Le rapport fibres lentes/fibres rapides peut évoluer en fonction de l'entrainement sportif. Un entrainement d'endurance pourra faire évoluer les fibres IIa vers des fibres lentes. Au contraire un entrainement plus court mais intense fera évoluer les fibres IIa vers des fibres rapides.

L'identification des différents types de fibres sur une coupe musculaire peut se faire par immunofluorescence en marquant les différents isoformes de myosines. La chaine lourde 1β de la myosine est utilisée pour marquer les fibres de type I, la chaine lourde 2a pour marquer les fibres de type IIa et la chaine lourde 2b pour marquer les fibres de types IIB (Canepari et al. 2010).

II. Les dystrophies musculaires de Duchenne et Becker

Les Dystrophies Musculaires de Duchenne (DMD) et Becker (BMD) sont des maladies génétiques causées par des mutations du gène *DMD* situé sur le chromosome X et codant la dystrophine, une protéine située sur la face cytoplasmique de la membrane des cellules musculaires. La DMD est caractérisée par une absence totale de dystrophine, tandis que la BMD résulte d'une absence partielle de la dystrophine, ou de la présence d'une dystrophine moins fonctionnelle. La DMD touche un garçon sur 3300 à la naissance en Europe et la BMD un garçon sur 18 000 à 31 000 (OrphaNet 2019).

La DMD a été décrite pour la première fois par le Dr Guillaume Duchenne de Boulogne en 1868 (Duchenne GBA. *Recherches sur la paralysie musculaire pseudohypertrophique ou paralysie myo-sclerosique*) où il décrivit une maladie entrainant une faiblesse progressive des membres inférieurs accompagnée par leur hypertrophie puis atrophie. Le Dr Gowers a également décrit de nombreux cas de la maladie et donna son nom à un signe caractéristique de la DMD, le signe de Gowers (Figure 4), correspondant à la manière dont les patients s'aident de leur bras pour se relever du sol (Gowers 1879). Il décrivit aussi un faible taux de femmes atteintes et une transmission qui se fait de la mère au fils. Ce mode de transmission, aujourd'hui connu, correspond à celui des maladies génétiques récessives liées au chromosome X.

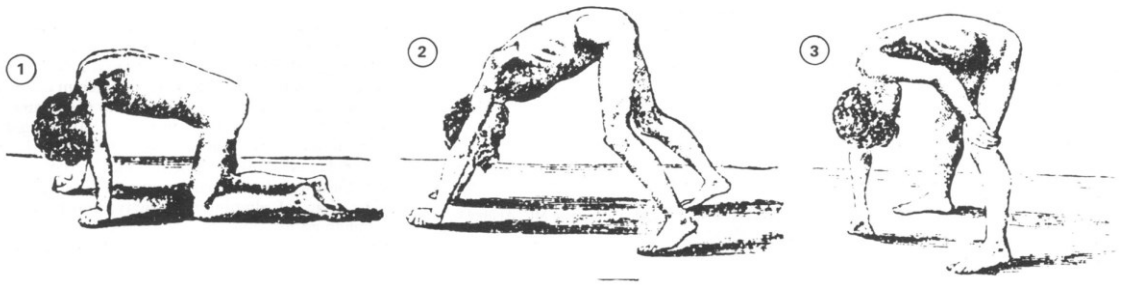


Figure 4 : Représentation de la manière dont les patients DMD s'aident de leurs bras pour se relever du sol par le Dr Gowers.
W.R Gowers, 1879

1) Signes cliniques

La DMD se manifeste vers l'âge de 3 à 5 ans par un déficit locomoteur entrainant des chutes fréquentes et des difficultés à se relever du sol. On peut également observer un retard global de développement locomoteur et un taux élevé de créatine kinase ou des transaminases hépatiques dans le sang. Les enfants présentent une hypertrophie des mollets. La faiblesse musculaire touche d'abord les muscles inférieurs, entrainant des difficultés à courir et monter les escaliers. La perte de la marche survient en moyenne à l'âge de 9 ans. Elle touche ensuite les muscles des épaules et des bras, puis les muscles de la posture, entrainant une forte scoliose (Yiu and Kornberg 2015). Les muscles respiratoires sont également atteints au cours de l'adolescence (Waldrop and Flanigan 2019), ce qui est accentué par la déformation de la colonne vertébrale. L'atteinte cardiaque est l'une des complications majeures de la maladie. Enfin, on observe une atteinte des muscles du tube digestif associée à des troubles du transit intestinal, accentuée par l'immobilisation et le manque de verticalisation. Certains patients présentent également un retard de langage, des troubles appartenant au spectre de l'autisme, un défaut d'attention et environ un tiers des patients ont un QI inférieur à 70 (Banihani et al. 2015). L'espérance de vie est de 20 à 30 ans et les malades décèdent généralement d'un arrêt respiratoire ou cardiaque.

La BMD provoque une atteinte musculaire moins sévère et un phénotype variable entre les patients. L'atteinte musculaire se fait dans le même ordre d'apparition que pour la DMD mais elle est plus tardive. Une faiblesse du *quadriceps femoris* peut être le seul signe de la maladie. Lors de l'activité physique, les crampes et contractures sont fréquentes. Enfin, la perte de la marche survient généralement après l'âge de 16 ans et certains individus sont encore ambulants après 30 ou 40 ans (Darras et al. 2000).

Le diagnostic des deux formes de la maladie se fait grâce aux signes cliniques cités plus haut, par un taux élevé de créatine kinase dans le sang, un marquage anormal de la dystrophine sur des biopsies musculaires et enfin un test génétique afin d'identifier la mutation (Waldrop and Flanigan 2019).

2) Le gène *DMD*

Le gène *DMD*, découvert en 1986 (Monaco et al. 1986), code la protéine dystrophine (Hoffman et al. 1987). Ce gène est localisé sur le chromosome X, au locus Xp21. Sa présence sur le chromosome X explique que la DMD touche très majoritairement des hommes, même si de rares cas de femmes atteintes de DMD ont été recensés. Les cas de femmes atteintes ont pour cause une activation non aléatoire du chromosome X, un seul chromosome X (syndrome de Turner), une disomie uniparentale du chromosome X ou hétérozygotie composite de deux variants du gène *DMD* (Darras et al. 2000).

Le gène *DMD* est le plus grand du génome humain avec 2,6 millions de paires de bases et 79 exons (Figure 5). Les mutations à l'origine de la DMD sont des mutations non-sens ou provoquant un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop prématuré. Pour la DMD, 68% des mutations sont de larges délétions (supérieures à un exon), 11% de larges duplications (supérieures à un exon), 11% sont des mutations ponctuelles, 5% des petites délétions (inférieures à un exon), 3% des mutations affectant les sites d'épissage et 2% sont des petites insertions (inférieures à un exon) (TREAT-NMD DMD Global database). L'un des « hot-spot » de mutations se situe entre les exons 45 et 55 et comprend 66% des larges délétions et 15% des larges duplications.

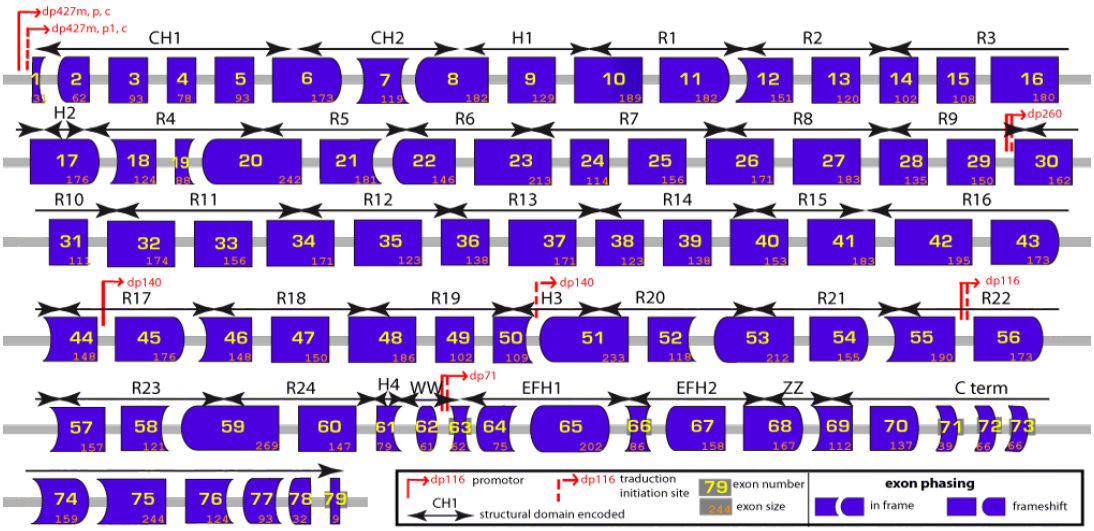


Figure 5 : Représentation du gène DMD et ses 79 exons.

Les flèches rouges représentent les promoteurs spécifiques des différents isoformes. En noir sont représentés les différents domaines de la protéine : CH1 et CH2 (Calponin Homology) correspondent au domaine de liaison à l'actine, H1, 2, 3 et 4 représentent les ponts riches en proline, R1 à 24 représentent les 24 répétitions de spectrine, EFH1 et 2 (EF-hand-like) représentent le domaine riche en cystéines et C term représente le domaine C-terminal (Provient de edystrophin.genouest.org).

3) Les protéines dystrophines

Le gène *DMD* code plusieurs isoformes de la dystrophine nommées par leur poids moléculaires (Dp427, Dp260, Dp140, Dp116, Dp71 et Dp40) résultant de promoteurs alternatifs (Figure 6).

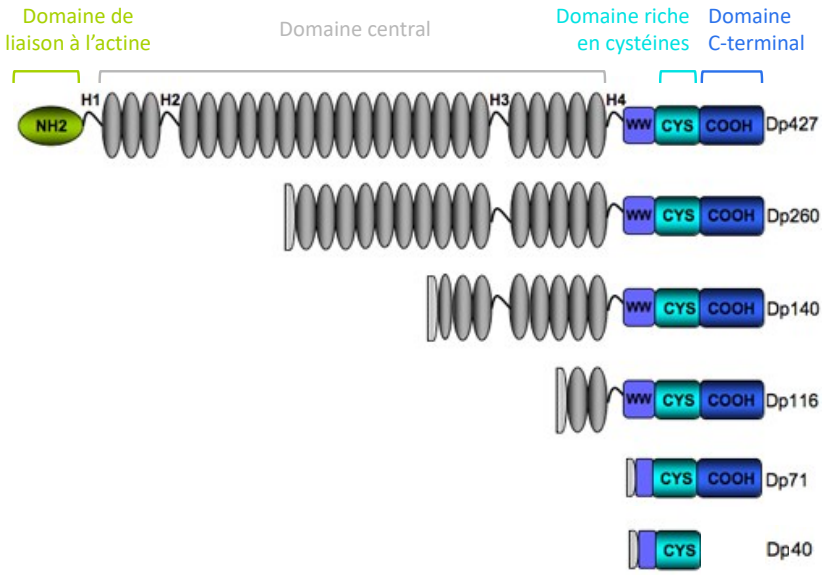


Figure 6: Représentation des différentes isoformes de la dystrophine.
Excepté la Dp40, toutes les isoformes de la dystrophine contiennent le domaine riche en cystéine (en bleu clair) et le domaine C-terminal (en bleu foncé). La taille du domaine central et le nombre de répétitions de spectrines (en gris) varie entre les isoformes allant de 24 pour la Dp427 à aucune pour les Dp71 et Dp40. Enfin, seule la Dp427 contient le domaine N-terminal de liaison à l'actine (en vert). Adapté de www.umd.be/DMD/W_DMD/protein_FR.html

a. La Dp427

Les trois isoformes de la Dp427 sont issues de la transcription des 79 exons à partir de 3 promoteurs distincts et comportent chacune un exon 1 spécifique. Il s'agit de la Dp427m exprimée majoritairement dans le muscle strié mais aussi dans les cellules gliales, la Dp427c exprimée dans l'hippocampe et les neurones corticaux (Chelly et al. 1990) et enfin la Dp427p exprimée dans les cellules de Purkinje du cervelet (Holder et al. 1996).

La Dp427m est la principale isoforme musculaire de la dystrophine. Exprimée majoritairement dans le muscle, elle est localisée sur la face interne du sarcolemme. C'est une protéine de 427 kDa composée de 4 domaines principaux : un domaine N-terminal de liaison à l'actine, une région centrale, un domaine riche en cystéines et un domaine C-terminal (Allen et al. 2016) (Figure 7). Le domaine de liaison à l'actine (ADB) permet la liaison avec l'actine filamentaire

(Way et al. 1992) mais aussi la liaison aux filaments intermédiaires contenant de la kératine 19 (Stone et al. 2005). Le domaine central est composé de 24 répétitions de spectrines, interrompues en 4 points par des séquences riches en prolines permettant de donner une flexibilité à la protéine. Ce domaine central comporte deux sites de fixation aux lipides membranaires, LBD1 et LBD2 (Legardinier et al. 2009), un site de fixation à la protéine Partitioning-defective 1b (PAR-1B) (Yamashita et al. 2010), des sites de liaison de faible affinité à l'actine, un site de fixation aux microtubules (Prins et al. 2009), un site de fixation à la synémine (Bhosle et al. 2006), permettant de lier les filaments intermédiaires, ainsi qu'un site de fixation à la Neuronale Nitrique Oxyde Synthase (nNOS) (Lai et al. 2009). Le domaine riche en cystéines possède un site de fixation au β-dystroglycane (DBD) qui par sa liaison à l'α-dystroglycane permet l'interaction avec la matrice extracellulaire via la laminine (Figure 8) et un site de fixation à l'ankyrine B (AnkB) qui permet la liaison au sarcomère par l'intermédiaire de l'obscurine (Randazzo et al. 2013). Enfin, la région C-terminale possède des sites de fixation aux syntrophines (SBS) (Newey et al. 2000), qui lient également nNOS et sont essentielles à sa localisation sarcolemmale, et un site de fixation à la dystrobrevine (Sadoulet-Puccio et al. 1997) qui interagit avec les sarcoglycanes α, β, ɣ et δ et la dysbindine. Les sarcoglycanes, par l'intermédiaire du biglycane, lie un autre composant de la matrice extracellulaire, le collagène VI. L'ensemble de ces protéines membranaires forment le Dystrophin-associated protein complex (DAPC, Figure 8) qui permet de faire le lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette ainsi que la protection et stabilisation structurale du sarcolemme au cours de la contraction musculaire.

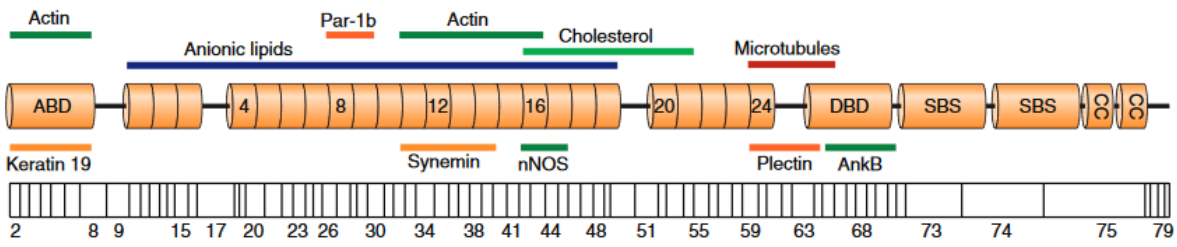


Figure 7: Représentation de la protéine Dystrophine et de ses domaines d'interactions avec les autres protéines du DAPC.

ABD: Domaine de liaison à l'actine; DBD: Domaine de liaison au β-Dystroglycane; SBS: Domaine de liaison à la syntrophine; CC: Domaine en hélice α permettant la liaison à la α-dystrobrevine. Les nombres indiqués sur la protéine représentée en orange correspondent aux numéros de répétitions de spectrines. Les numéros indiqués en noir sous la représentation du gène DMD correspondent aux numéros des exons. Allen et al. 2016

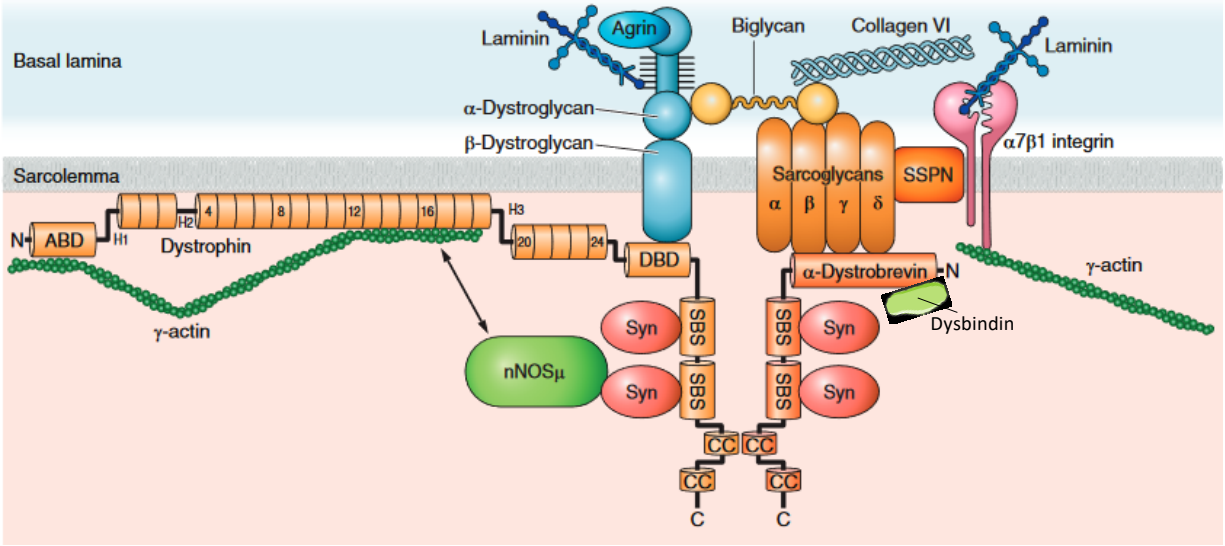


Figure 8: Représentation du complexe DAPC et des interactions de ses différents composants.
ABD : Domaine de liaison à l'actine ; DBD : Domaine de liaison au β-Dystroglycane ; SBS: Domaine de liaison à la syntrophine; CC: Domaine en hélice α permettant la liaison à la α-dystrobrevine ; Syn : syntrophine ; SSPN : Sarcospane. Adapté de Allen et al., 2016

b. La Dp260

La Dp260, démarrant à l'exon 30, est exprimée au niveau de la couche plexiforme externe de la rétine (D'Souza et al. 1995). Son absence provoque des anomalies de la neurotransmission. Elle a aussi été mise en évidence dans le cerveau et les intestins (Tokarz et al. 1998).

c. La Dp140

La Dp140, démarrant à l'exon 45, est exprimée dans les cellules gliales du système nerveux central. Il existe des corrélations entre l'absence de la protéine Dp140 chez les patients DMD et la présence de problèmes cognitifs (Chamova et al. 2013). Elle semble être principalement exprimée au stade fœtal (Morris et al. 1995).

d. La Dp116

La Dp116, démarrant à l'exon 56, est exprimée dans le nerf périphérique au niveau des cellules de Schwann (Byers et al. 1993) où elle permet la formation d'un complexe DAPC (Matsuo et al. 2017). Son expression dans la souris dKO, un modèle animal de la DMD (*voir II)5)b) La souris*

dKO), permet une augmentation de la survie et la restauration de la masse musculaire et de la force mais ne permet pas d'améliorer l'histopathologie du muscle ou d'arrêter les cycles de nécrose et régénération (Judge et al. 2011).

e. La Dp71

La Dp71, démarrant à l'exon 63, est une protéine ubiquitaire. Cette protéine ne contient pas le domaine C-terminal de liaison à l'actine ni le domaine central mais possède une séquence N-terminale unique permettant de créer un nouveau site de fixation à l'actine (Tadayoni et al. 2012). Dans les cellules musculaires, la Dp71 est exprimée au cours de la myogenèse et participe au remodelage du cytosquelette (Howard et al. 1999). Dans les fibres musculaires matures, son expression est abolie afin de permettre à la Dp427 d'être le produit principal du gène *DMD* et d'éviter la compétition entre les deux isoformes pour les sites de liaisons avec les protéines du DAPC. Il a en effet été montré que la surexpression transgénique de la Dp71 dans une souris saine entraine l'apparition d'un phénotype dystrophique (Leibovitz et al. 2002). La Dp71 est aussi le produit majeur des dystrophines dans le système nerveux central où elle est exprimée dans les neurones et les cellules gliales. Elle y participe à la formation du complexe DAPC qui permet le maintien des protéines impliquées dans la stabilisation de la membrane et les signaux transmembranaires. De plus, la perte congénitale de la Dp71 provoque une altération de l'organisation et de la maturation des synapses (Tadayoni et al. 2012). Dans les cellules de Müller de la rétine, la Dp71 interagit avec des protéines du DAPC mais aussi les canaux aquaporin-4 (AQP4) et rectifying potassium channels (Kir4.1) et son absence dans un modèle murin n'exprimant pas la Dp71, provoque une altération de leur distribution dans les cellules de Müller (Fort et al. 2008). La Dp71 joue aussi un rôle dans la division cellulaire, où elle permet la liaison entre le β-dystroglycane et la lamine B1 aux pôles des fuseaux mitotiques (Villarreal-Silva et al. 2011).

f. La Dp40

La Dp40 possède la même séquence N-terminale que la Dp71 mais a un codon stop au niveau de l'exon 69 et ne possède donc pas la région C-terminale commune à toutes les autres isoformes de la dystrophine. Elle est exprimée dans les neurones de l'hippocampe et semble

être impliquée dans les fonctions synaptiques et dentritiques mais reste pour le moment peu connue (Fujimoto et al. 2014; Tozawa et al. 2012).

4) Conséquences de l'absence de dystrophine dans le muscle DMD

Dans les cellules musculaires, l'absence de dystrophine provoque une disparition du DAPC causant la fragilité des fibres musculaires. Ces fibres subissent des cycles de nécrose (c'est-à-dire leur dégénérescence prématurée) et régénération entrainant l'apparition de noyaux centraux (alors qu'ils sont normalement situés à la périphérie des fibres) et une grande hétérogénéité de taille entre les fibres. À terme, le pool de cellules souches s'atténue et les fibres musculaires sont remplacées par du tissu adipeux ou fibreux (Figure 9).

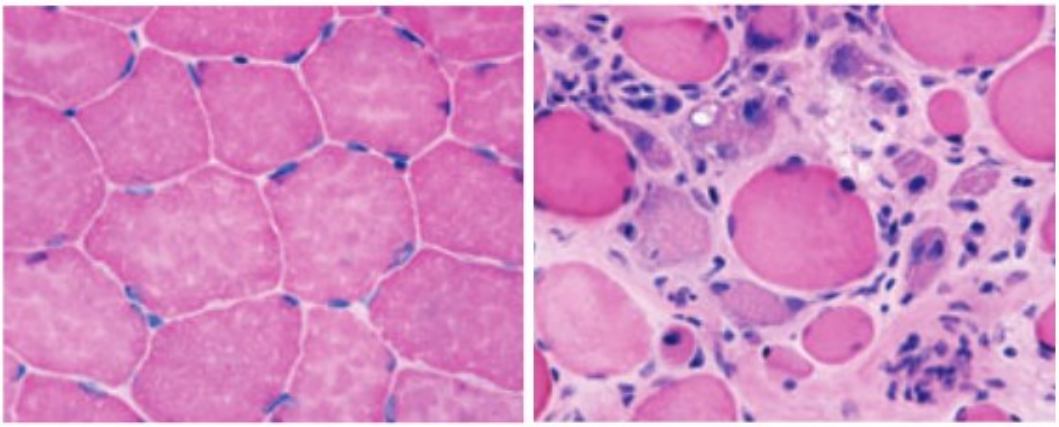


Figure 9: Histologie du muscle d'un individu sain (à gauche) et d'un patient DMD (à droite) en marquage hématoxyline et éosine.
Sur la coupe du muscle sain, on peut observer que les fibres sont de tailles homogènes et jointives. Sur la coupe du muscle DMD, les fibres sont de taille hétérogène et on observe l'infiltration de cellules mononucléées (noyaux en violet) ainsi que la fibrose présente entre les fibres. McGreevy, 2015

a. Augmentation de Ca^{2+} intracellulaire

Le Ca^{2+} est nécessaire au couplage excitation-contraction mais sert également de molécule de signalisation. Afin de permettre la contraction musculaire, le calcium est stocké dans le réticulum sarcoplasmique pour pouvoir être relargué rapidement dans le sarcoplasme en réponse à un signal nerveux. La concentration basale de calcium dans les fibres musculaires DMD est beaucoup plus élevée que dans les fibres musculaires saines. Cette concentration élevée est liée à des dérégulations des canaux calciques. En effet, une augmentation de l'activité des canaux calciques a été montrée dans les biopsies humaines de patients DMD et

dans les fibres musculaires de souris mdx, un modèle animal de la DMD (Fong et al. 1990). Plus récemment il a été montré que les canaux calciques appartenant à la famille TRPC (Transient receptor potential cation channels) sont également responsables de l'élévation du Ca^{2+} (Vandebrouck et al. 2002) et que la surexpression seule du canal calcique TRPC3 suffit à induire une dystrophie musculaire chez la souris mdx (Millay et al. 2009). En plus le récepteur à la ryanodine (Ryr1), un canal calcique du réticulum sarcoplasmique responsable du relargage du calcium dans le cytoplasme, est hypernitrosylé dans les cellules musculaires DMD. La nitrosylation de Ryr1, prive le complexe Ryr1 de sa sous-unité stabilisatrice, la calstabine, ce qui le déstabilise et rend le canal calcique fuyant (Aracena et al. 2005; Bellinger et al. 2009). Le Ca^{2+} normalement localisé dans le réticulum sarcoplasmique se retrouve alors dans le cytoplasme. Chez le chien GRMD, un modèle animal de la DMD (*voir II) 5) c) Le chien GRMD*), la restauration de la dystrophine permet la diminution de la nitrosylation de Ryr1 et la stabilisation du complexe Ryr1 avec la calstabine (Gentil et al. 2016).

L'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire provoque une augmentation de la protéolyse par l'activation de la calpaïne (Alderton and Steinhardt, 2000), une activation de la voie NF-κB (Nuclear factor-κB) entrainant l'expression de la iNOS (Inducible Nitric-oxide Synthase) (Altamirano et al. 2012) et une accumulation du Ca^{2+} mitochondrial (Gaglianone et al. 2019) qui provoque un relargage de cytochrome C et donc l'apoptose des cellules (Basset et al. 2006).

b. Dérégulations des oxydes nitriques

Les oxydes nitriques (NO) sont des molécules de signalisations importantes dans les cellules musculaires et sont produits par des enzymes appelées Nitrique Oxyde Synthase (NOS). Dans le muscle, le NO régule l'internalisation du glucose, la vasodilatation des vaisseaux lors de la contraction musculaire, le maintien de la fonction mitochondriale et module le couplage excitation-contraction en agissant sur Ryr1. Dans les cellules musculaires DMD, une augmentation de la concentration d'oxyde nitrique cytoplasmique est observée. Cette augmentation est due à deux mécanismes : la délocalisation de la nNOS qui, normalement située au niveau du sarcolemme grâce à sa liaison à la dystrophine, se retrouve au niveau cytoplasmique et va y produire du NO (Kobayashi et al. 2008) et l'activation de la iNOS par la voie NF-κB (Adams et al. 2002; Altamirano et al. 2012) qui est elle-même activée par

l'augmentation du Ca^{2+} dans les fibres musculaires DMD. Chez le chien GRMD, la restauration de la dystrophine permet la relocalisation de la nNOS au sarcolemme, la diminution de l'expression de la iNOS et la diminution du NO cytosolique (Gentil et al. 2016).

c. Infiltration de fibrose et de tissu adipeux

La fibrose correspond au remplacement d'un tissu ou d'un organe par un tissu fibreux tel que le tissu conjonctif. Dans la DMD, le tissu musculaire est en partie remplacé par du tissu fibreux et adipeux lors de la régénération. L'apparition de fibrose est en partie due à la cytokine Transforming growth factor-beta 1 (TGFβ1) qui joue un rôle dans l'inhibition de l'inflammation et la promotion de la réparation tissulaire et de la fibrose. En effet, cette cytokine est surexprimée dans le muscle des patients DMD et des souris mdx (Ishitobi et al. 2000; Zhou et al. 2006) et l'injection intramusculaire de myoblastes surexprimant TGFβ1 entraine l'apparition de fibrose et la différenciation de cellules myogéniques en cellules myofibroblastiques (Li et al. 2004). La myostatine, également surexprimée dans les cellules musculaires issues de patients DMD (Zanotti et al. 2007), joue aussi un rôle dans la promotion de la fibrose. En effet, elle stimule la production de matrice extracellulaire et la prolifération des fibroblastes (Li et al. 2008). Son inhibition dans le muscle des souris mdx provoque une diminution de la fibrose et une augmentation de la masse et de la force musculaire (Wagner et al. 2002). Le tissu adipeux et fibreux provient d'une population de progéniteurs fibro-adipeux (FAPs) résidents entre les fibres musculaires (Joe et al. 2010). Dans le cas d'une blessure, les FAPs prolifèrent et interagissent avec les myoblastes pour la promotion de la régénération puis retournent à un état indifférencié. Lors d'une dégénérescence musculaire comme dans la DMD, les FAPs prolifèrent et se différencient pour former un tissu fibro-adipeux (Rodeheffer 2010).

d. Infiltration de cellules immunitaires

Les muscles DMD sont infiltrés de cellules immunitaires, à l'origine d'un mécanisme inflammatoire aggravant la pathologie. Les principales cellules présentent dans le muscle dystrophique sont les lymphocytes T CD4 et CD8, les macrophages et les mastocytes (Kastenschmidt et al. 2018). Les lymphocytes T sont responsables de la lyse des cellules

musculaires par la production de perforine, une enzyme cytolytique, et de Fas-L, une protéine provoquant l'apoptose des cellules lors de sa liaison à son récepteur FAS. Ainsi, la déplétion des lymphocytes CD4 et CD8 par anticorps permet l'amélioration du phénotype dystrophique (Spencer et al. 2001). Les mastocytes participent à la nécrose musculaire par la libération de leurs granules (Gorospe et al. 1994). Deux populations de macrophages sont présentes dans le muscle dystrophique. Les macrophages de type M1 qui produisent des cytokines pro-inflammatoires et provoquent la lyse des cellules, et les macrophages de type M2 qui augmentent la réparation tissulaire en stimulant les cellules satellites (Villalta et al. 2009). Les neutrophiles sont également présents et leur déplétion dans la souris mdx contribue à l'amélioration de leur phénotype avec une réduction de la nécrose (Hodgetts et al. 2006).

e. Désorganisations intracellulaires

- **Désorganisation du réseau microtubulaire**

Par l'intermédiaire des dynéines et kynésines, les microtubules permettent le transport de protéines, vésicules, organelles et ARNm dans la cellule. La dystrophine permet la liaison et la stabilisation des microtubules costamériques au niveau du sarcolemme (Prins et al. 2009). Dans les fibres musculaires saines, les microtubules sont organisés en une matrice de microtubules longitudinaux et transversaux. Dans les fibres musculaires de souris mdx, l'absence de dystrophine provoque une désorganisation du réseau microtubulaire, avec une densification des microtubules longitudinaux et une perte des microtubules transversaux (Belanto et al. 2014; Percival et al. 2007; Prins et al. 2009) (Figure 10). Une surexpression des tubulines α et β qui composent les microtubules est également observée (Prins et al. 2009). L'expression d'une microdystrophine (voir Chapitre *II) 6)*

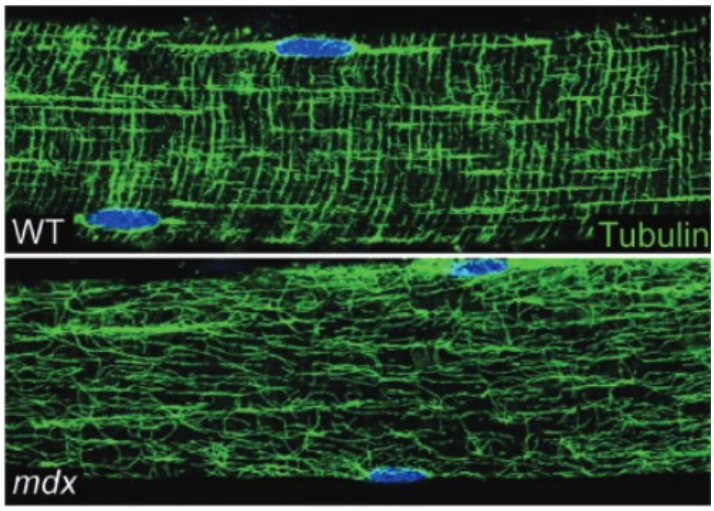


Figure 10: Organisation des microtubules dans des fibres isolées de souris sauvages et mdx.
La tubuline est marquée en vert et le DAPI marque les noyaux en bleu. Belanto et al. 2016

microdystrophine) dans le muscle des souris mdx permet la réorganisation du réseau microtubulaire (Belanto et al. 2014; Nelson et al. 2018; Percival et al. 2007). L'organisation des microtubules n'a cependant jamais été étudiée dans le muscle de patients DMD.

- **Désorganisation du complexe Golgien**

L'appareil de Golgi est le site majeur de modification et de transfert des protéines. Dans les fibres musculaires, les complexes Golgiens sont organisés en groupe de deux ou plus, alignés le long de l'axe de la fibre ainsi qu'aux pôles des noyaux. Ils sont essentiellement localisés à la surface des fibres mais on en retrouve aussi à l'intérieur (Percival et al. 2007). De plus, les complexes Golgiens sont localisés aux zones d'intersection des microtubules et ont été décrits comme permettant leur nucléation (Oddoux et al. 2013). Dans les fibres musculaires des souris mdx, la localisation et la morphologie des complexes Golgiens sont anormales. Ils sont alors principalement retrouvés dans l'espace situé entre les noyaux centraux et très peu aux pôles des noyaux localisés à la surface. Cette désorganisation est retrouvée dans les fibres musculaires des souris mdx adultes mais aucune désorganisation n'a été observée sur des fibres musculaires de souris mdx jeunes, prélevées avant le début de la phase de nécrose et régénération. La désorganisation du complexe Golgien semble donc être due aux cycles de nécrose et régénération mais également à la désorganisation du réseau microtubulaire, due à l'absence de dystrophine. En effet, l'expression d'une microdystrophine dans le muscle des souris mdx permettant la restauration de l'organisation du réseau microtubulaire, permet la restauration de l'organisation des complexes Golgiens (Percival et al. 2007). Cette désorganisation n'a pour le moment été observée que chez la souris mdx.

- **Altération de l'autophagie**

L'homéostasie cellulaire dépend entre autres des mécanismes de synthèse et de dégradation des protéines. La dégradation se fait par deux mécanismes différents. Soit les protéines sont ubiquitinylées et dégradées par le protéasome, soit elles sont dégradées par la voie lysosomale. L'autophagie est une voie de dégradation médiée par des vésicules issues de fusion entre un autophagosome et un lysosome (autolysosome) (voir Chapitre *IV)2)d) Voie de dégradation*). Une augmentation du nombre d'agrégats protéiques et de protéines

ubiquitinylées a été observée dans les cellules musculaires de patients DMD. De plus, un nombre anormalement élevé d'autophagosomes a été observé dans ces cellules, ce qui semble être dû à un défaut de maturation des autophagosomes en autolysosomes (Wattin et al. 2018). En effet, l'autophagie est aussi altérée dans le muscle de la souris mdx et du chien GRMD (De Palma et al. 2012; Pal et al. 2014; Spaulding et al. 2018; Stoughton et al. 2018). Cette altération a été décrite comme liée au stress oxydatif présent dans les cellules musculaires DMD, notamment créé par la protéine NADPH oxydase 2 (Nox2) (Pal et al. 2014). Dans les fibres musculaires de souris mdx, Nox2 et le stress oxydatif qui lui est associé sont augmentés. Cette augmentation provoque une diminution du nombre de lysosomes, un dysfonctionnement de la formation des autolysosomes et une diminution de l'autophagie. Il a également été montré que l'inhibition de Nox2 provoque une inhibition du stress oxydatif et une restauration du nombre de lysosomes et de l'autophagie (Pal et al. 2014). Une sécrétion aberrante de microvésicules contenant la protéine lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1), un marqueur lysosomal, a également été montrée chez la souris mdx (Duguez et al. 2013). La restauration de la dystrophine par saut d'exon (voir *Chapitre II) 6) saut d'exon*) dans les cellules musculaires de souris mdx permet la diminution de la sécrétion des vésicules LAMP1.

5) Modèles animaux de la DMD

a. La souris mdx

Plusieurs lignées de souris possédant une mutation dans le gène *Dmd* existent. La souris mdx est le modèle animal de la DMD utilisé dans notre laboratoire. Elle possède une mutation non-sens dans l'exon 23 provoquant l'absence totale d'expression de dystrophine (Sicinski et al. 1989). Elle a été découverte dans les années 1980 dans une colonie de souris C57BL/10ScSn ayant un taux élevé de créatine kinase et une histologie montrant des signes évidents de myopathie (Bulfield et al. 1984). La souris mdx a un phénotype peu sévère avec une réduction de l'espérance de vie de seulement 25% comparée à une souris wild type (WT) contre 75% chez l'Homme (Figure 11) (McGreevy et al. 2015). Durant ses deux premières semaines de vie, les muscles de la souris mdx sont comparables à des muscles d'une souris WT. Dès 3 semaines, les muscles vont subir des cycles de nécrose et régénération et les muscles des membres

postérieurs vont devenir hypertrophiques. Les souris mdx ne subissent pas de perte musculaire, scoliose ou problèmes cardiaques. Seul le diaphragme subit une dégradation progressive. Le phénotype peu sévère de la souris mdx est en partie dû à la surexpression de l'utrophine, une protéine analogue de la dystrophine, qui est capable de lier l'actine et le β-dystroglycane mais ne lie pas les microtubules (Belanto et al. 2014). Sa surexpression permet donc de compenser en partie la perte de la dystrophine.

b. La souris dKO

Afin d'obtenir une souris dystrophique dont le phénotype est plus semblable à celui de l'homme, la souris mdx a été croisée avec une souris portant une mutation dans le gène de l'utrophine (Deconinck et al. 1997). Cette souris double-knockout (dKO) a un phénotype beaucoup plus sévère que la souris mdx. Son espérance de vie est réduite de 85% par rapport à une souris WT, elles sont beaucoup plus petites et présentent une forte cyphose (McGreevy et al. 2015). Rapidement, ces souris vont perdre leur mobilité et subir des déficiences respiratoires et cardiaques.

c. Le chien GRMD

De nombreux chiens portant une mutation spontanée dans le gène *DMD* ont été recensés mais le plus étudié est le chien Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) qui a été identifié pour la première fois en 1992 (Sharp et al. 1992). Le chien GRMD porte une mutation dans l'intron 6 du gène DMD, provoquant un nouveau site accepteur d'épissage, le saut de l'exon 7 et le décalage du cadre de lecture. Le chien GRMD présente un phénotype plus proche de l'homme avec une dégénérescence musculaire progressive, une atteinte cardiaque et respiratoire et une atrophie et faiblesse musculaire (Yu et al. 2015). Son espérance de vie est réduite de 75% par rapport à un chien sain (McGreevy et al. 2015).

d. Le rat Dmd^{mdx}

Le rat Dmd^{mdx} a été généré grâce à un outil Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) ciblant l'exon 23 injecté dans un zygote. La mutation du rat Dmd^{mdx} est donc

comparable à celle de la souris mdx (Larcher et al. 2014). Ce modèle animal, comparé à la souris mdx, a un phénotype beaucoup plus proche de l'homme. En effet, il présente une cardiomyopathie marquée, une fibrose et des infiltrations de tissus adipeux dans le muscle. Les fibres musculaires sont de tailles variables et centronucléées, avec la présence de fibres nécrotiques. Une perte de la masse et de la force musculaire sont aussi observées chez les rats Dmd^{mdx} qui montrent également une activité spontanée plus faible que les rats contrôles dès l'âge de 3 mois (Larcher et al. 2014).

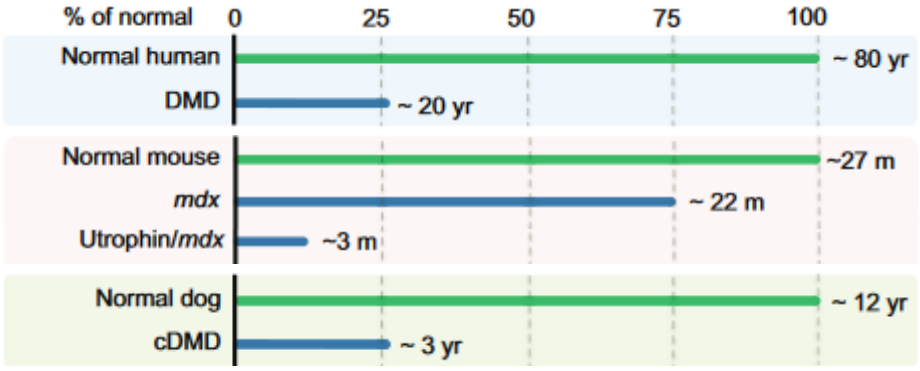


Figure 11: Espérance de survie moyenne des patients DMD par rapport à la population, ainsi que des modèles animaux de la DMD par rapport aux contrôles associés.

L'espérance de vie est exprimée en années (Yr, year) ou en mois (m, month). Adapté de McGreevy, 2015

6) Pistes thérapeutiques pour la DMD

a. Traitements actuels

Sans traitement, l'espérance de vie des patients DMD est d'une vingtaine d'années. Actuellement, les traitements consistent principalement à soulager les symptômes mais ne traitent pas la cause de la maladie. Ils se composent d'un traitement pharmacologique ainsi que d'une prise en charge médicale pluridisciplinaire.

- **Traitements pharmacologiques**

Le traitement principal consiste en la prise de corticostéroïdes (prednisone ou déflazacort) dès un stade précoce de la maladie, entre 4 et 6 ans (Nascimento Osorio et al. 2018). La prise des corticostéroïdes permet de prolonger l'ambulation de 3 ans, de réduire l'atteinte cardio-pulmonaire, de réduire le risque de scoliose et d'améliorer l'espérance de vie (Moxley et al.

2010). Cependant les corticostéroïdes présentent de nombreux effets secondaires comme la prise de poids allant jusqu'à l'obésité, un retard de croissance, un risque de cataracte, de l'hypertension, une baisse des défenses immunitaires et une ostéoporose avec une forte sensibilité aux fractures (Nascimento Osorio et al. 2018). Par rapport à la prednisone, le déflazacort entraine un plus faible risque de prise de poids mais un plus haut risque de cataracte. Pour cette raison, les patients ne présentant aucun signe de surpoids avant le début de la prise des corticostéroïdes sont traités au prednisone tandis que les patients présentant des signes de surpoids sont préférentiellement traités au déflazacort. En cas d'effets secondaires trop importants, un changement de corticostéroïdes peut être recommandé (Moxley et al. 2010). En complément des corticostéroïdes et afin de ralentir la progression de la cardiomyopathie, des bétabloquants ou des inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine (ACE) sont prescrits. En plus des inhibiteurs de l'ACE, un traitement à l'éplérénone, un antagoniste de l'aldostérone, permet d'atténuer le déclin de la fonction ventriculaire gauche et de préserver la fraction d'éjection (Crone and Mah 2018).

- **Prise en charge médicale**

Une prise en charge pluridisciplinaire des patients est essentielle. Des séances de kinésithérapie permettent l'étirement des muscles et la mise en place d'orthèses aident à maintenir la souplesse musculaire et à éviter les rétractions tendineuses. La chirurgie peut être indiquée pour contrer la rétraction du tendon d'Achille ou soigner la scoliose (Bushby et al. 2010). Enfin, une ventilation non invasive en pression positive (NIPPV) est recommandée pour les patients présentant des troubles respiratoires au cours du sommeil (Bushby et al. 2010). Cette aide respiratoire peut également être continuée pendant la journée lorsque les patients présentent des signes d'hypoventilation ou d'hypercapnie.

b. Traitements pharmacologiques en développement

- **Translecture du codon stop**

Afin de traiter les patients porteurs de mutations ponctuelles causant l'apparition d'un codon stop prématuré, l'utilisation de drogues capables d'augmenter la translecture de ces codons-

stop par le ribosome, a été proposée. L'ataluren est une petite molécule développée par PTC Therapeutics permettant la translecture des codons-stop (Welch et al. 2007). Un essai clinique en phase II a montré une augmentation de l'expression de la dystrophine ainsi qu'une amélioration des signes cliniques des patients DMD (Bushby et al. 2014; Finkel et al. 2013). La phase III de cet essai clinique n'a pas montré de différence significative entre les patients traités à l'ataluren et les patients ayant reçu le placebo. Cependant, des analyses complémentaires ont montré que l'ataluren était efficace pour ralentir l'avancée de la maladie (Shimizu-Motohashi et al. 2019). Pour cette raison, ce médicament a reçu une autorisation provisoire de mise sur le marché par l'agence médicale européenne (EMA) en 2014. Concernant les Etats-Unis, la demande d'autorisation de mise sur le marché de l'ataluren a été refusée en 2016 par la Food and Drug Administration (FDA) pour cause d'efficacité non concluante (www.ir.ptcbio.com/static-files/1f6f5371-b50c-4298-951a-eb24331e8d75). Il y est cependant toujours testé en phase III d'un essai clinique.

- **Surexpression de l'utrophine**

L'utrophine est une protéine analogue à la dystrophine. Elle possède notamment les sites de liaison à l'actine et au β-dystroglycane mais n'est pas capable de lier les microtubules (Belanto et al. 2014). Au cours du développement, l'utrophine est exprimée dans le muscle fœtal. C'est seulement à la fin de la gestation que l'expression de l'utrophine diminue pour être remplacée par la dystrophine (Reinig et al. 2017). Sa surexpression dans les modèles animaux comme la souris mdx permet de compenser, en partie, l'absence de la dystrophine. De plus, la mutation du gène de l'utrophine dans la souris dKO provoque un phénotype beaucoup plus sévère et une espérance de vie beaucoup plus courte comparé à la souris mdx (*voir II) 5) b) La souris dKO*). Un autre modèle murin de la DMD, la souris transgénique Fiona-mdx, surexprime l'utrophine et montre une force supérieure à celle de la souris mdx (Belanto et al. 2014; Tinsley et al. 1998). L'expression d'utrophine est augmentée dans le muscle des patients DMD mais pas au point de permettre un bénéfice thérapeutique. L'Ezutromide, un composé capable d'augmenter son expression a été évalué en phase II d'un essai clinique mené par Summit Therapeutics. Aucun bénéfice n'ayant été observé après 48 semaines de traitement, le développement de ce composé a été arrêté (communiqué Summit Therapeutics). Dans l'optique de proposer aux patients un double traitement permettant à la fois la surexpression

de l'utrophine et l'expression de dystrophine, l'efficacité d'un traitement aux oligo-nucléotides antisens, qui permettent de rétablir le cadre de lecture et donc l'expression de dystrophine (*voir Chapitre II) 6) d) Saut d'exon thérapeutique*), a été mesuré chez la souris Fiona-mdx. Ce traitement confère aux souris Fiona-mdx une force similaire aux souris contrôles et significativement plus élevée que celle des souris mdx ayant subis le même traitement (Guiraud et al. 2019). Ce résultat ouvre donc la voie à de potentielles nouvelles stratégies thérapeutiques combinant dystrophine et utrophine.

c. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire pour la DMD consiste en la transplantation de cellules capables d'exprimer la dystrophine. Ces cellules proviennent soit de donneurs sains, soit sont des cellules autologues ayant subi une modification génétique *ex vivo*. La greffe de différents types cellulaires dans des modèles murins a été essayée, avec des cellules satellites, des myoblastes, des cellules souches embryonnaires, des iPS (induced pluripotent stem cells) ou des cellules mésenchymateuses (Shimizu-Motohashi et al. 2019). La transplantation de cellules satellites ou de myoblastes provenant d'un donneur sain présente un risque de rejet immunitaire des cellules transplantées tandis que l'utilisation de cellules autologues permet de diminuer ce risque mais nécessite le prélèvement de cellules du malade et leur modification génétique (Barthélémy and Wein 2018). Deux essais cliniques de transplantation de cellules musculaires provenant de donneurs sains ont été réalisés. Pour le dernier, 30.10^6 myoblastes ont été injectés dans une zone de 1 cm^3 dans l'un des deux *Tibialis Anterior* de chaque patient et a montré la bonne intégration des cellules musculaires transplantées et l'expression de dystrophine dans la zone d'injection. Cependant, à la vue de la faible zone traitée, aucune étude fonctionnelle n'a été réalisée (Skuk et al. 2006; Skuk et al. 2004). Un autre essai clinique de transplantation de myoblastes provenant de donneurs sains est actuellement en cours et prévoit la réalisation de test de force (Clinicaltrial.gouv, NCT02196467). Cet essai consiste en l'injection d'une zone plus grande (jusqu'à 9cm^3) dans le muscle *Extensor Carpi Radialis* du bras. L'injection intraveineuse de mésangioblastes allogéniques a également été réalisée mais aucune amélioration fonctionnelle n'a été observée (Cossu et al. 2015). Des essais cliniques de greffe de cellules souches mésenchymateuses allogéniques et de cellules souches

autologues dérivées de la moelle osseuse sont également en cours (NCT02235844, NCT03067831).

d. Thérapie génique

La thérapie génique consiste en l'introduction d'acides nucléiques (ADN ou ARN) dans les cellules d'un organisme, afin de corriger un défaut génétique. Le défaut peut être corrigé en introduisant une copie saine du gène ou par l'introduction d'ARN capables de bloquer partiellement l'expression d'un gène muté.
Les acides nucléiques peuvent être introduits chez le patient à l'aide d'un vecteur viral. Le vecteur viral de choix pour le traitement de la DMD est le virus adéno-associé (AAV pour Adeno-Associated Virus). Etant donné la très grande taille du gène DMD et la faible capacité d'encapsidation des vecteurs AAV (*voir Chapitre III*), la production de vecteurs AAV contenant le gène *DMD* ou son ADN complémentaire entier sont impossibles. D'autres stratégies permettant de restaurer l'expression de la dystrophine en utilisant l'AAV comme vecteur ont donc dû être imaginées.

- **Micro-dystrophine**

L'identification de patients BMD portant de larges mutations et ayant des phénotypes peu sévères à modérés, a suggéré que tous les domaines de la dystrophine ne sont pas indispensables à une dystrophine fonctionnelle. Afin de contrecarrer les problèmes de taille limitée dans les vecteurs AAV, différentes constructions de dystrophines tronquées mais fonctionnelles, appelées mini ou micro-dystrophines, ont été conçues. Les premières constructions d'AAV-microdystrophine efficaces ont été proposées en 2000 puis en 2002 respectivement par les laboratoires des docteurs Xiao Xiao (Wang et al. 2000) et Jeffrey Chamberlain (Harper et al. 2002). Leurs travaux ont permis de mettre en évidence les domaines essentiels à une dystrophine fonctionnelle mais aussi le nombre de répétitions de spectrines et de régions charnières idéal, afin d'obtenir à la fois une protéine assez flexible et une taille totale du transgène assez restreinte pour ne pas gêner la production des vecteurs AAV. Ces constructions possédaient le domaine N-terminal, 4 à 5 répétitions de spectrines, 2 à 3 régions charnières et le domaine riche en cystéines (Figure 7). Le Laboratoire du Pr George

Dickson optimisa ensuite les codons de la séquence ADN du transgène, afin de rendre son ARN plus stable et d'augmenter l'efficacité de transcription (Foster et al. 2008). Enfin, l'équipe du Dr Dongsheng Duan ajouta les répétitions de spectrines 16 et 17 (Lai et al. 2009), permettant la fixation de la nNOS. Les vecteurs AAV-microdystrophine ont montré leur efficacité sur des modèles canins en injection locale (Shin et al. 2013) et systémique (Le Guiner et al. 2017). La microdystrophine utilisée sur le chien GRMD est la MD1 (Figure 12). Un premier essai clinique a démarré en 2006 au Nationwide Children's Hospital de Columbus qui consistait en l'injection locale d'AAV2-microdystrophine dans l'un des biceps des patients. Cet essai a montré peu de résultats, probablement dû à la forte réponse immunitaire qu'a engendrée l'AAV dans ce premier essai (Bowles et al. 2012). Le transgène microdystrophine était sous le contrôle du promoteur ubiquitaire cytomegalovirus (CMV). Cet essai a montré l'importance d'utiliser un AAV dont le sérotype est plus spécifique du muscle et moins immunogène ainsi que l'utilisation d'un promoteur muscle spécifique qui diminue la réponse immunitaire, évite l'expression non musculaire du transgène et favorise l'expression musculaire à long terme (Bowles et al. 2012). En 2017 et 2018, 3 nouveaux essais cliniques ont commencé aux Etats-Unis et sont actuellement en cours. Ces 3 essais utilisent l'AAVrh74, un AAV très proche de l'AAV8 mais possédant une meilleure efficacité de transduction dans le muscle et le cœur après une injection systémique (Mendell et al. 2019) (pour Sarepta Therapeutics, NTC03375164), ou l'AAV9 (pour Solid Biosciences, NCT03368742 et Pfizer, NTC03362502) où le transgène microdystrophine est sous le contrôle d'un promoteur muscle spécifique (CK8 ou MHCK7). Chacun des 3 essais cliniques utilise une construction différente de microdystrophine (Figure 13). Les points communs entre les différentes microdystrophines sont la présence de

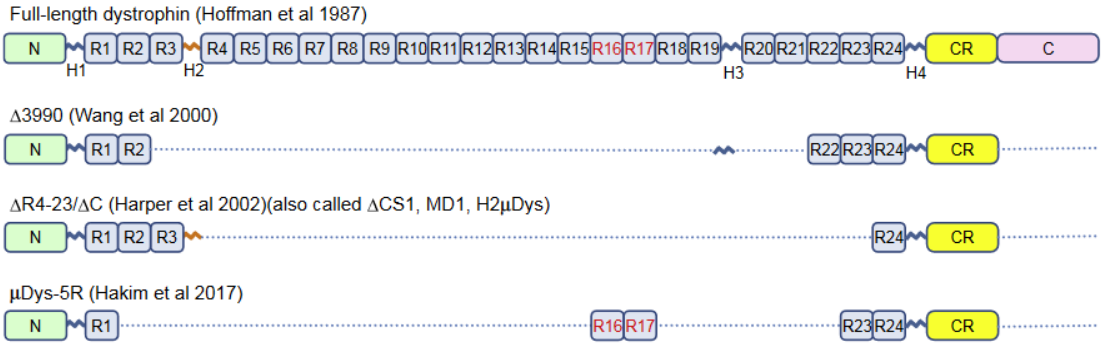


Figure 12: Représentation de la protéine dystrophine entière et des 3 configurations de microdystrophines actuellement utilisées en essai clinique.

N : région N-terminale ; R : répétitions de spectrines ; CR : domaine riche en cystéines ; C : région C-terminale. Adapté de Dongsheng Duan et al. 2018

la région N-terminale (N), le domaine riche en cystéines (CR), les répétitions de spectrines 1 et 24 (R1 et R24) et l'absence du domaine C-terminal. Seule la microdystrophine de l'essai clinique dirigé par Solid Biosciences contient les répétions de spectrines 16 et 17 (R16 et R17) capable de lier la nNOS.

- **Saut d'exon thérapeutique**

Afin de convertir une mutation décalant le cadre de lecture en mutation gardant le cadre de lecture, une stratégie de saut d'exons a été proposée. Celle-ci consiste à sauter les exons mutés et/ou adjacents à la mutation en utilisant des oligonucléotides anti-sens (AON), empêchant la reconnaissance des sites d'épissage de ces exons par la machinerie d'épissage (Figure 13). La protéine dystrophine résultante est donc plus courte mais fonctionnelle. Les séquences anti-sens sont à adapter en fonction de la mutation et des exons à sauter. Le saut de l'exon 51 permettrait de traiter 15% des patients tandis que le saut des exons 45 à 55 permettrait d'en traiter 62%. Afin d'améliorer leur efficacité, les liaisons phosphorodiamidate des nucléotides sont remplacées par des liaisons phosphodiester et les oligonucléotides sont alors appelés PMO (Phosphoroamidate Morpholino Oligomers) ou un 2'-O-methyl a été ajouté et les oligonucléotides sont alors appelés 2'OMe (Goyenvalle et al. 2016).
Après des résultats encourageants obtenus lors de la phase II/III d'un essai clinique, l'Eteplirsen, un PMO permettant un saut de l'exon 51, a été approuvé par la FDA en 2016 (Lim et al. 2017). Cette molécule ne permet cependant qu'une très faible expression de la protéine dystrophine avec seulement 0,22 à 0,32% d'expression comparée à celle d'un individu sain (Lim et al. 2017). L'amélioration des fonctions respiratoires a tout de même été observée chez les patients traités à l'Eteplirsen (Khan et al. 2019). D'autres essais cliniques sont en cours pour le saut des exons 45 (Casimersen, NCT02500381 et NCT03532542) ; 51 (SRP-5051, NCT03375255 et NCT03675126) et 53 (Golodirsen, NCT02310906, NCT02500381 et NCT03532542).

Les principales limites des PMO sont leur faible efficacité dans le muscle cardiaque, leur faible pénétration cellulaire et leur élimination rapide de la circulation sanguine. Des problèmes de toxicité rénale ont également été observé lors d'essai clinique, notamment avec les 2'OMe (Echevarría et al. 2018). De plus, des injections répétées des PMO aux patients sont nécessaires (Shimizu-Motohashi et al. 2019).

Pour améliorer le transport et la pénétrance des AON, d'autres chimies ont été développées. Les Tricyclo-DNA Antisense Oligonucleotides (tcDNA) ont montré une plus grande efficacité dans tous les tissus, dont le cœur, par rapport aux PMO et 2'OMe dans la souris mdx (Goyenvalle et al. 2015). Par ailleurs, les PMO conjugués à des peptides, appelés PPMO (Peptide-Phosphoroamidate Morpholino Oligomers), ont montré leur efficacité dans le cœur d'un modèle canin de la DMD, le canine X-linked muscular dystrophy (Echigoya et al. 2017).

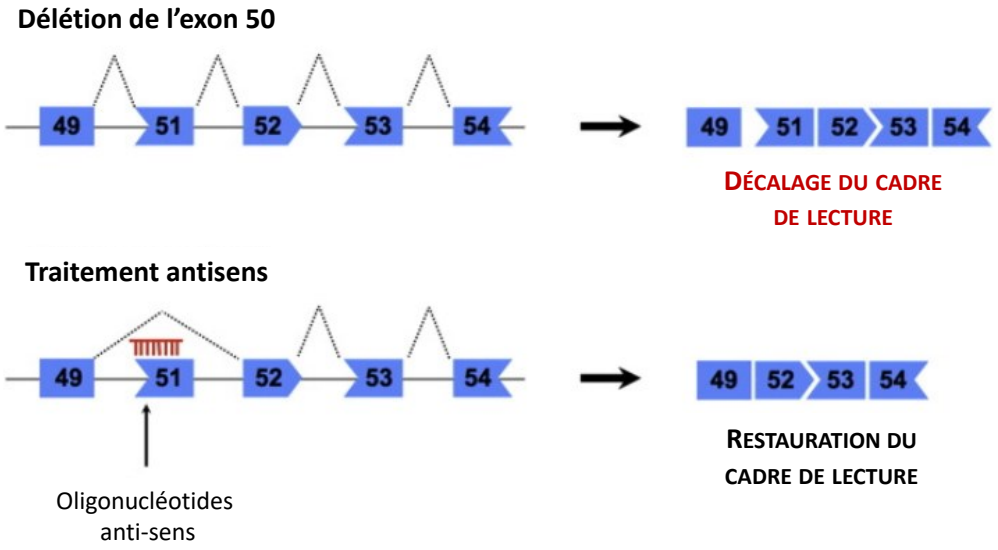


Figure 13: Principe du traitement de la DMD par oligonucléotides anti-sens.
Dans cet exemple, l'exon 50 est absent du gène DMD ce qui cause un décalage du cadre de lecture. Grâce à l'utilisation d'oligonucléotides antisens masquant le site accepteur d'épissage de l'exon 51, l'exon 51 n'est pas reconnu par le spliceosome et le cadre de lecture est rétabli. Adapté de Douglas AG et al. 2013

Pour pérenniser l'action des oligonucléotides anti-sens et éviter des injections répétées, des AAV dont le transgène code les séquences anti-sens ont été produits. Afin d'être stables et localisées dans le noyau, ces séquences anti-sens ont été fusionnées avec des petits ARN nucléaires (snRNA) appelés snRNA-U7. Les snRNA-U7 sont normalement impliqués dans le processus de maturation du pré-ARNm de l'histone H3. Cette stratégie a été mise au point en 1998 par le laboratoire du Dr Ryszard Kole qui a montré la possibilité d'utilisé les petits ARN nucléaires U7 pour le saut d'exon sur l'ARNm de la β-globine (Gorman et al. 1998) puis par le Dr Irene Bozzoni qui a montré l'efficacité du saut d'exon et la restauration de l'expression de dystrophine, *in vitro*, dans des myoblastes DMD (De Angelis et al. 2002). Des études précliniques réalisées chez des modèles murins de la DMD (Goyenvalle et al. 2009; Goyenvalle et al. 2004) et le chien GRMD (Le Guiner et al. 2014; Vulin et al. 2012) ont montré que cette

technique permettait la restauration de l'expression de la dystrophine ainsi qu'une augmentation de la force musculaire. L'une des limites de cette stratégie est la perte des génomes AAV, et donc de l'efficacité thérapeutique à long terme (Le Hir et al. 2013; Peccate et al. 2016). Chez la souris dKO, le nombre de génomes viraux chute drastiquement un an après l'injection d'AAV9-U7, entrainant une diminution du pourcentage de saut d'exon. Cette perte étant plus importante dans les muscles ayant le taux de saut d'exon le plus faible, il semblerait qu'elle soit corrélée au taux de restauration initial de la dystrophine (Le Hir et al. 2013). La perte d'un bénéfice thérapeutique corrélée à la perte des génomes AAV a également été observée chez le chien GRMD traité par injection intramusculaire d'un AAV1-U7 (Vulin et al. 2012). Pour limiter la perte de l'AAV et améliorer le traitement, un prétraitement aux PPMO suivi d'une injection d'AAV-U7 dans des souris mdx a été imaginé. Ce traitement combiné a permis de maintenir les génomes viraux d'un AAV-U7 ou d'un AAV-microdystrophine dans le muscle et une meilleure restauration de la dystrophine (Peccate et al. 2016).

- **Edition de gène à l'aide de CRISPR-Cas9**

Afin d'obtenir un saut des exons mutés directement sur le gène, et plus sur l'ARNm, une stratégie CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat ; CRISPR-associated) a été élaborée. Cas9 est une nucléase qui grâce à un ARN guide simple brin (sgRNA) va se lier à une région génomique cible et générer une cassure des deux brins de l'ADN. La cassure double brin est ensuite réparée par jonction d'extrémités non homologues ou recombinaison homologue. L'efficacité de cette stratégie a été montrée chez la souris mdx en 2014 par le laboratoire du Pr Eric Olson (Long et al. 2014) en injectant directement Cas9 et les ARN guides dans le zygote puis en 2016 par injection d'AAV contenant les séquences codant la Cas9 et les ARN guides (Long et al. 2016). Deux chiens deltaE50-MD, un autre modèle animal canin de la DMD, ont été injectés par voie systémique avec un AAV contenant les séquences codant la Cas9 et les ARN guides. Les résultats de ces expériences ont montré jusqu'à 90% de restauration de l'expression de dystrophine (Amoasii et al. 2018). Bien que très efficace pour l'édition du gène *DMD*, cette technique présente de grands risques d'éditions de gènes non ciblés comme par exemple des gènes oncogènes. De plus, l'édition du génome soulève des questions éthiques. Aucun essai clinique chez l'Homme n'a été réalisé à ce jour.

III. Les virus Adéno-associés

1) Le virus AAV

Les virus adéno-associés ou AAV ont été décrits pour la première fois en 1965 comme des contaminants de réserves d'adénovirus (Atchison, 1965). Les virus AAV appartiennent à la famille des *Parvoviridae*, ce sont des petits virus non enveloppés de forme isocaédrique, d'un diamètre compris entre 18 et 26nm et dont le génome est un ADN simple brin d'environ 5 kilobases (kb) contenant deux cadres de lecture. Sa sous-famille est celle des *Parvovirinae*, ce qui signifie qu'il infecte les vertébrés (Cotmore and Tattersall 2014; Wang et al. 2010). Enfin, l'AAV fait partie du genre des *Dependovirus*, signifiant qu'il ne peut pas se répliquer en l'absence d'un virus auxiliaire tel que l'adénovirus, l'herpès simplex virus (HSV) (Buller et al. 1981), le papillomavirus humain (Ogston et al. 2000), le cytomégalovirus (CMV) (McPherson et al. 1985) ou, partiellement, le virus de la vaccine (Moore et al. 2015). Ce virus est non pathogène chez l'homme et plus de 100 sérotypes naturels ont été identifiés à ce jour (Wu et al. 2006), isolés à partir de préparations adénovirales ou de tissus humains ou de primates (Drouin and Agbandje-McKenna 2013; Schmidt et al. 2006).

a. Structure du génome AAV et sa réplication

Le génome de l'AAV est un ADN simple brin de 4,7kb. Ses gènes viraux sont flanqués par deux régions terminales répétées inversées dites ITR (Inverted Terminal Repeat) de 145bp (Lusby et al. 1980; Srivastava et al. 1983) (Figure 15). Cette région est composée de 125 bases formant une séquence palindromique en forme de T, ou épingle à cheveux, et 20 bases formant une séquence simple brin appelée séquence D qui a un rôle dans la réplication et l'encapsidation des génomes AAV (Wang et al. 1996). Les régions ITR comprennent également un site de fixation à la protéine virale Rep (RBE) (Samulski and Muzyczka 2014) et un site de clivage dit TRS (terminal resolution site). Les ITR sont nécessaires à la réplication, l'encapsidation, l'intégration du génome viral dans l'ADN cellulaire ainsi que son excision du génome cellulaire. Elles contiennent également des séquences promotrices (Flotte et al. 1993; Haberman et al. 2000).

Les gènes viraux sont répartis dans deux cadres de lecture (ou ORF pour Open Reading Frame) (Figure 14). La première ORF code les protéines Rep78 et Rep68 qui dépendent du promoteur P5 et les protéines Rep52 et Rep40 qui dépendent du promoteur P19. Ce sont des protéines régulatrices de la réplication du génome viral et des promoteurs viraux (Balakrishnan and Jayandharan 2014). La deuxième ORF, correspondant au gène Cap, code 4 protéines, VP1, VP2, VP3 et AAP (Assembly-Activating Protein) dont l'expression dépend du promoteur P40. La protéine AAP participe à l'assemblage de la capside qui est composée des protéines VP1, VP2 et VP3 avec un ratio d'environ 1 :1 :10 (Kronenberg et al. 2001).

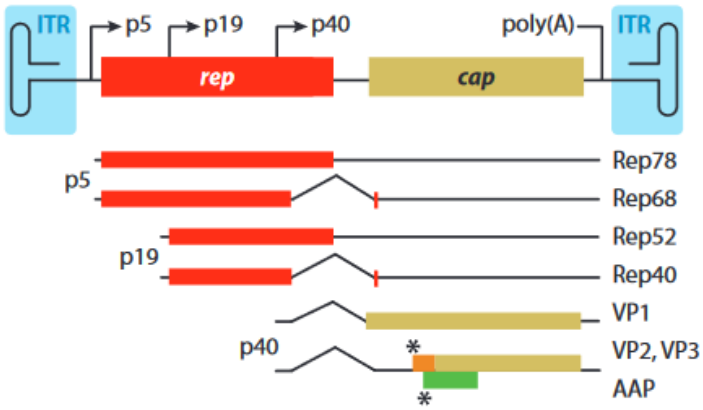


Figure 14: Représentation du génome de l'AAV.
Les deux régions ITR sont représentées aux extrémités par leur structure secondaire en épingle à cheveux. Les gènes Rep sont sous le contrôle des promoteurs P5 et P19 et les gènes Cap sous le contrôle du promoteur P40. Les deux astérisques correspondent à la localisation des différents codons d'initiation de VP2/VP3 et de l'AAP. Adapté de Balakrishnan and Jayandharan, 2014

La structure secondaire de l'ITR et son extrémité 3' hydroxyle libre permet l'initiation de la transcription et la synthèse du second brin (Figure 15). Cette synthèse se fait grâce à l'ADN polymérase delta (Nash et al. 2007). La forme double brin du génome de l'AAV sert d'intermédiaire de réplication. Une fois la réplication terminée, Rep78 et Rep68 se lient au site RBE et coupent l'ADN au niveau du TRS grâce à leur activité endonucléase. Ce clivage permet la séparation des deux brins d'ADN, donnant alors deux molécules d'ADN simple brin de polarités différentes : un brin (+) et un brin (-) qui peuvent ensuite subir de nouveaux cycles de réplication. Les deux brins peuvent être encapsidés donnant ainsi des particules virales de polarités opposées (Schultz and Chamberlain 2008). Les protéines Rep52 et Rep40 sont impliquées dans la modulation de l'expression des protéines Rep78 et Rep68 en régulant les promoteurs AAV. Elles ont aussi une activité hélicase essentielle à l'encapsidation des génomes viraux (King et al. 2001).

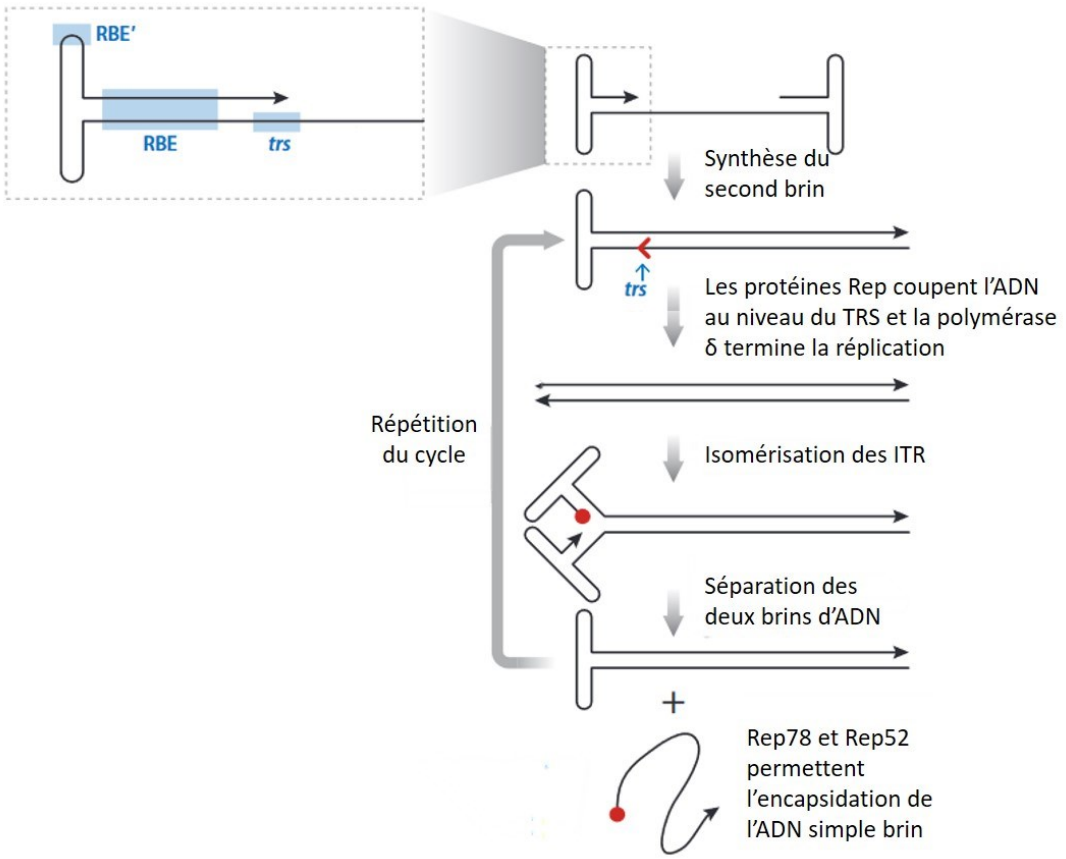


Figure 15: Les régions ITR et réplication de l'ADN viral.
Les régions ITR sont des séquences palindromiques inversées répétées. La séquence RBE permet la fixation des protéines Rep et le site trs, situé à la jonction entre la séquence double brin et la séquence simple brin D permet la terminaison de la réplication avec le clivage et la séparation des deux brins d'ADN.
La synthèse du second brin commence au niveau de l'extrémité 3'OH libre par la polymérase δ. La molécule en duplex formée est alors fermée au niveau de l'ITR ayant servi à l'initiation. Les protéines Rep78 et Rep68 se lient au site RBE et coupent l'un des deux brins au niveau du trs grâce à leur activité endonucléase. La coupure crée alors un nouveau site 3'OH libre permettant la synthèse du second brin de la région ITR. La séparation des deux brins permet la formation de deux molécules d'ADN : l'une simple brin qui sera encapsidée par Rep78 et Rep52 et l'autre qui subira un nouveau cycle de synthèse du second brin à partir de son extrémité 3'OH libre. Adapté de Samulski et al. 2014.

b. Le cycle viral

Le cycle viral de l'AAV se décompose en 2 phases successives : une phase lysogénique ou latente et une phase lytique (Figure 16). En absence de virus auxiliaire, l'AAV entre en phase lysogénique en intégrant son génome dans le locus q13.4 du chromosome 19 humain, appelé AAVS1 (Adeno-associated virus integration site 1), sous forme d'une seule copie ou de concatémères (Cheung et al. 1980) grâce aux protéines Rep78 et Rep68. Rep78 est capable de

couper l'ADN de la cellule hôte (Young et al. 2000) et d'arrêter son cycle cellulaire en phase S afin de faciliter la latence de l'AAV (Berthet et al. 2005). Le génome de l'AAV ainsi intégré est dit provirus et n'est pas productif. Dans ce cas, les gènes viraux ne s'expriment pas et il n'y a pas de réplication de l'ADN viral ni d'assemblage de nouvelles particules. D'autres sites d'intégration ont également été décrits comme le 5p13.3 (AAVS2) et le 3p24.3 (AAVS3) (Hüser et al. 2010). Cependant, une grande majorité des génomes AAV reste sous forme épisomale, permettant la stabilité et la persistance des génomes viraux non intégrés (Duan et al. 1998; Schnepp et al. 2005). La phase lytique commence lorsque la cellule contenant le provirus est infectée par un virus auxiliaire. Les promoteurs des gènes rep et cap sont activés par la protéine E1A de l'adénovirus (Chang et al. 1989) et le provirus est alors excisé du génome de la cellule hôte par la protéine Rep. L'ADN viral se réplique afin de générer de nouvelles molécules d'ADN simple brin qui seront ensuite encapsidées. Les virus AAV nouvellement assemblés dépendent alors de la lyse cellulaire induite par le virus auxiliaire pour pouvoir s'échapper de la cellule hôte.

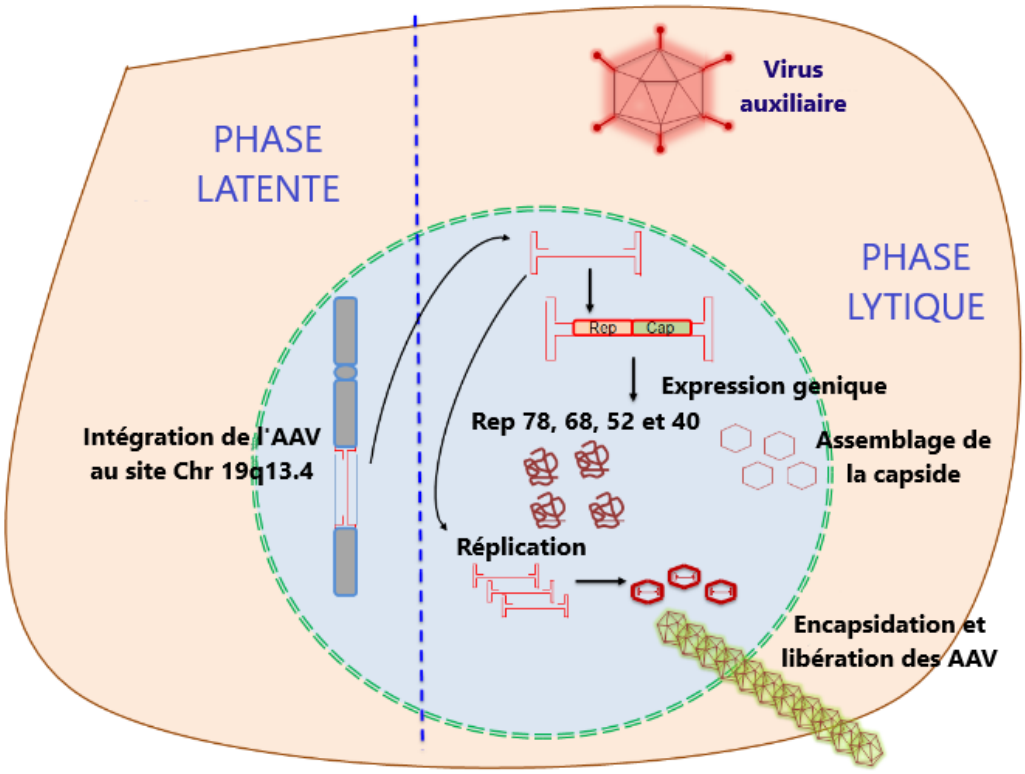


Figure 16 : Cycle viral des vecteurs AAV.
Il est constitué de deux phases : la phase latente où le génome de l'AAV persiste dans la cellule et la phase lytique où, grâce à un virus auxiliaire, l'AAV va pouvoir exprimer ses gènes viraux, se répliquer et générer de nouveaux AAV. Adapté de Balakrishnan and Jayandharan, 2014

c. Sérotypes et tropisme

Les sérotypes des virus AAV correspondent à leur classification en fonction de leurs antigènes de surface. Chaque sérotype d'AAV possède un tropisme spécifique qui se définit par la capacité d'un virus à infecter préférentiellement un type cellulaire. En effet, chaque sérotype d'AAV possède une capside différente, qui va reconnaitre différents récepteurs à la surface des cellules (Tableau 1). Par exemple l'AAV2, qui a été découvert en premier et donc le mieux décrit, reconnait l'héparane sulfate à la surface des cellules et utilise en co-récepteurs les récepteurs à la laminine (LamR) et aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR1) et des hépatocytes (HGFR). L'AAV8, utilisé dans les études précliniques de la microdystrophine, a comme co-récepteur le récepteur à la laminine (Akache et al. 2006). Dernièrement, un récepteur commun à tous les virus AAV a été découvert, il s'agit du KIAA0319L (aussi appelé AAVR) (Pillay et al. 2016), une protéine transmembranaire peu connue mais qui semble jouer un rôle dans la dyslexie. Cependant, cette interaction a été montrée dans des lignées cellulaires humaines et chez la souris mais pas encore *in vivo* chez le gros animal ou chez l'Homme.

Virus	Récepteur commun	Récepteur principal	Co-récepteur
AAV1	KIAA0319L	acide sialique α-2,3-N-lié	Inconnu
AAV2		HSPG	FGFR1, HGFR, LamR
AAV3		HSPG	FGFR1, HGFR, LamR
AAV4		acide sialique α-2,3-O-lié	Inconnu
AAV5		acide sialique α-2,3-N-lié	PDGFR
AAV6		acide sialique α-2,3-N-lié, HSPG	EGFR
AAV7		Inconnu	Inconnu
AAV8		Inconnu	LamR
AAV9		N-linked galactose	LamR
AAV10		Inconnu	LamR

Tableau 1: Récepteurs et co-récepteurs des différents sérotypes d'AAV.
HSPG : Heparan Sulfate Proteoglycan ; FGFR1 : Fibroblast growth factor receptor ; HGFR : hepatocyte growth factor receptor *; LamR : Laminin receptor ; PDGFR : Platelet-derived growth factor receptor ; EGFR : epidermal growth factor receptor. Adapté de Balakrishnan and Jayandharan, 2014*

2) Les vecteurs AAV

En 1984, Paul Hermonat montra la possibilité du transfert de gène par l'intermédiaire d'un vecteur AAV. Pour ce faire, la partie contenant le gène Cap du génome de l'AAV avait été remplacée par le gène de résistance à la néomycine. La transduction de cellule Detroit 6 (une lignée cellulaire provenant de moelle sternale humaine) avec cet AAV a montré l'expression du gène de résistance à la néomycine par les cellules (Hermonat and Muzyczka 1984). Depuis, les vecteurs AAV sont utilisés comme outil de transfert de gènes dans de nombreux essais cliniques (clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=AAV&cntry=&state=&city=&dist=)

a. Génome

Le génome des vecteurs AAV, appelé AAV recombinants (AAVr), comprend toujours les deux régions ITR de l'AAV2, et les gènes viraux Rep et Cap sont remplacés par le promoteur, les séquences régulatrices, le gène d'intérêt (transgène) et le signal polyA. L'absence des protéines Rep permet d'éviter l'intégration du génome AAV dans le génome de la cellule hôte et par conséquent, limite le risque oncogénique associé (Colella et al. 2018). Le génome est ainsi maintenu sous forme épisomale dans la cellule hôte. Bien que les ITR possèdent une activité promotrice (Flotte et al. 1993; Haberman et al. 2000), celle-ci reste faible ce qui nécessite d'ajouter un promoteur plus fort en amont du transgène. Celui-ci peut être un promoteur ubiquitaire, tel que le CMV, ou un promoteur tissu spécifique comme par exemple le promoteur CMK (muscle créatine kinase), spécifique du muscle squelettique. Due à la faible capacité d'encapsidation des vecteurs AAV, la taille totale du génome ne peut pas dépasser 4,7kb pour les vecteurs AAV simple brin et 2,4kb pour les vecteurs AAV auto-complémentaires (*voir Chapitre III) 5) b)*).

b. Pseudotypes et tropisme

Les cassettes d'expressions des vecteurs AAV utilisés en thérapie génique sont flanquées par les ITR de l'AAV2 et peuvent être encapsidées de façon efficace dans les capsides d'autres sérotypes d'AAV. Les 12 premiers sérotypes des AAV naturels ont de cette façon été dérivés en vecteurs viraux. Par exemple, un vecteur AAVr ayant les ITR de l'AAV2 et la capside de

l'AAV8, sera nommé AAV2/8 et aura un tropisme similaire à celui de l'AAV8 sauvage. Cette technique permet d'utiliser le sérotype le plus adapté pour transduire efficacement un tissu donné dans une pathologie donnée (Tableau 2). Afin de rendre leur tropisme plus spécifique à un tissu d'intérêt, des sérotypes dits hybrides ont été créés en laboratoire (*voir Chapitre III) 5) a)*).

Virus	Tropisme
AAV1	Foie, cœur, muscle
AAV2	Foie, cœur, muscle, rétine, SNC, articulations
AAV3	Foie, cœur
AAV4	Foie, cœur, poumons
AAV5	Foie
AAV6	Foie, cœur, muscle, moelle osseuse
AAV7	Foie, muscle
AAV8	Foie, cœur, muscle, SNC, rétine
AAV9	Foie, cœur, SNC, poumons, muscle
AAV10	SNC, Foie
AAV11	*Inconnu*
AAV12	Epithélium

Tableau 2: Tropismes identifiés des différents vecteurs AAV
(Balakrishnan and Jayandharan 2014; Lisowski et al. 2015; Quinn et al. 2011; Srivastava 2016)

c. Production

La méthode la plus utilisée actuellement dans les laboratoires pour la production des vecteurs AAV est basée sur la transfection (Xiao et al. 1998) simultanée de 3 plasmides dans des cellules HEK293 (human embryonic kidney cells). Le premier plasmide contient les gènes Rep et Cap du sérotype choisi, le deuxième plasmide contient des gènes de l'adénovirus essentiels à la production et le troisième contient la cassette d'expression flanquée des séquences ITR. Après transfection, les cellules sont récoltées puis lysées. Le lysat est ensuite centrifugé afin d'éliminer les débris cellulaires puis purifié par filtration et sur gradients. Les dernières étapes de la production sont la concentration puis la quantification des génomes viraux (gv) dans les productions virales, qui donne un titre viral exprimé en génomes viraux par millilitre (gv/ml) (Mueller et al. 2012). Afin de produire les quantités d'AAV suffisantes à des applications

cliniques, cette méthode a été adaptée avec notamment l'utilisation de cellules en suspension (Aponte-Ubillus et al. 2018).

D'autres techniques plus récentes ont également été élaborées comme l'utilisation de lignées stables de production, exprimant les gènes Rep et Cap ainsi que la cassette d'expression flanquée des séquences ITR. Cette technique s'affranchie de l'étape de transfection mais nécessite alors l'infection par un virus auxiliaire pour déclencher la production des vecteurs AAV. La co-infection de cellules d'insectes Sf9 en suspension par des bacculovirus exprimant les gènes Rep et Cap ainsi que la cassette d'expression flanquée des séquences ITR permet également la production de vecteurs AAV (Ayuso et al. 2010).

3) Etapes de la transduction des AAV dans les cellules

Les virus et vecteurs AAV sont très efficaces pour la transduction de certaines cellules et tissus comme le système neuromusculaire. Malgré leur efficacité de transduction, moins de 1% des vecteurs AAV atteignent le noyau de cellules très permissives comme les HEK293 pour exprimer leur transgène (Keiser et al. 2011). Bien que l'attachement aux récepteurs détermine le tropisme des vecteurs AAV, d'autres étapes après l'internalisation peuvent limiter le transfert de gènes par ces vecteurs dont le transport endosomal, l'import nucléaire, la décapsidation et la synthèse du second brin (Nonnenmacher and Weber 2012). La permissivité cellulaire et l'efficacité de transduction dépendent d'interactions directes ou indirectes encore peu caractérisées entre des facteurs cellulaires et la capside ou les ITR. L'AAV2 étant le premier sérotype découvert, c'est aussi le mieux décrit. La plupart des étapes de la transduction ont donc été étudiées uniquement pour ce sérotype. Il est important de savoir que toutes ces étapes, ainsi que les interactions de l'AAV avec les protéines cellulaires, peuvent différer d'un sérotype à un autre.

a. Internalisation

Afin d'être internalisés, les vecteurs AAV se fixent à leurs récepteurs et co-récepteurs (Tableau 1) puis pénètrent dans la cellule par endocytose ou macropinocytose (Sanlioglu et al. 2000). L'AAV2 peut entrer dans la cellule par endocytose clathrine-dépendante (Bartlett et al. 2000; Uhrig et al. 2012), bien que son internalisation par les voies cavéoline-dépendante

(Nonnenmacher and Weber 2011) ou par une voie clathrine-indépendante nommée clathrin-independent carriers (CLIC) (Nonnenmacher and Weber 2011) a aussi été décrite (Figure 17). L'AAV5 est connu pour entrer dans les cellules par endocytose clathrine et cavéoline dépendante (Bantel-Schaal et al. 2002) tandis que l'AAV8 semble être uniquement internalisé par endocytose clathrine-dépendante (Liu et al. 2013). La dynamine, une GTPase permettant la libération des vésicules d'endocytose de la membrane cellulaire, est indispensable à la transduction des vecteurs AAV. En effet, l'inhibition de la dynamine réduit l'efficacité de transduction de l'AAV2 (Duan et al. 1999).

b. Transport endosomal et maturation

Une fois dans la cellule, les AAV sont transportés de la membrane cellulaire jusqu'au noyau à travers le système endosomal (Cf *IV) 4) 4) Transport endosomal des vecteurs AAV et efficacité de transduction*) et ce transport est facilité par le réseau microtubulaire. La dépolymérisation des microtubules par un traitement au nocodazole entraîne une diminution de l'efficacité de transduction due à une diminution de l'accumulation péri-nucléaire et de l'import nucléaire de l'AAV2 (Xiao and Samulski 2012). Ils sont aussi retrouvés dans le complexe Golgien (Bantel-Schaal et al. 2002) et les lysosomes.

Le transport endosomal est essentiel à la transduction efficace par des vecteurs AAV. En effet, l'injection d'AAV2 directement dans le cytoplasme diminue de 100 fois son efficacité d'expression, suggérant que le passage de l'AAV par les endosomes est primordial pour sa décapsidation et l'expression de son transgène (Sonntag et al. 2006). Il a également été montré que l'internalisation et le transport rapide jusqu'au noyau des AAV1 et 5 ne permettent pas une décapsidation efficace et l'expression du transgène dans les cellules HeLa, des cellules dérivées d'un carcinome cervical humain et permissives à l'AAV. Inversement, le transport plus lent de l'AAV2 jusqu'au noyau permet la maturation des particules virales entrainant une décapsidation et une expression efficace (Keiser et al. 2011). La maturation des vecteurs dans les endosomes consiste en un changement conformationnel de la capside permettant le relargage et la décapsidation du vecteur dans l'espace périnucléaire. Dans le cas de l'AAV2, il a été montré que l'acidité endosomale permet un changement

conformationnel de la capside provoquant le dévoilement d'un domaine phospholipase A2 ainsi que des séquences du signal de localisation nucléaire (NLS) (Sonntag et al. 2006). En effet, le traitement des cellules à la bafilomycine A1 (une drogue qui augmente le pH endosomal) diminue également l'efficacité de transduction des AAV de sérotype 2 et 8 (Douar et al. 2001; Liu et al. 2013; Sonntag et al. 2006). Ce domaine phospholipase A2 permettrait la formation d'un pore dans la membrane de l'endosome, grâce à son activité enzymatique lipolytique (Stahnke et al. 2011). Une fois libéré de l'endosome, l'AAV2 est ensuite transporté jusqu'au noyau grâce aux domaines BC2 et BC3 situés sur les protéines VP1 et VP2 qui forment le NLS (Sonntag et al. 2006).

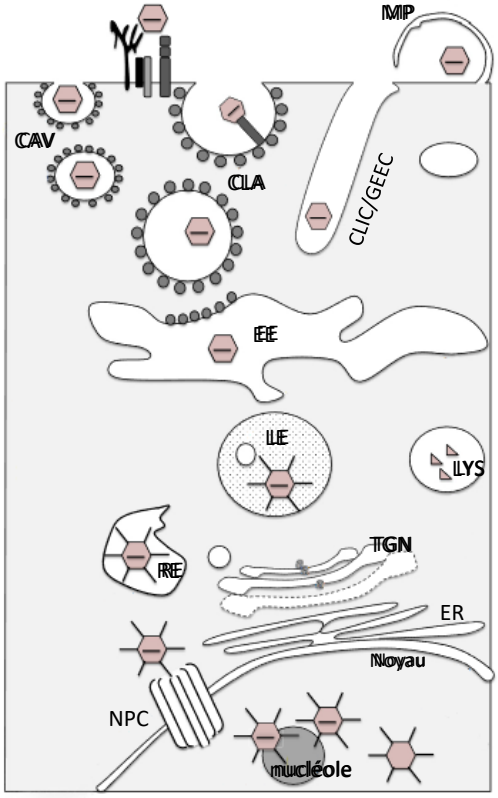


Figure 17: Entrée et transport intracellulaire des vecteurs AAV. *Après sa fixation aux récepteurs, l'AAV est internalisé par endocytose à Cavéoline (CAV), Clathrine (CLA), CLIC/GEEC, ou par macropinocytose (MP). L'AAV est ensuite retrouvé dans les endosomes précoces (EE), tardifs (LE), de recyclage (RE), mais aussi les lysosomes (LY) et le réseau trans-Golgi (TGN).* Adapté de Lisowski et al. 2015

c. Import nucléaire

Bien que le doute persiste sur le lieu de décapsidation entrainant une expression efficace, il est en tout cas certain que des particules entières d'AAV2 sont transportées dans le noyau (Johnson and Samulski 2009). Pour entrer dans le noyau, l'AAV2 utilise les protéines de la machinerie d'import nucléaire comme l'importine β1 qui interagit directement avec les domaines BC2 et BC3 de la capside (Nicolson and Samulski 2014). L'inhibition du protéasome

permet d'augmenter la translocation nucléaire de l'AAV2 et de l'AAV5, sans que le mécanisme soit connu (Duan et al. 2000; Yan et al. 2004). Enfin, l'induction de l'autophagie semble aussi augmenter l'import nucléaire des vecteurs AAV2 et 8, et par conséquent l'efficacité de l'expression de leurs transgènes (Hösel et al. 2017). Une fois dans le noyau, les particules entières d'AAV2 vont soit s'accumuler dans le nucléole où elles restent stables soit être mobilisées à certains sites du nucléoplasme permettant leur décapsidation (Johnson and Samulski 2009). Bien que les mécanismes de décapsidation restent mal compris, la taille du génome ou sa composition (simple ou double brin) semblent impacter le taux de décapsidation. En effet, le pourcentage de particules non décapsidées est plus faible lorsque le génome est de 4,7kb contre 3,4kb. De même, le pourcentage de particules non décapsidées est plus faible pour les AAV possédant un génome simple brin par rapport aux doubles brins (Horowitz et al. 2013).

d. Synthèse du second brin et expression génique

Une fois décapsidé, le génome AAV simple brin va être converti en ADN double brin par la machinerie cellulaire pour pouvoir s'exprimer. Plusieurs protéines cellulaires dont des protéines de la machinerie de réparation des doubles cassures d'ADN, sont connues pour interagir avec les ITR et réguler la conversion du génome AAV simple brin en double brin (Zentilin et al. 2001). Il a été montré que la forme phosphorylée du 52-kDa FK506-Binding Protein (FKBP52) interagit avec la séquence D et inhibe la synthèse du second brin (Qing et al. 2003). A ce propos, l'inhibition de la phosphorylation de la FKBP52 augmente l'efficacité de transduction de l'AAV2 (Jayandharan et al. 2008). La conversion du génome en AAV double brin peut aussi se faire par hybridation d'un ADN simple brin positif, avec un ADN simple brin négatif (les deux étant encapsidés dans les particules AAV) (Schultz and Chamberlain 2008).
D'autres protéines cellulaires interagissent avec le génome AAV et régulent son expression, comme le facteur de transcription cyclic AMP response element-binding protein (CREB) qui active l'expression du transgène (Dean et al. 2009) ou NF-kB-repressing factor (NRF) qui inhibe son expression en interagissant avec la séquence D (Ling et al. 2015). Enfin, la protéine zinc finger 5 (ZF5) se lie à la séquence RBE du génome AAV et inhibe l'expression du génome viral, sa réplication et la production d'AAV2 recombinants (Cathomen et al. 2001).

4) L'AAV en thérapie génique

a. Thérapies actuelles

Actuellement, 185 essais cliniques sont en cours pour le traitement de maladies génétiques par les vecteurs AAV (clinicaltrials.gov). Le premier traitement de thérapie génique par vecteur AAV a été mis sur le marché en 2012 en Europe. Il s'agit du Glybera, développé pour le traitement du déficit familial en lipoprotéine lipase. Ce traitement consiste à injecter 3.10^{12} copies par kilo d'AAV1 dont le génome code la lipoprotéine lipase. Faute de demande, il a récemment été retiré du marché (www.uniqure.com/GL_PR_Glybera%20withdrawal_FINAL_PDF.pdf), étant donné le prix de ce traitement qui s'élevait à 1 million de dollars. Fin 2017, le Luxturna, un AAV2 codant la protéine RPE65, une protéine de l'épithélium pigmentaire rétinien, et permettant de traiter l'amaurose congénitale de Leber a été approuvée par la FDA (www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-novel-gene-therapy-treat-patients-rare-form-inherited-vision-loss). Enfin, en mai 2019, un AAV9 codant le gène SMN1 et permettant de traiter les patients atteints d'Amyotrophie spinale (SMA) de type 1 a été approuvé par la FDA (www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-innovative-gene-therapy-treat-pediatric-patients-spinal-muscular-atrophy-rare-disease). Concernant le traitement des myopathies, un essai clinique mené par Audentes Therapeutics et Généthon visant à traiter la myopathie myotubulaire a montré des résultats spectaculaires sur les fonctions musculaires des patients (www.investors.audentestx.com/news-releases/news-release-details/audentes-therapeutics-presents-new-positive-interim-data-aspiro). Pour la DMD, un essai clinique réalisé en 2006 consistait en l'injection locale d'un AAV2 codant une microdystrophine. Cet essai avait donné peu de résultats (voir *Chapitre II) 6) d) Micro-dystrophine*). Trois nouveaux essais cliniques sont aujourd'hui en cours et consistent en l'injection systémique d'AAV9 ou AAVrh74 codant différentes microdystrophines. Concernant le traitement des myopathies des ceintures, limb girdle muscular dystrophy type 2C et 2E (LGMD2D et LGMD2E) menés par Sarepta Therapeutics et Myonexus, d'autres essais cliniques sont actuellement en cours (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01976091 et NCT03652259). Ces deux essais consistent en l'injection systémique d'un AAVrh74 dont le transgène code respectivement pour l'α-sarcoglycane et le β-sacroglycane. Enfin, concernant la LGMD2C, un essai clinique a eu lieu en

2011 et consistait en l'injection intramusculaire dans le bras des patients d'un AAV1 dont le transgène codait le γ-sarcoglycane. Cet essai n'a permis qu'une faible expression du γ-sarcoglycane, avec une expression dans seulement 4,7 à 10% des fibres musculaires (Herson et al. 2012). Aucun autre essai clinique pour le traitement de la LMG2C n'a été réalisé depuis.

b. Limites des vecteurs AAV

- **Capacité d'encapsidation**

La taille limite du transgène des vecteurs AAV est de 4,7 kb pour les vecteurs AAV simple brin. Bien que suffisante pour de nombreux transgènes, certains gènes comme la dystrophine ne peuvent pas être encapsidés dans ces vecteurs. La diminution de la taille des séquences promotrices, du signal de polyadénylation ou des ITR permettent d'augmenter légèrement la taille limite du transgène. Par exemple, le promoteur CMV peut être réduit de 600 à 173 paires de bases (pb) (Ostedgaard et al. 2005) tandis que les séquences de polyadénylation peuvent être réduites de 276 à 32pb (McFarland et al. 2006), sans que ces modifications ne diminuent l'efficacité de transduction. Lorsque ces modifications ne suffisent pas à l'encapsidation du transgène d'intérêt, d'autres solutions peuvent être envisagées comme la réduction de la taille du transgène ou le saut d'exons (voir Chapitre *II) 6) d)*) si la protéine reste fonctionnelle après de larges délétions, ou encore le trans-épissage *(*voir Chapitre *III) 5) c) Trans-épissage*).

- **Réponse immunitaire**

La réponse immunitaire reste l'une des principales barrières aux traitements de thérapie génique par vecteur AAV. Cette immunité peut être pré-existante ou se mettre en place après l'infection et peut être dirigée contre la capside du vecteur ou le transgène.

➢ <u>Réponse immunitaire contre la capside</u>

Une immunité préexistante envers les différents sérotypes d'AAV est présente au sein de la population. Celle-ci est plus fréquente pour les AAV1 et AAV2 que pour les autres sérotypes. Pour les AAV1 et 2, la séroprévalence des Immunoglobulines G (IgG) est de 67 et 72%, tandis qu'elle est inférieure à 50% pour les AAV5, 6, et 9 et inférieure à 40% pour l'AAV8 (Boutin et

al. 2010). Au sein des IgG, certains anticorps sont dits neutralisants, c'est-à-dire que leur fixation sur la capside de l'AAV va l'empêcher d'infecter une cellule, en plus d'activer l'immunité adaptative. Concernant leur séroprévalence, celle-ci est supérieure à 50% pour les AAV1 et 2, tandis qu'elle est de 19% pour l'AAV8 et de 33,5% pour l'AAV9. De plus, ces anticorps neutralisants sont présents en plus faibles concentrations pour les AAV8 et 9 que pour les AAV1 et 2. Le test préalable de la séropositivité des patients aux différents sérotypes d'AAV est donc essentiel avant leur injection. Lorsqu'elle n'est pas préexistante, une immunité adaptative contre la capside AAV peut se faire par la présentation d'antigènes de la capside par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) à la surface des cellules transduites. Cette présentation dépend du protéasome qui dégrade la capside de l'AAV après son échappement endosomal (Figure 18) (Colella et al. 2018). La présentation de peptides de la capside par le CMHI entraine l'apoptose des cellules induite par les lymphocytes T et la production d'anticorps anti-capside par les lymphocytes B (Li et al. 2013). L'immunité adaptative contre la capside empêche alors toute réinjection du même sérotype d'AAV à un patient.

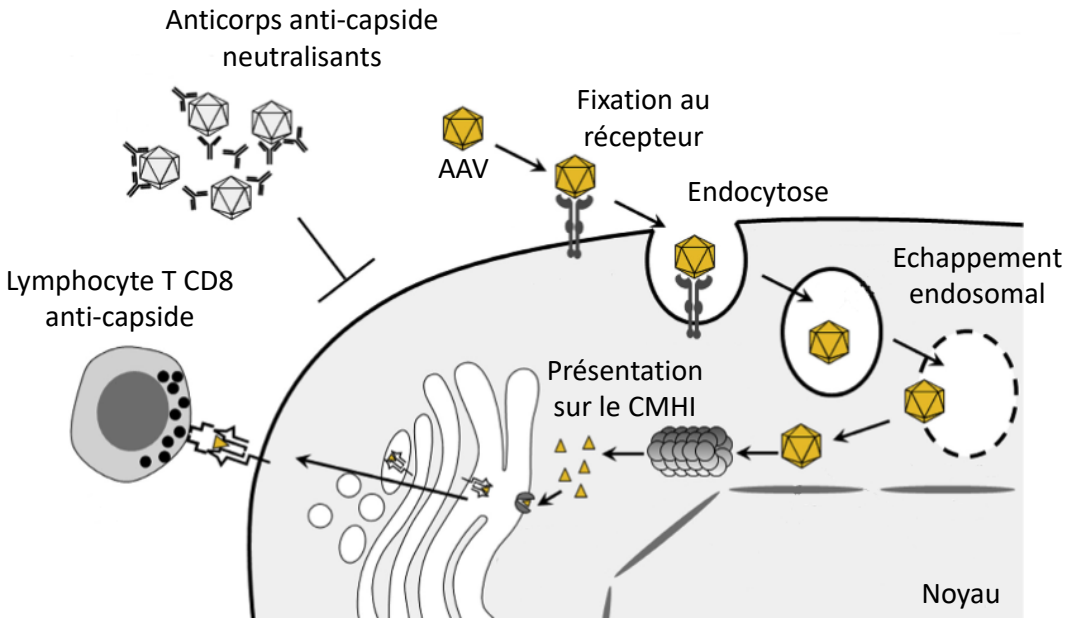


Figure 18: L'immunité anti-capside.
Après son échappement endosomal, la capside de l'AAV est dégradée par le protéasome, permettant sa présentation sur le CMHI. Cette présentation entraine l'apoptose des cellules par les lymphocytes T et la production d'anticorps anti-capside par les lymphocytes B. Adapté de Colella et al. 2018

- Réponse immunitaire contre le transgène

Après l'injection d'AAV, une réponse immunitaire contre le transgène peut également se mettre en place chez les patients. En effet, la protéine codée par le transgène est dans certains cas totalement absente de l'organisme hôte. Cette réponse immunitaire est médiée par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) qui après transduction par un vecteur AAV vont présenter les antigènes du transgène par le CMH de classe I ou de classe II. Cette présentation entraine l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8, aboutissant à une réponse adaptative contre le transgène (Zaiss and Muruve 2008) qui entraine à long-terme une diminution de son expression.

- Diminution de la réponse immunitaire chez le patient

Une immunosuppression transitoire lors d'injection de vecteurs AAV permet de contrer ce phénomène (McIntosh et al. 2012; Mingozzi et al. 2012). L'utilisation de vecteurs AAV possédant une capside chimère ou mosaïque (voir Chapitre *III)5)a)*) permet de diminuer drastiquement la séroprévalence d'anticorps dirigés contre la capside chez les patients. Cependant, l'injection d'un AAV2-microdystrophine a entrainé une forte réponse immunitaire contre le transgène chez les patients. Cet essai a montré l'importance de tester préalablement l'immunité préexistante des patients contre la protéine d'intérêt avant l'injection de vecteurs AAV (Mendell et al. 2012).

5) Optimisation des vecteurs AAV en thérapie génique

a. Optimisation de la capside

Afin d'obtenir des vecteurs AAV ayant un tropisme plus spécifique, une meilleure efficacité de transduction et/ou capables d'échapper à la réponse immunitaire, plusieurs méthodes permettant l'élaboration de nouvelles capsides ont été conçues.

- **Mutations rationnelles**

La mutation rationnelle consiste en la suppression d'épitopes connus pour activer le système immunitaire ou l'ajout d'un domaine de liaison à un récepteur particulier. Par exemple, la

mutation des résidus connus pour être reconnus par les anticorps neutralisants permet à l'AAV1 d'échapper à ces anticorps (Tse et al. 2017). La stratégie des capsides chimères consistent à l'élaboration de capsides composées de protéines VP issus de sérotypes différents ou dont un ou plusieurs domaines d'une protéine VP est issus d'un autre sérotype (Perabo et al. 2003). Elle permet notamment d'ajouter le domaine de liaison particulier d'un sérotype à la capside d'un autre sérotype. Par exemple, la capside de l'AAV2.5 correspond à la capside de l'AAV2 dans laquelle ont été introduits 5 résidus de l'AAV1 permettant le tropisme musculaire et dont les épitopes antigéniques ont été modifiés afin de réduire la neutralisation par les anticorps, *in vivo* chez la souris (Bowles et al. 2012). Cependant, l'injection intramusculaire d'un AAV2.5-minidystrophine chez des patients DMD n'a montré qu'une très faible expression du transgène et l'apparition d'une réponse immunitaire humorale avec une augmentation du taux d'anticorps neutralisants (Bowles et al. 2012). Le modèle murin ne semble donc pas être le plus adapté à l'étude de la réponse immunitaire entrainée par l'injection de vecteurs AAV. D'autres AAV hybrides ciblant le muscle squelettique ont été créés comme par exemple l'AAV2i8G9. Ce vecteur est composé d'une capside chimère des AAV2 et 8 (AAV2i8), dans laquelle a été inséré le site de fixation au galactose de la capside de l'AAV9. La capside de l'AAV2i8G9 permet de cibler plus efficacement le muscle squelettique et le cœur *in vivo* chez la souris avec une faible transduction du foie (Asokan et al. 2010; Shen et al. 2013). Enfin, la mutation ponctuelle de résidus tyrosines, prolines et sérines permet d'éviter l'ubiquitination et la dégradation des vecteurs AAV par le protéasome. Ainsi, le remplacement de résidus tyrosine par des résidus phénylalanine permet d'améliorer l'efficacité de transduction de l'AAV2 *in vitro* dans les cellules HeLa et *in vivo* dans les hépatocytes de souris (Zhong et al. 2008).

- **Evolution dirigée**

L'évolution dirigée consiste en la création de banques de capsides générées par plusieurs stratégies puis la sélection des capsides par un criblage à haut débit.

Les banques de capsides peuvent être obtenues par plusieurs techniques. La mutagénèse aléatoire dans le gène CAP peut se faire par une PCR provoquant un fort taux d'erreur dans l'ADN amplifié (error prone PCR) (Figure 19). Le nombre de mutations par cycle restant faible, plusieurs cycles de PCR ou la mutation ciblée d'une région spécifique de la capside peuvent

être réalisés. Cette stratégie a permis de générer l'AAVH6, un variant de l'AAV2, capable d'échapper aux facteurs neutralisants de sérums humains *in vitro* (Maersch et al. 2010). La stratégie des capsides mosaïques (capsid shuffling) consiste en la fragmentation des gènes Cap de plusieurs sérotypes d'AAV par des nucléases, suivi par leur ligation aléatoire (Kienle et al. 2012). Cette stratégie a notamment permis de générer l'AAV-Rec3, un sérotype capable de transduire efficacement la moelle épinière chez la souris (Siu et al. 2017). Dernièrement, un AAV dont la capside a été conçue à partir des AAV1/6/8/9 a montré un tropisme très spécifique du muscle avec notamment une forte transduction du diaphragme chez la souris (Herrmann, abstract ESGCT 2018). Enfin la création de nouvelles capsides peut se faire par l'insertion de peptides aléatoires (peptide display) (Müller et al. 2003). Par exemple, l'insertion du motif GETTRP dans le domaine de fixation au sulfate d'héparane de la capside de l'AAV2, permet une transduction efficace de toutes les couches de la rétine après injection intravitréenne (Dalkara et al. 2013).

Après génération des banques de capsides, des virus AAV contenant le gène Rep sauvage et le gène Cap tiré de la banque de capsides sont produits. Les cellules d'intérêt sont transduites en présence de ces virus AAV et d'adénovirus, permettant la réplication des AAV. Suite à la transduction, des PCR sont effectuées sur les génomes viraux afin d'identifier les capsides virales ayant permis la transduction la plus efficace. Les capsides identifiées peuvent alors subir de nouveaux cycles de mutagénèse aléatoire ou être testées plus spécifiquement *in vivo* ou *in vitro* (Dalkara et al. 2013). Ces nouveaux tests se font cette fois ci à partir de vecteurs AAV, le génome viral codant alors un gène rapporteur. L'efficacité de transduction est évaluée dans un type cellulaire ou un tissu particulier et peut se faire en présence ou non d'anticorps neutralisants, afin de tester les capacités d'échappement au système immunitaire de la nouvelle capside (Maersch et al. 2010).

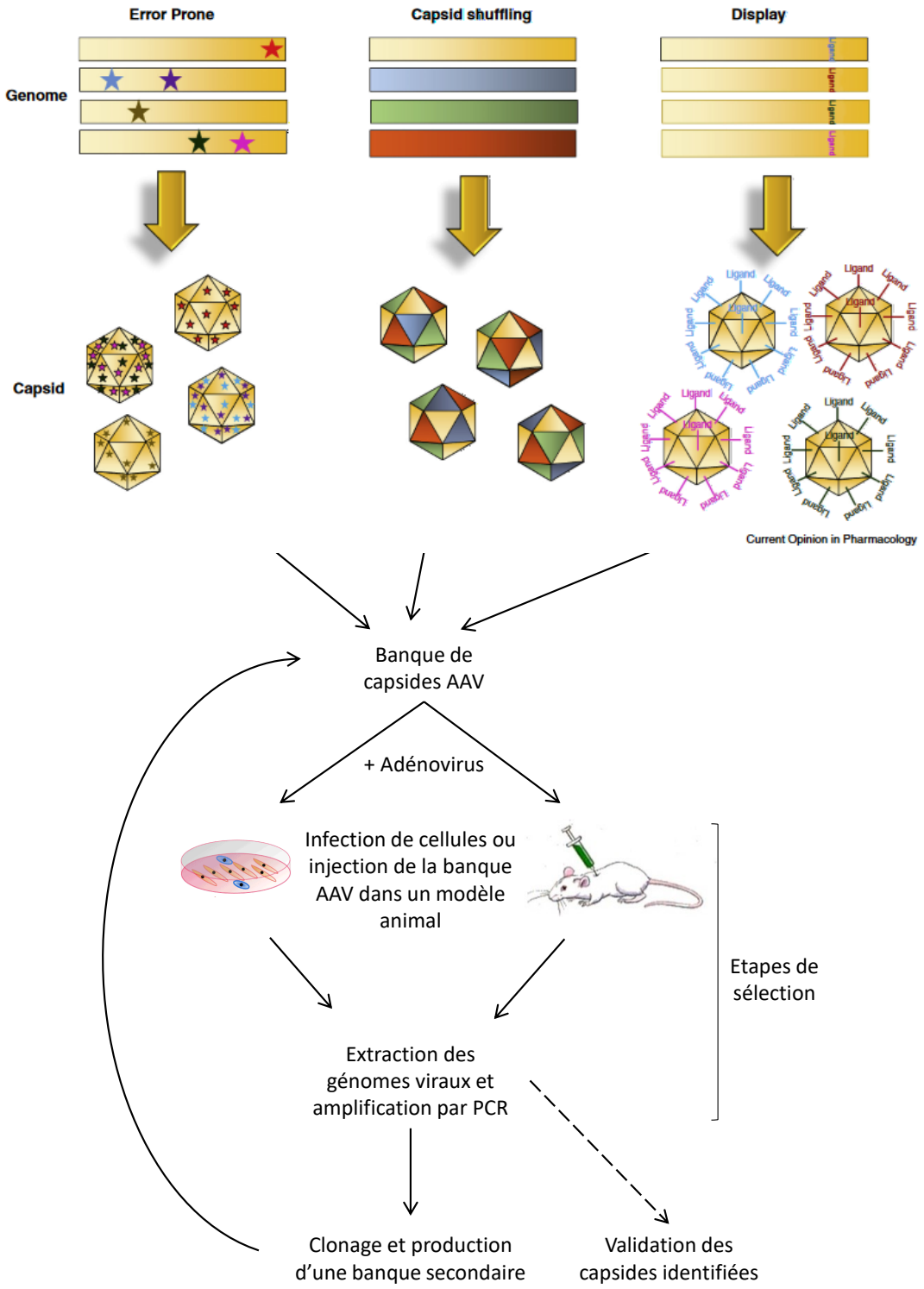


Figure 19: Evolution dirigée et criblages des banques de capsides AAV.

Les 3 différentes stratégies de mutations aléatoires utilisées pour l'évolution dirigée. Il s'agit de la mutagénèse aléatoire par PCR à fort taux d'erreur (Error Prone), les capsides mosaïques (Capsid shuffling) ou l'insertion de peptides aléatoires (peptide display) (Büning et al. 2015). Les différentes banques de capsides générées peuvent ensuite être criblées par sélection des virus AAV s'étant le plus amplifié dans les cellules préalablement infectées par la banque ou dans le tissu d'intérêt d'un modèle animal dans lequel la banque de capside a été injectée. Une fois les meilleures capsides sélectionnées, celles-ci peuvent être validées de façon plus spécifique in vivo ou in vitro.

b. Vecteurs AAV auto-complémentaires

La synthèse du second brin d'ADN est une étape nécessaire à l'expression du transgène par les vecteurs AAV. Elle est considérée comme une étape clé pour le transfert de gène par l'AAV parce qu'elle est strictement dépendante des protéines de la cellule hôte (McCarty et al. 2003). Pour contourner cette étape, des vecteurs AAV auto-complémentaires (ou self-complementary, scAAV), dont le génome encapsidé est déjà sous forme double brin, ont été conçus. Pour cela, le TRS de la région ITR située en 3' est supprimé, permettant d'inhiber le clivage ayant lieu lors de la réplication à partir de cet ITR, et donc la séparation des deux brins. Cette construction génère alors un génome simple brin contenant un ITR sauvage à chaque extrémité et l'ITR muté au centre des deux cassettes d'expression complémentaires qui peuvent s'apparier (Figure 20). Grâce à cette construction, le transgène est exprimé plus rapidement et l'efficacité de transduction est augmentée (McCarty et al. 2003). De plus, les scAAV sont capables de s'exprimer dans des cellules non permissives à l'AAV simple brin (ssAAV), comme les hépatocytes de souris, suggérant que ces cellules ne permettaient pas la synthèse du second brin d'ADN de l'AAV (McCarty et al. 2003). L'une des principales limites des scAAV est la taille limitée de la cassette d'expression qui ne peut pas excéder 2,4kb (Daya and Berns 2008).

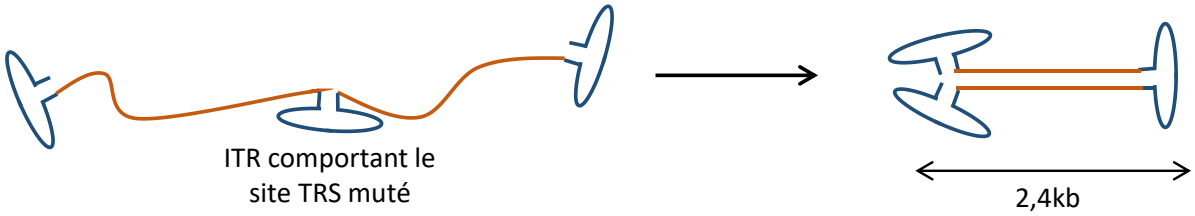


Figure 20: Conformation du génome des AAV auto-complémentaires.
Le génome des scAAV est composé des deux régions ITR sauvages situées aux extrémités et d'une région ITR centrale dont le site TRS est muté. Le clivage permettant la séparation des deux brins n'est donc pas possible à partir de cet ITR. Les deux cassettes d'expression (en orange) sont capables de s'apparier pour former un génome double brin de 2,4kb.

c. Trans-épissage

L'une des principales limites du transfert de gène par vecteur AAV est leur faible capacité d'encapsidation. La méthode du trans-épissage utilise la capacité de deux vecteurs AAV

différents à infecter la même cellule puis à recombiner leurs génomes, une fois dans le noyau. En effet, il a été montré que les génomes AAV s'organisent en concatémères circulaires après recombinaison homologues de leurs régions ITR (Flotte 2000). En se servant de cette propriété, deux vecteurs AAV sont conçus. L'un contient le promoteur, la partie 5' du transgène et une séquence d'épissage située en amont de l'ITR 3'. L'autre vecteur contient le site accepteur d'épissage, la partie 3' du transgène et la séquence polyA. Après transcription des deux génomes dans la cellule, la recombinaison se fait grâce à la machinerie d'épissage cellulaire qui forme alors un seul transcrit contenant la séquence complète du transgène (Figure 21). La co-transduction de ces deux AAV a permis l'expression de l'érythropoïétine *in vitro* dans des fibroblastes mais aussi *in vivo* dans le muscle de souris (Yan et al. 2000). Cette stratégie a également montré son efficacité pour l'expression d'une mini-dystrophine de 6kb chez la souris mdx (Lai et al. 2005). L'efficacité du trans-épissage semble être principalement liée au sérotype utilisé mais aussi à la séquence du transgène et notamment le site de jonction choisi (Ghosh et al. 2006; Lai et al. 2005).

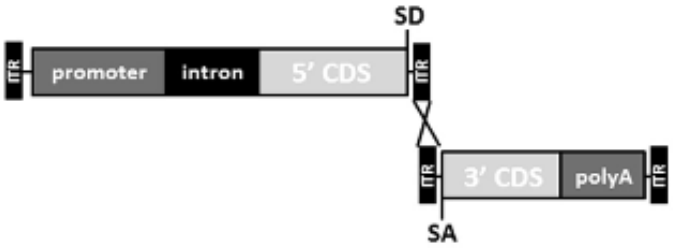


Figure 21: Composition des deux transcrits permettant le trans-épissage.
Le premier transcrit contient le promoteur, la partie 5' du transgène (5'CDS) et le site donneur d'épissage (SD) tandis que le deuxième transcrit contient le site accepteur d'épissage (SA), la partie 3' du transgène (3'CDS) et la séquence polyA. Colella et al. 2018

IV. Le système endosomal

1) Les différentes voies d'endocytose

L'endocytose est un mécanisme permettant d'internaliser de la membrane plasmique et du matériel extracellulaire (liquide ou solide) dans une cellule grâce à la formation d'une vésicule membranaire. L'endocytose dépend, entre autres, des protéines de manteau recouvrant la vésicule, des récepteurs membranaires et du réseau d'actine. Les vésicules nouvellement formées, appelées endosomes, permettent ensuite le tri, le transport, le recyclage, le stockage ou la dégradation des particules endocytées et sont donc responsables de la régulation de nombreuses voies cellulaires. Différents types d'endocytose existent et sont divisés en deux catégories : l'endocytose clathrine-dépendante et les endocytoses clathrine-indépendantes (Figure 22).

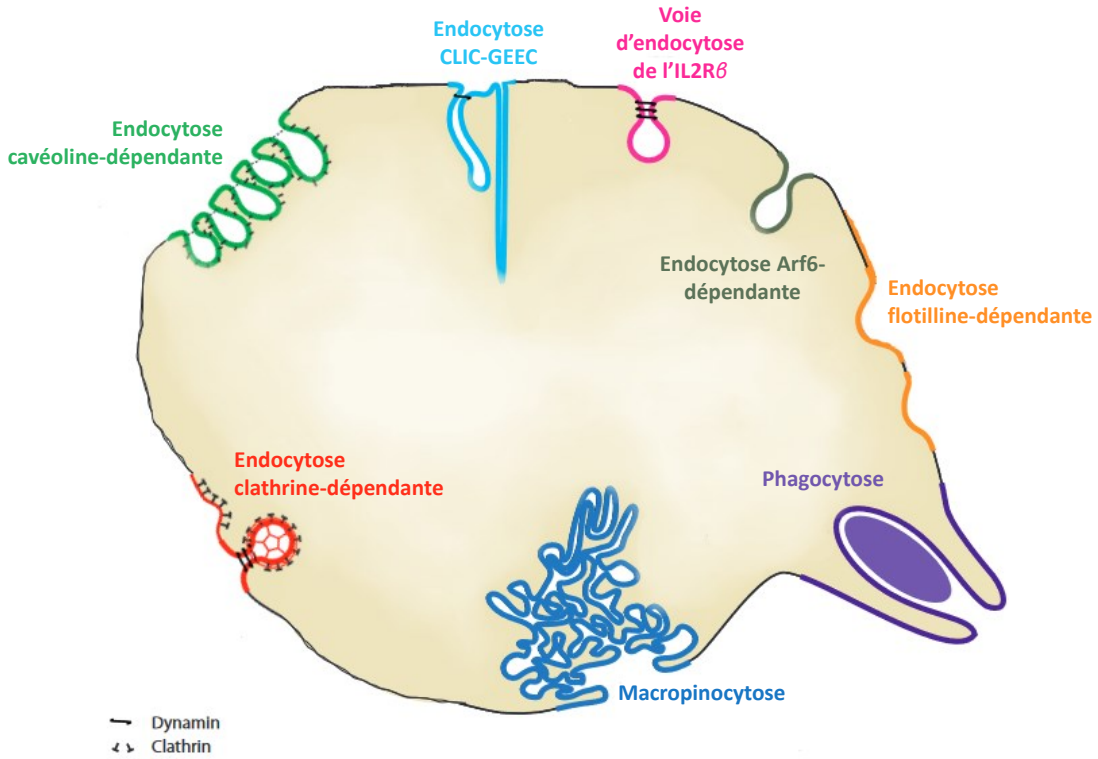


Figure 22: Les différentes voies d'endocytose.
L'internalisation de matériel cellulaire peut se faire par plusieurs mécanismes d'endocytose différents dont l'endocytose dépendante de la clathrine mais aussi l'endocytose cavéoline-dépendante, l'endocytose CLIC-GEEC, la macropinocytose, la phagocytose, l'endocytose flotilline-dépendante ou encore la voie d'endocytose de l'IL2R6. Adapté de Doherty and McMahon 2009

a. Endocytose clathrine-dépendante

L'endocytose clathrine-dépendante correspond à l'invagination d'une partie de la membrane plasmique recouverte d'un manteau de clathrine. Ces vésicules font environ 120nm de diamètre. Les clathrines sont des protéines du manteau composées de 3 chaines lourdes et 3 chaines légères assemblées en une structure à 3 branches dite triskell (Figure 23).

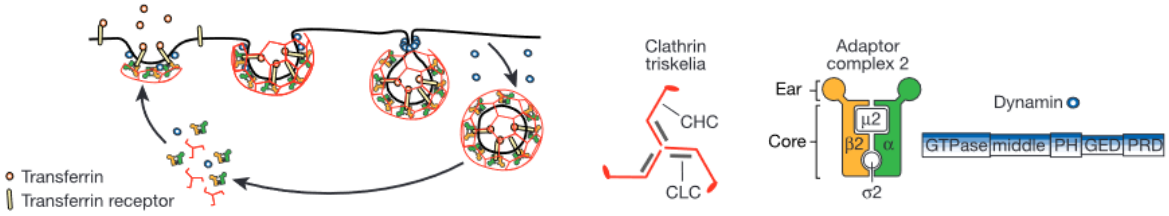


Figure 23: Endocytose clathrine-dépendante de la transferrine et protéines associées.
AP2 par son interaction avec le récepteur à la transferrine et les clathrines permet l'invagination de la membrane et l'endocytose de la transferrine. C'est la dynamine qui permet la libération de la vésicule dans le cytoplasme. Conner and Schmid, 2003

Leur assemblage à la membrane plasmique permet de générer des vésicules de taille homogène et dépend d'une protéine adaptatrice nommée AP2 (adaptator protein 2) (Traub 2009). AP2 est composée de 4 sous unités appelées adaptines. L'adaptine-α détermine le lieu d'assemblement des clathrines, par son interaction avec la membrane plasmique. L'adaptine-β interagit avec les clathrines et déclenche leur assemblage, l'adaptine-μ lie le domaine cytoplasmique des récepteurs transmembranaires afin de moduler leur concentration au sein de l'invagination et l'adaptine-σ a un rôle structural de stabilisation du complexe (Collins et al. 2002). Les protéines AP180 et l'epsine interagissent avec AP2 et sont impliquées dans la polymérisation des clathrines (Ford et al. 2001). C'est l'assemblage du manteau de clathrines qui permet la courbure et l'invagination des puits, aidé par le réseau d'actine (Merrifield et al. 2005). La libération des vésicules dans le cytoplasme est médiée par la dynamine et la polymérisation de l'actine qui est reliée à la dynamine par la cortactine (Merrifield et al. 2005). La dynamine est composée d'un domaine GTPase, un middle domain permettant son auto-assemblage, un domaine de fixation aux phosphoinositides membranaires appelé Pleckstrin Homology Domain (PH), un domaine régulant son auto-assemblage appelé GTPase Effector Domain (GED) et un domaine d'interaction protéique appelé Proline/arginine Rich Domain (PRD). Cette protéine GTPase s'assemble en spirale autour du cou de la vésicule naissante et

engendre sa fission (Hinshaw 2000). Une fois la vésicule libérée dans le cytoplasme, le manteau de clathrine se désassemble et la vésicule fusionne avec un endosome précoce. L'endocytose clathrine-dépendante est utilisée par de nombreux récepteurs dont ceux de la transferrine (Cao et al. 2016) et du Facteur de croissance épidermique (EGF) (Sousa et al. 2012). Lorsque l'EGF est présent en faible concentration, il est internalisé par endocytose-clathrine dépendante tandis qu'il est internalisé par la voie dépendante des cavéoles lorsqu'il est présent en forte concentration. Ce changement de voie d'internalisation provoque une diminution de la quantité d'EGFR présent à la membrane, suggérant que les voies d'endocytose sont des mécanismes très régulés et que le choix de la voie d'endocytose peut influencer le reste de la signalisation (Sigismund et al. 2005).

b. Endocytose clathrine-indépendante

- **Endocytose cavéoline-dépendante**

Les cavéoles sont des radeaux lipidiques de la membrane plasmique, enrichis en cholestérol et sphingolipides. Leur organisation dépend des cavéolines 1, 2 et 3 qui sont des protéines dimériques interagissant avec le cholestérol par la formation d'une boucle dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Les cavéoles sont des structures statiques de la membrane plasmique (Thomsen et al. 2002) et leur internalisation est médiée par la fixation d'une molécule sur son récepteur entrainant une cascade de signalisation et la phosphorylation des cavéolines (Pelkmans and Helenius 2002) (Figure 24).

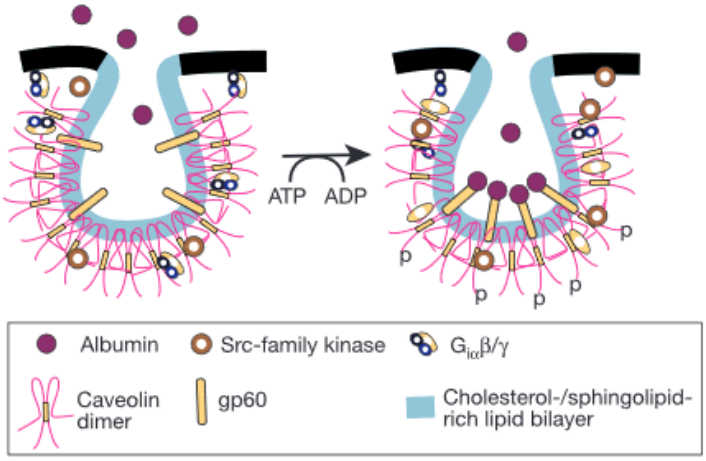


Figure 24: Endocytose cavéoline-dépendante de l'albumine et protéines associées.
L'intéraction de l'albumine avec son récepteur, le gp60, entraine l'activation d'une voie de signalisation et la phosphorylation de la cavéoline. C'est cette phosphorylation qui entraine leur internalisation. Conner and Schmid, 2003

D'autres protéines, les cavines, interagissent avec les cavéolines pour permettre leur assemblage et le maintien de leur structure. La déplétion du cholestérol dans la membrane plasmique ou la surexpression d'une cavéoline mutante engendre la perturbation des cavéoles (Drab et al. 2001). La dynamine et l'actine participent également à leur internalisation. Les cavéoles mesurent entre 50 et 100nm de diamètre et sont impliquées dans l'endocytose de plusieurs ligands dont l'AAV2 (Nonnenmacher and Weber 2011) et le virus SV40 (Pelkmans and Helenius 2002). En plus de leur fonction dans l'endocytose, les cavéoles sont connues pour jouer un rôle de senseur et régulateur de la tension de la membrane plasmique induite par le stress mécanique dans les cellules musculaires (Sinha et al. 2011).

- **Voie CLIC-GEEC**

La voie CLIC-GEEC (Clathrin-Independent Carriers / Glycosyl Phosphatidyl Inositol (GPI) anchored protein Enriched Endocytic Compartments) permet l'internalisation de protéines possédant une ancre glycosylphophatidylinositol (GPI). La clusterisation de ces protéines engendre la courbure de la membrane et forme après scission des vésicules de forme tubulaire. La libération des vésicules formées nécessite la présence de la dynamine (Ferreira and Boucrot 2018).

- **Endocytose Arf6-dépendante**

L'endocytose dépendante d'Arf6 permet également l'internalisation de protéine à ancre GPI dont le canal à potassium Kir3.4. Contrairement à la voie CLIC-GEEC, la dynamine n'est pas impliquée dans la fission des vésicules formées (Doherty and McMahon 2009).

- **Voie de l'IL2Rβ ou voie FEME**

La voie FEME (Fast Endophilin-Mediated Endocytosis), est médiée par l'endophiline (Figure 25). Cette protéine est capable de se lier à l'actine et aux récepteurs possédant un motif riche en prolines par son domaine SH3, mais à une autre endophiline pour former un pont entre deux parties de la membrane. La fission de la vésicule formée est ensuite médiée par la

dynamine. Cette voie d'endocytose est notamment utilisée par le récepteur β de l'interleukine 2 (IL2Rβ) dans les lymphocytes T (Boucrot et al. 2015).

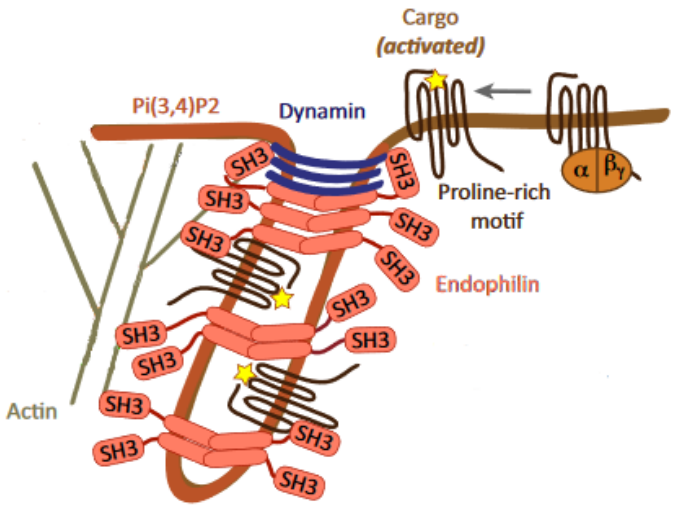


Figure 25: Voie FEME.
La voie FEME permet l'endocytose de récepteurs possédant un domaine riche en prolines grâce à l'endophiline, une protéine capable de faire le lien entre le récepteur, le réseau d'actine mais aussi avec une autre endophiline afin de permettre la courbure de la membrane. Adapté de Ferreira and Boucrot, 2018

- **Endocytose flotilline-dépendante**

Cette voie d'endocytose est semblable à celle des cavéoles. Les flotillines 1 et 2 sont associées à des radeaux lipidiques et forment des microdomaines de la membrane plasmique entrainant la courbure de la membrane puis son bourgeonnement (Frick et al. 2007). Elle permet notamment l'internalisation des précurseurs amyloïdes dans les neurones (Schneider et al. 2008).

c. Endocytose de grosses molécules ou pathogènes

- **Macropinocytose**

La macropinocytose est activée par des signaux extérieurs dont une concentration élevée en facteurs de croissance ou la présence de chimiokines. Leur fixation à des récepteurs de type tyrosine-kinase déclenche une cascade de signalisation provocant la formation de protrusions membranaires qui vont ensuite fusionner avec la membrane plasmique et générer de larges vésicules appelées macropinosomes (Figure 26). La macropinocyose est un processus dépendant de l'actine qui entraine l'internalisation de fluides extracellulaires mais aussi de

tous les récepteurs présents sur la membrane formant le macropinosome (Ferreira and Boucrot 2018).

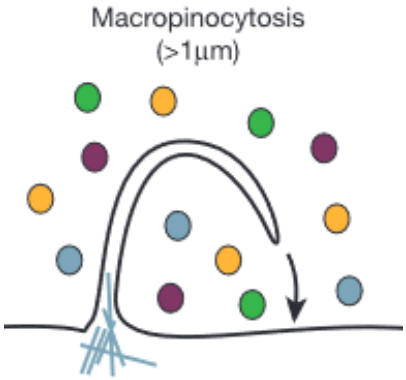


Figure 26: La macropinocytose.
La macropinocytose correspond à l'internalisation d'une partie du milieu extracellulaire par la formation de protrusions grâce à l'actine qui après fusion avec la membrane plasmique forment des vésicules appelées macropinosomes. Conner and Schmid, 2003

- **Phagocytose**

La phagocytose est spécifique de certains types cellulaires dont les macrophages, les monocytes et les neutrophiles. Elle permet l'internalisation de larges pathogènes, comme des bactéries, ou de débris cellulaires. Sur les macrophages, le récepteur Fc est activé par les anticorps liés à un antigène (Figure 27). Son activation entraine une cascade de signalisation comprenant l'activation des protéines Rho-GTPases, Rac et Cdc42, et la formation d'extensions de la membrane plasmique médiées par l'actine, qui vont alors entourer le pathogène puis l'engloutir. L'internalisation conduit à la formation d'une grosse vésicule appelée phagosome dont le contenu sera dégradé après fusion avec un lysosome (Conner and Schmid 2003).

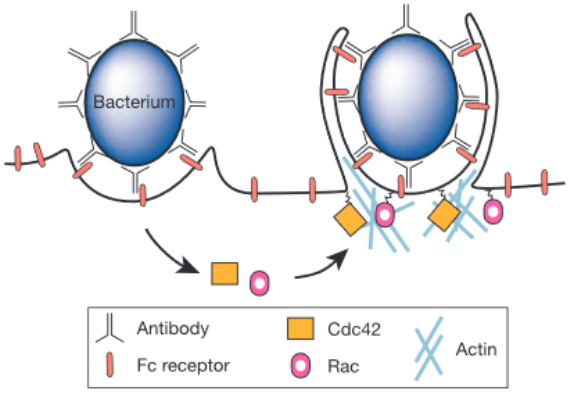


Figure 27: Phagocytose d'une bactérie par l'intermédiaire du récepteur Fc.
La fixation du complexe anticorps-bactérie entraine l'activation des protéines Cdc42 et Rac qui vont activer la polymérisation de l'actine et la phagocytose du complexe. Conner and Schmid, 2003

2) Le transport endo-lyososomal

Quelle que soit la voie d'internalisation, toutes les vésicules d'endocytose fusionnent avec un endosome précoce, également appelé endosome de tri (Figure 28). Les différentes molécules contenues dans ces vésicules sont ensuite redirigées vers la membrane par la voie de recyclage, ou dégradées par la voie de dégradation. Les molécules sont délivrées aux différentes voies grâce à la formation de tubules ou de vacuoles à la membrane de l'endosome précoce qui vont ensuite se détacher de l'endosome par un mécanisme de fission puis maturer en endosomes tardifs et lysosomes pour la voie de dégradation, ou en endosome de recyclage pour la voie de recyclage (Barford et al. 2017). L'endosome précoce envoie également des vésicules au réseau Trans-Golgien (TGN) par l'intermédiaire du rétromère (Taguchi 2013).

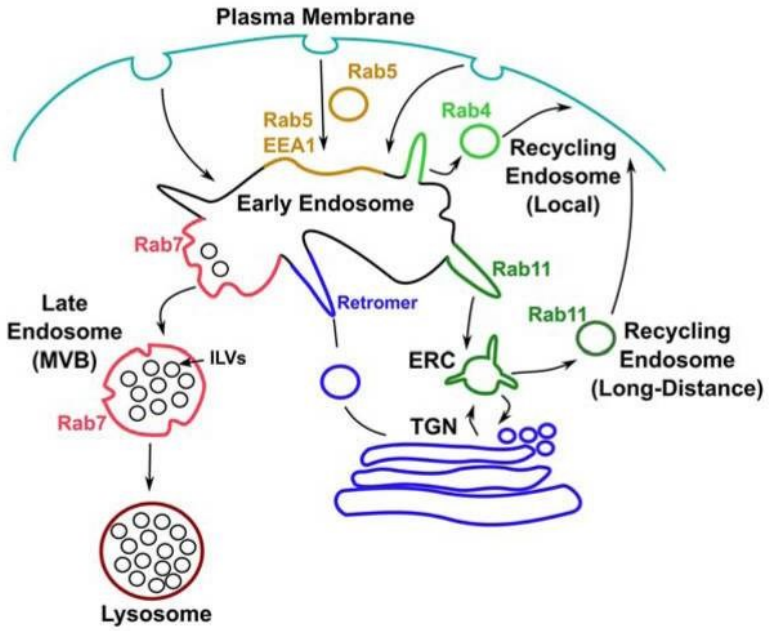


Figure 28: Devenir des endosomes précoces.
Après internalisation, les vésicules d'endocytose fusionnent avec un endosome de tri appelé endosome précoce. Cet endosome redirige les cargos vers la voie de dégradation (en rouge) ou la voie de recyclage qui peut être rapide (en vert clair) ou lente (en vert foncé). Barford et al, 2017

a. Déterminants moléculaires des endosomes précoces

Les endosomes précoces sont caractérisés par la présence de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) dans leur membrane mais également la présence des protéines Early Endosome Antigen 1 (EEA1) et Rab5. EEA1 est une grande protéine en super-hélice qui contient deux domaines de liaison à Rab5 et deux domaines zinc-fingers permettant de lier le PI(3)P. La protéine Rab5 qui est localisée sur les vésicules d'endocytose et les endosomes

précoces et dont il existe 3 isoformes (Rab5a, Rab5b et Rab5c) fait partie de la famille des Rab-GTPase (Ras-Related GTP binding protein). Ces protéines sont présentes à la surface de nombreuses vésicules et participent à la définition de leur identité moléculaire (Langemeyer et al. 2018; Zerial and McBride 2001). Ces protéines appartiennent à la superfamille des petites protéines G et contrôlent la formation, la fusion et le transport vésiculaire. Les Rab-GTPases peuvent être sous forme active, liées au GTP, ou inactive, liées au GDP. Lorsqu'elles sont inactives, les protéines Rab forment un complexe avec le GDP Dissociation Inhibitor (GDI). Le GDI empêche la fixation des protéines Rab avec les membranes, en masquant leurs groupes prénylés. C'est le GDI-Displacement Factor (GDF) qui permet la dissociation du complexe Rab-GDI et l'insertion des groupes prénylés de la protéine Rab dans la membrane (Pfeffer and Aivazian 2004). Une fois dans la membrane, c'est la protéine Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) qui catalyse le remplacement du GDP par un GTP et permet alors l'interaction de la protéine Rab avec ses effecteurs. Les protéines Rab étant des enzymes incomplètes, l'hydrolyse du GTP nécessite l'intervention d'une GTPase Activating Protein (GAP). Une fois inactive, la protéine Rab est retirée de la membrane par une protéine GDI.

b. La fusion endosomale des endosomes précoces

Les endosomes précoces fusionnent entre eux par fusion homotypique et avec les vésicules d'endocytose par fusion hétérotypique. Cette fusion endosomale est médiée par la protéine Rab5, connue pour être le principal régulateur de la biogénèse et de la fusion des endosomes précoces. En effet, après surexpression d'une protéine Rab5 défective pour la fixation du GTP, la fusion endosomale est inhibée (Gorvel et al. 1991). Lors de la surexpression d'une protéine Rab5 constitutivement active (toujours liée à un GTP), la fusion endosomale est augmentée, provoquant l'apparition d'endosomes plus larges (Stenmark et al. 1994). De plus, l'inhibition des 3 isoformes de la protéine Rab5 par ARN interférence provoque une réduction du nombre d'endosomes précoces, suivi par une diminution du nombre d'endosomes tardifs et de lysosomes (Zeigerer et al. 2012). Lorsqu'elle est sous sa forme active, Rab5 interagit avec ses effecteurs. Il s'agit des protéines EEA1, Rabaptin-5, p150, p110β et Rabenosyn-5. La rabaptin-5 forme un complexe avec la protéine Rabex-5 (la GEF spécifique de Rab5) qui catalyse le changement de nucléotide GDP en GTP et permet de créer un environnement riche en Rab5

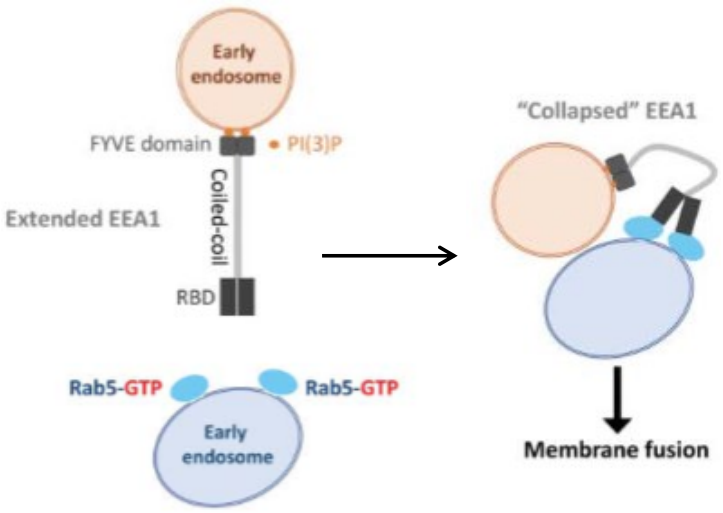


Figure 29: Rôle de la protéine EEA1 dans la fusion endosomale.
EEA1 est capable de lier des endosomes précoces grâce à ses domaines de liaison aux PI(3)P (domaine FYVE) et ses domaines de liaison aux Rab5-GTP (domaine RBD). La fixation des PI(3)P et de Rab5-GTP entraine la courbure de EEA1 et le rapprochement des deux endosomes, nécessaire à leur fusion. Adapté de Pylypenko et al. 2018

activées, là où sont recrutés les autres effecteurs de Rab5 (Horiuchi et al. 1997). Les deux phosphatidylinositol-3-kinases (PI(3)K) p110β et VPS34, qui lient Rab5 par l'intermédiaire de p150, phosphorylent spécifiquement le phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) (Christoforidis et al. 1999). Le PI(3)P est essentiel à la fixation de la protéine EEA1 par ses domaines zinc-fingers (ou domaines FYVE, figure 29). En plus de ses domaines de fixation au PI(3)P, EEA1 possède deux domaines de liaisons aux protéines Rab5 (domaines Rab-GTPase Bindind Protein ou RBD). EEA1 est donc capable de lier deux endosomes précoces (Lawe et al. 2002) et de permettre leur rapprochement grâce à un changement conformationnel, induit par sa fixation à Rab5-GTP (Pylypenko et al. 2018). En effet l'expression d'une protéine EEA1 mutante ayant perdu sa flexibilité, entraine l'accumulation de vésicules autour de l'endosome, traduisant un défaut de fusion (Murray et al. 2016). Enfin, Rabenosyn-5 régule la formation et la dissociation du complexe Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment protein Receptors (SNARE), composé des syntaxines 6 et 13 (Nielsen et al. 2000). Les SNAREs vont permettre d'apposer étroitement les membranes des deux vésicules, donnant lieu à la fusion membranaire.

c. Voie de recyclage

Après endocytose, la majorité des récepteurs et lipides membranaires ont besoin d'être recyclés à la membrane. Pour cela, deux voies de recyclage existent. La première, dite rapide, correspond au retour à la membrane directement depuis l'endosome précoce. Cette voie de recyclage directe fait intervenir la GTPase Rab4 (Figure 27) (van der Sluijs et al. 1992). La

deuxième, dite lente, correspond au passage par les endosomes précoces, puis les endosomes de recyclage Rab11 positifs, avant de regagner la membrane (Ullrich et al. 1996). Cette voie de recyclage peut aussi comprendre un passage par le réseau trans-Golgien. La détermination de la voie de recyclage dépend de la GTPase présente, Rab4 et Rab11 étant localisées dans des domaines distincts des endosomes précoces. La protéine Rabenosyne-5 interagit avec Rab4, mais pas avec Rab11, et favorise la voie de recyclage rapide. En effet, sa surexpression entraine un élargissement endosomal, une augmentation du taux de recyclage rapide ainsi qu'une diminution du transport périnucléaire des vésicules Rab11 positives (de Renzis et al. 2002). La voie de recyclage lente est régulée par les protéines phosphatidylinositol 3-kinase de classe IIα (PI3K-C2α) et la Myotubularin 1 (MTM1). Sur les endosomes précoces, la majorité des PI(3)P sont produits par des PI3K de classe III. La production de PI(3)P par une PI3K de classe II, la PI3K-C2α, active Rab11 qui est alors capable de lier MTM1, une PI(3)P phosphatase donc l'activité enzymatique permet la fission de la vésicule et son transport jusqu'à l'endosome de recyclage. L'inhibition de MTM1 par ARN interférence entraine une diminution de la fission et de l'accumulation périnucléaire des cargos de recyclage (Campa et al. 2018). Rab11 interagit également avec la myosine, les kinésines et la dynéine par l'intermédiaire de la protéine Rab11 family of interacting proteins 2 (Rab11-FIP2), permettant le déplacement des vésicules le long de l'actine et des microtubules (Lindsay et al. 2013; Machesky 2019). La transferrine, une protéine très utilisée pour l'étude de la voie de recyclage, est internalisée après fixation sur son récepteur, le TfR. Suite à l'internalisation, le récepteur est rapidement recyclé par la voie rapide de recyclage, où transite à travers l'endosome précoce puis l'endosome de recyclage Rab11 positifs afin de regagner la membrane (Tanaka et al. 2016).

d. Voie de dégradation

Les récepteurs et protéines ayant besoin d'être dégradés sont placés dans une zone de l'endosome précoce qui va bourgeonner puis former un endosome tardif, aussi appelé corps-multivésiculaire (MVB). La maturation en endosome tardif nécessite le remodelage des lipides et protéines membranaires (notamment de Rab5 par Rab7), l'acidification de l'endosome et la formation de vésicules intra-luminales. L'endosome tardif fusionne ensuite avec un lysosome pour permettre la dégradation des protéines qu'il contient. Il peut aussi fusionner

avec la membrane plasmique pour relarguer ses vésicules, alors appelées exosomes (Trajkovic et al. 2008).

- **Maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs**

L'échange des GTPases Rab5 par Rab7 se fait grâce au recrutement du complexe Monensin Sensitivity 1 - Calcium Cafein Zinc Sensitivity 1 (Mon1-Ccz1) par Rab5-GTP (Figure 30). Ce complexe induit le relargage de Rabex5 et le recrutement de la GAP spécifique de Rab5 pour provoquer l'inactivation du Rab5 présent. De plus, Mon1-Ccz1 interagit avec le complexe Homotypic Fusion and vacuole Protein Sorting (HOPS), qui est la GEF spécifique de Rab7 et qui permet son recrutement et son activation (Huotari and Helenius 2011; Poteryaev et al. 2010).

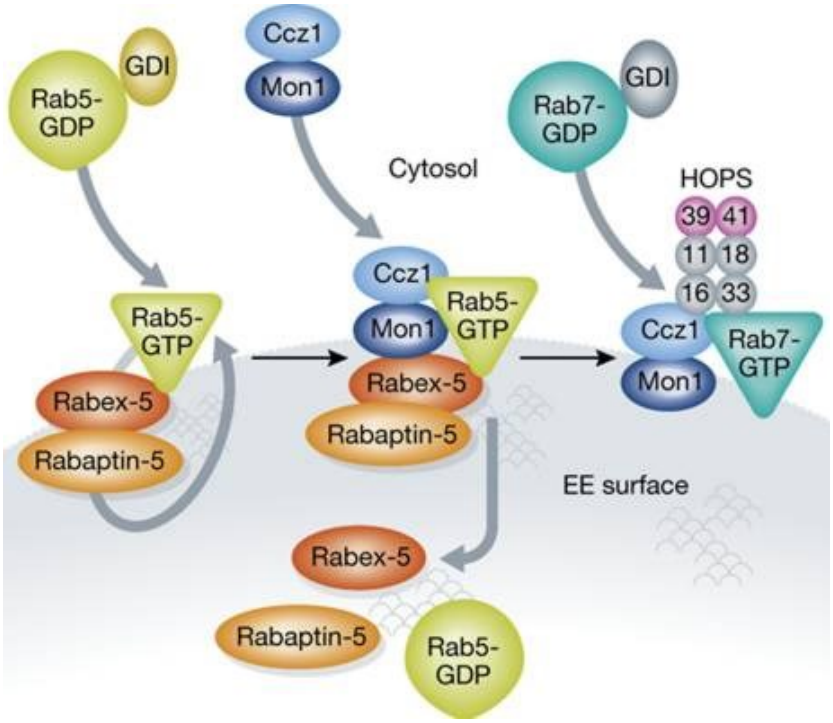


Figure 30: Echange des GTPases Rab5 par Rab7 médié par le complexe Mon1-Ccz1 et activation de Rab7 par le complexe HOPS.
La fixation du complexe Mon1-Ccz1 sur Rab5 entraine la dissociation de Rabex-5 et Rabaptin-5 et l'inactivation du Rab5-GTP en Rab5GDP. Le complexe HOPS permet ensuite le recrutement et l'activation de Rab7. Huotari et al. 2011

Le PI(3)P est converti en PI(3,5)P par la kinase PIKfyve (McCartney et al. 2014). Les pompes à proton V-ATPase sont responsables de l'acidification des endosomes et lysosomes, dont le pH est environ de 6 pour les endosomes précoces, 5,5 pour les endosomes tardifs et 5 pour les lysosomes. Cette acidification permet le découplage récepteur/ligand ainsi que l'activation de

certaines enzymes lysosomales. La formation de vésicules intra-luminales (ILV) contenant des protéines et récepteurs ubiquitinylés et destinés à être dégradés (Figure 31) est médiée par la machinerie Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT) composée des complexes ESCRT0, I, II et III (Wollert and Hurley 2010).

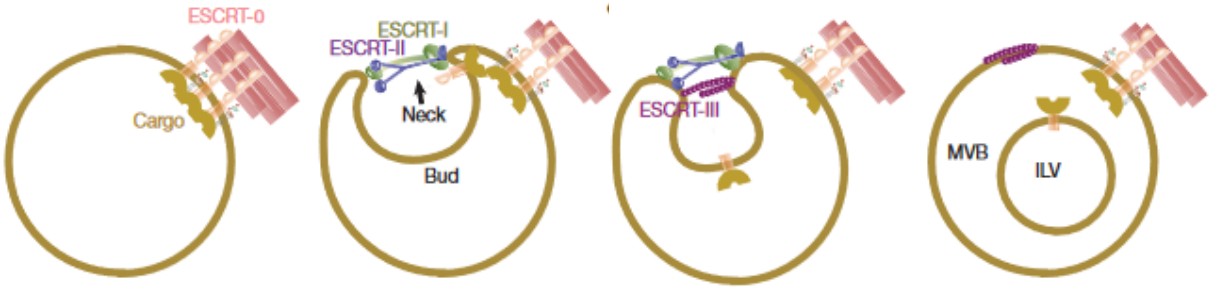


Figure 31: Formation des vésicules intraluminales médiée par la machinerie ESCRT.
ESCRT-0 rassemble les protéines à internaliser dans l'ILV a un endroit de la membrane, ESCRT-I et ESCRT-II permettent la déformation de la membrane formant un bourgeonnement dans lequel la protéine à internaliser est séquestrée puis ESCRT-III forme un cou autour de la vésicule et provoque sa fission.
Wollert and Hurley, 2010

Enfin, au cours de leur maturation, les endosomes transitent de la membrane jusqu'à la zone péri-nucléaire grâce aux microtubules et la dynéine, qui lie les endosomes par l'intermédiaire de Rab7 (Vonderheit and Helenius 2005). Ce transport semble essentiel à la maturation des endosomes car après l'application d'une drogue dérégulant les microtubules, leur maturation a été montrée comme ralentie, avec une persistance de la protéine Rab5 en même temps que Rab7 (Vonderheit and Helenius 2005). Enfin, l'annexine A2, ARP2/3, la moesine et la cortactine permettent la nucléation et la polymérisation de filaments d'actine à partir de la membrane endosomale, essentielle à la maturation et au transport des endosomes (Morel et al. 2009; Muriel et al. 2016). La dépolymérisation de l'actine a en effet été montrée comme inhibant le transport et la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs (Morel et al. 2009). De plus, l'acidification endosomale semble avoir lieu uniquement dans la zone périnucléaire et après le transport microtubulaire (Lakadamyali et al. 2003).

L'EGF est une protéine très utilisée pour l'étude de la voie de dégradation endo-lysosomale. En effet, après fixation à l'EGFR, le complexe est transporté dans un endosome précoce puis

transite à travers les endosomes tardifs, puis les lysosomes, afin d'être dégradé (Tanaka et al. 2016).

- **Fusion des endosomes tardifs et autophagosomes avec les lysosomes**

Les lysosomes permettent la dégradation de protéines et composants cellulaires grâce à leurs enzymes hydrolytiques et protéolytiques, dont les cathepsines. Le Cation Indépendant-Mannose 6 Phosphate Récepteur (CI-MPR), situé sur les endosomes tardifs permet la fixation des hydrolases et leur acheminement jusqu'aux lysosomes (Dahms et al. 2008; Kubisch et al. 2014). Ces organelles possèdent à leur membrane les protéines Lysosome-associated membrane protein 1 et 2 (LAMP1 et LAMP2) qui y forment une couche glycosylée permettant la protection de la membrane contre les hydrolases. La fusion des lysosomes avec les endosomes tardifs fait notamment intervenir le complexe HOPS, qui est aussi impliqué dans la maturation des endosome tardifs par son interaction avec Rab7 et la SNARE syntaxine 17 qui permet la fusion des membranes (Balderhaar and Ungermann 2013; Itakura et al. 2012; Yu et al. 2018).

Les lysosomes permettent aussi la dégradation du matériel cellulaire contenu dans les autophagosomes. Ce dernier mécanisme, appelé autophagie, commence avec la formation d'un phagophore qui va entourer une petite portion du cytoplasme puis former une organelle à double membrane appelée autophagosome (Hansen and Johansen 2011) (Figure 32). Seule la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec le lysosome et la membrane interne est dégradée par les hydrolases.

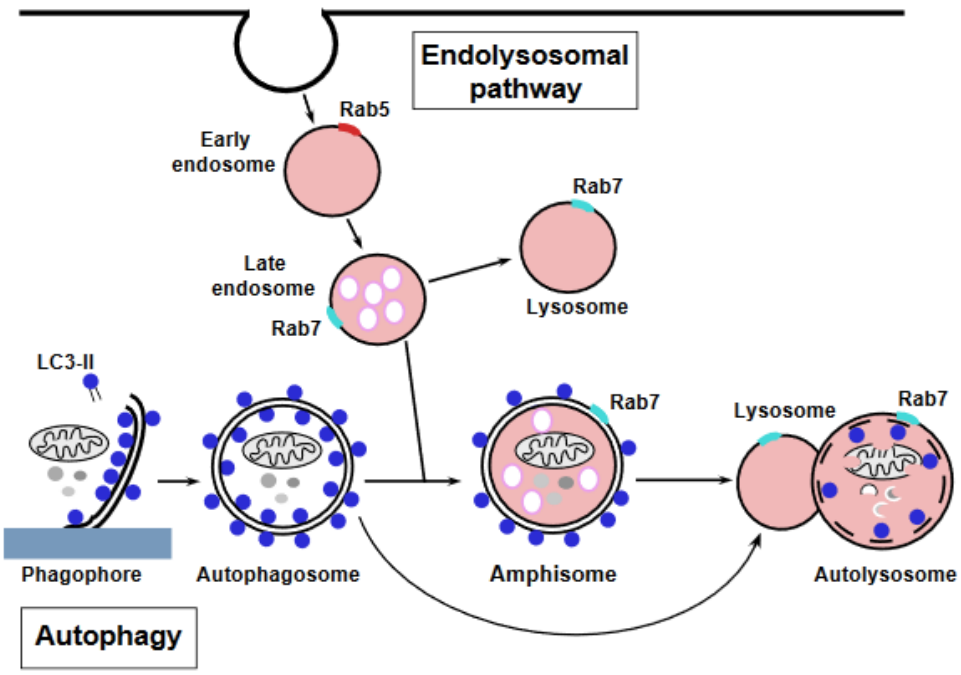


Figure 32: Interconnections des voies endolysosomales et autophagiques.
Les phagophores entourent une petite portion du cytoplasme pour former une organelle à double membrane appelée autophagosome. L'autophagosome peut fusionner avec un endosome tardif et former un amphisome, qui pourra ensuite fusionner avec un lysosome, ou l'autophagosome peut fusionner directement avec le lysosome et former un autolysosome. Hansen and Johansen 2011

3) Dérégulations du système endosomal et pathologies

- **Alzheimer et la trisomie 21**

Les patients atteints de trisomie 21 ont des lésions du système nerveux central semblables à celles observées chez les patients atteint de la maladie d'Alzheimer, dont la présence de plaques amyloïdes au niveau des neurones. Ces plaques amyloïdes sont la conséquence d'une accumulation d'un peptide toxique amyloïde-β (Aβ), qui est un fragment de la protéine Amyloid Precursor Protein (APP), produit dans l'endosome suite au clivage de l'APP par la β-sécrétase puis la γ-sécrétase (Sinha et al. 1999). Le peptide Aβ est soluble et non toxique mais son oligomérisation forme des fibrilles insolubles également appelées plaques séniles. L'internalisation de l'APP se fait par endocytose clathrine-dépendante (Nordstedt et al. 1993) puis elle transite vers les endosomes précoces où a lieu son clivage. Le peptide Aβ est ensuite soit redirigé à la membrane, soit dégradé par les lysosomes. L'accumulation des plaques

séniles apparait lorsque le peptide Aβ est produit en trop grande quantité ou qu'il n'est pas suffisamment dégradé.

Chez les patients atteints de ces deux maladies, des anomalies du système endosomal sont observées bien avant l'apparition des plaques amyloïdes (Cataldo et al. 2000). Dans les fibroblastes de patients atteints de trisomie 21, on observe une augmentation de la taille des endosomes précoces et tardifs, une surexpression de Rab4, Rab5 et Rab7 et une augmentation de l'endocytose (Cataldo et al. 2008). L'expression d'une protéine Rab5 constitutivement inactive dans cette cellule entraine la restauration de la taille des endosomes tardifs, montrant un rôle direct entre ces dérégulations et la voie endosomale précoce. De plus, un des récépteurs aux hydrolases lysosomales, le MPR46 est anormalement localisé dans les endosomes précoces (Cataldo et al. 2008). L'accumulation de vacuoles autophagiques et un défaut d'acidification des lysosomes, dû à un dysfonctionnement de la V-ATPase ont été observés dans le cerveau d'un modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Lee et al. 2010) et l'Aβ s'accumule anormalement dans les lysosomes d'un autre modèle murin de la maladie d'Alzheimer (Lauritzen et al. 2016). La taille des endosomes précoces et tardifs ainsi que l'autophagie et les lysosomes sont perturbés dans les neurones dérivés de cellules iPS ayant une mutation de l'APP, montrant que ce peptide peut être la cause du dysfonctionnement lysosomal observé (Hung and Livesey 2018). Il a également été montré que la PI(3)K Vps34 est moins exprimée dans le cerveau des patients Alzheimer, ce qui semble entrainer l'élargissement des endosomes, l'accumulation des précurseurs amyloïdes et la diminution de leur transfert dans les ILV par la machinerie ESCRT. De plus, le défaut de transfert de l'APP dans les ILV provoque une augmentation de la génération d'Aβ (Morel et al. 2013).

- **Maladies lysosomales**

Les maladies lysosomales sont un groupe de maladies génétiques ayant pour point commun l'agrégation de matériel cellulaire causée par un défaut de dégradation lysosomale. De nombreuses maladies lysosomales entrainent des dérégulations de l'autophagie (Lieberman et al. 2012) comme, entre autres, la maladie de Pompe, la maladie de Niemann-Pick ou la maladie de Gaucher. En effet, l'anomalie lysosomale provoque un défaut de stockage lysosomal suivi d'un défaut de fusion des lysosomes avec les autophagosomes et par conséquent un blocage de la voie autophagique et une accumulation d'autophagosomes. Le

blocage de la voie autophagique entraine ensuite une accumulation de protéines toxiques et de mitochondries aberrantes, causant un stress cellulaire puis la mort des cellules (Lieberman et al. 2012).

La maladie de Pompe est due à une mutation du gène codant l'alpha-glucosidase acide, une enzyme chargée de la dégradation lysosomale du glycogène. Une accumulation d'autophagosomes, d'endosomes tardifs et de lysosomes est observée dans les cellules musculaires des patients (Kohler et al. 2018). Les myotubes des patients atteint de la maladie de Pompe montrent également un élargissement des endosomes, accompagné de défaut d'acidification et de motilité endosomale (Fukuda et al. 2006). Enfin, l'accumulation de lysosomes remplis de glycogène et la présence de débris autophagiques dans le cytoplasme entraine une interruption de la machinerie contractile provoquant des dommages musculaires et le déclin de la fonction musculaire (Kohler et al. 2018).

La maladie de Niemann-Pick type C de type 2 (NPC2) est due à une mutation du gène NPC codant une protéine impliquée dans le transport du cholestérol. La NPC2 est une maladie neurodégénérative provoquant l'accumulation de cholestérol dans de nombreux tissus et particulièrement dans le cerveau. Une accumulation d'autophagosomes et un défaut de leur maturation sont observés dans les cellules des patients (Seranova et al. 2017). De plus, un élargissement des endosomes précoces, ainsi qu'une accumulation de cholestérol dans les endosomes tardifs sont également observés dans les neurones des patients (Jin et al. 2004).

La maladie de Gaucher, aussi appelée sphingolipidose, est due à une mutation du gène codant la glucocérébrosidase, une enzyme permettant la dégradation de glucosylcéramide, et conduit à une accumulation de glucocérébrosides dans le cerveau, mais aussi le foie et la rate. Une accumulation d'autophagosomes et un défaut de leur maturation sont également observés dans les cellules des patients. De plus, une diminution de l'expression des gènes lysosomaux et de l'activité des cathepsines sont observées (Seranova et al. 2017).

- **Tumeurs**

Les protéines Rab sont connues pour avoir leur expression augmentée ou diminuée dans les cellules tumorales, dont Rab5, qui joue un rôle dans la migration et l'invasion cellulaire en induisant le renouvellement des adhésions focales. L'hypoxie, souvent retrouvée dans l'environnement tumorale, a été montrée comme induisant l'activation de Rab5 et

provoquant sa relocalisation au niveau des adhésions focales. La sur-activation de Rab5 provoque une augmentation de la taille des endosomes précoces dans les tumeurs mais ne semble pas perturber les mécanismes d'endocytose (Silva et al. 2016).

La protéine cavéoline 1, impliquée dans l'endocytose cavéoline-dépendante, joue un double rôle dans les tumeurs. En effet, dans les stades précoces des cancers elle est inhibée et agit comme un gène-suppresseur de tumeurs. Dans des stades tumoraux plus avancés, la cavéoline 1 est surexprimée et favorise alors la croissance tumorale. Son expression dans le cancer du poumon est associée à une faible survie des patients (Duregon et al. 2017).

La dynamine, impliquée dans la libération des vésicules d'endocytose est également impliquée dans la tumorigénèse. En effet, les dynamine 1 et 2 ont été montrées comme augmentant la prolifération des cellules cancéreuses, l'invasion tumorale et les métastases. La surexpression de la dynamine 2 est d'ailleurs observée dans plusieurs cancers et associée à un faible taux de survie. En effet, la dynamine 2 régule le renouvellement des adhésions focales, essentielles à la migration cellulaire (Meng 2017). Au contraire, la dynamine 3 agit comme un gène suppresseur de tumeur et son expression est souvent inhibée dans les tissus cancéreux (Meng 2017).

Enfin, la protéine ESCRT-I, impliquée dans la formation des ILV nécessaires à la maturation des endosomes tardifs, a été montrée comme faisant partie des gènes suppresseurs de tumeurs mais également comme étant surexprimée dans certains types de cancers ou son expression est liée à un faible taux de survie (Alfred and Vaccari 2016).

4) Transport endosomal des vecteurs AAV et efficacité de transduction

Les vecteurs AAV sont internalisés par endocytose puis transitent jusqu'au noyau à travers le système endosomal. La progression du vecteur dans les différents compartiments du système endosomal et l'acidification des vésicules permet la maturation du vecteur qui se traduit par un changement conformationnel de la capside virale favorisant ainsi le relargage des particules dans l'espace périnucléaire et leur décapsidation. L'efficacité de transduction des vecteurs est dépendante de la rapidité de ce transport qui elle-même est dépendante du sérotype et du type cellulaire infecté (Keiser et al. 2011). Il a en effet été montré que l'AAV2 est internalisé moins rapidement que l'AAV1 et l'AAV5 et est transporté jusqu'au noyau plus lentement que l'AAV1 alors qu'il est plus efficace à exprimer son transgène dans les cellules

HeLa. Cette différence a été attribuée à une meilleure efficacité de décapsidation et une stabilité du génome de l'AAV2. Ainsi, ces trois sérotypes utiliseraient des mécanismes distincts de transport intracellulaire qui leur confèrent des efficacités de transduction différentes (Keiser et al. 2011).

Une fois internalisé, l'AAV8 et l'AAV2 sont transportés dans les endosomes précoces et de recyclage (Liu et al. 2013). Un transport rétrograde de ces deux vecteurs vers le réseau trans-Golgien a également été observé. En effet, les AAV2, 5 et 8 sont transportés à travers le réseau trans-Golgi (Bantel-Schaal et al. 2002; Liu et al. 2013) grâce à la syntaxine 5, dont l'inhibition par ARN interférence perturbe le transport du système endosomal au réseau trans-Golgi et diminue l'efficacité de transduction des AAV de sérotypes 1 à 9 dans les cellules HeLa (Nonnenmacher et al. 2015). Seul l'AAV2 emprunte les endosomes tardifs (Liu et al. 2013). La voie de transport endosomal utilisée par le vecteur semble dépendre de la dose intracellulaire de celui-ci. En effet, à faible multiplicité d'infection (100 génomes par cellule), l'AAV2 est transporté préférentiellement dans les endosomes tardifs, alors qu'il est retrouvé majoritairement dans les endosomes de recyclage lorsque la multiplicité d'infection est forte (10 000 génomes par cellule) (Ding et al. 2006).

Le transport endosomal de l'AAV au-delà de l'endosome précoce est en tous cas essentiel à une transduction efficace. En effet, dans les cellules NIH3T3, l'AAV2 est uniquement présent dans les endosomes précoces, engendrant une faible efficacité de transduction. Le traitement de ces cellules avec de l'hydroxyurée, une drogue permettant le passage de l'AAV dans les endosomes tardifs et les lysosomes, montre une augmentation de son efficacité de transduction (Hansen et al. 2001). De plus, le traitement des cellules avec de la bréfeldine A, une drogue provoquant la formation de tubules à la membrane des endosomes précoces et inhibant leur fusion avec les endosomes tardifs, montre une diminution de l'efficacité de transduction de l'AAV5 (Douar et al. 2001). Enfin, la redirection des vecteurs AAV dans les endosomes tardifs et lysosomes, après l'application d'eeyarestatine, une drogue inhibant la translocation dans le réticulum endoplasmique, augmente l'entrée nucléaire de l'AAV et l'efficacité de transduction (Berry and Asokan 2016).

La présence de PI(3)P, le phosphatidylinositol présent à la membrane des endosomes précoces, est aussi essentielle à l'efficacité de transduction de l'AAV2. En effet, l'inhibition des PI3K dans les cellules HeLa entraine une diminution de son efficacité de transduction (Sanlioglu et al. 2000).

L’acidification endosomale induit des changements conformationnels de la capside et l’activation de l’activité protéase des AAV de plusieurs sérotypes permettant leur autoclivage essentiel à l’échappement endosomal et la décapsidation (Salganik et al. 2012). En plus du pH acide, les protéases endosomales, cathepsine B et L, engendrent une protéolyse partielle des capsides des AAV2 et 8 et sont essentielles à leur transduction, bien que leurs profils de clivage soient différents, mais ne semblent pas intervenir dans la protéolyse de la capside de l’AAV5 (Akache et al. 2007). Enfin, la furine, une endoprotéase située dans les endosomes précoces et le réseau trans-Golgi, joue un rôle dans l’échappement endosomal de l’AAV2, mais pas de l’AAV8, probablement par clivage de résidus basiques de sa capside (Liu et al. 2013).

Objectifs

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique provoquant une dégénérescence musculaire sévère pour laquelle aucun traitement curatif n'existe aujourd'hui. L'une des stratégies les plus prometteuses pour le traitement des patients consiste en l'injection de vecteurs de thérapies géniques permettant l'expression d'une dystrophine plus courte mais fonctionnelle. Les vecteurs dérivés des AAV sont aujourd'hui les outils de choix pour le traitement des maladies neuromusculaires par thérapie génique. Malgré l'efficacité bien établie de l'AAV de sérotype 8 (AAV8) pour le transfert de gènes dans le muscle, de fortes doses de vecteurs sont nécessaires pour obtenir une efficacité thérapeutique dans des modèles animaux de la DMD (Le Guiner et al. 2014; Le Guiner et al. 2017). Pour comprendre cette limitation de la thérapie génique pour la DMD, l'équipe a comme objectif d'étudier les mécanismes qui peuvent limiter l'efficacité de transduction du vecteur AAV8 dans le muscle dystrophique.

Dans ce contexte, l'axe principal de ma thèse a consisté à **identifier les anomalies cellulaires pouvant impacter le transport du vecteur AAV8 et son expression dans le muscle DMD**.

J'ai initié ce projet par les développements techniques permettant de suivre le devenir du vecteur AAV dans le muscle dystrophique. J'ai ensuite caractérisé le système endosomal dans les myoblastes, myotubes et biopsies musculaires de patients DMD et dans les muscles de modèles animaux de la DMD (murins et canin).

Par ailleurs, l'amélioration de l'efficacité des vecteurs AAV en thérapie génique nécessite aussi une meilleure connaissance des protéines cellulaires qui interagissent avec le génome viral et qui régulent son expression. Ainsi, un second axe a consisté à **analyser le rôle des protéines cellulaires RFX1 et RFX3 dans la régulation de l'expression des vecteurs AAV *via* leur interaction avec l'ITR**. Avant mon arrivée au laboratoire, il a été démontré que les protéines RFX1 et RFX3, appartenant à la famille des facteurs de transcription RFX (Regulatory Factor X), se lient spécifiquement à la séquence D de l'ITR de l'AAV2. J'ai donc étudié le rôle de ces protéines sur l'efficacité de transduction de l'AAV.

Résultats

I. Identification des anomalies cellulaires pouvant impacter le transport du vecteur AAV8 et son expression dans le muscle DMD

1) Étude de l'expression du vecteur AAV8 et de son transport dans le muscle dystrophique

Dans le muscle DMD, une série de dérégulations intracellulaires peuvent avoir un impact potentiel sur le transport du vecteur (Cf. *Introduction II) 4)*). La maturation des vecteurs AAV, nécessaire à leur décapsidation et à l'expression du transgène, a lieu lors de leur transport intracellulaire, dans le système endosomal (Cf. *Introduction III) 3) b) Transport endosomal et maturation*). Il semble donc essentiel d'étudier l'efficacité de transduction de l'AAV et les voies endosomales empruntées par ce vecteur dans les cellules musculaires saines et DMD.

a. Efficacité de transduction de l'AAV8 *in vitro*, dans les cellules musculaires de patients DMD

Aucune étude de l'efficacité de transduction de l'AAV dans les cellules musculaires humaines de patients DMD, en comparaison à des cellules musculaires saines n'a été réalisée à ce jour. Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe a vérifié l'efficacité d'un vecteur AAV8 à exprimer le gène rapporteur luciférase dans des cellules musculaires humaines issues de biopsies d'individus sains (contrôles 1 et 2) et de patients DMD portants des mutations différentes (DMDΔ52, DMDΔ45-52). Pour cela, les cellules ont été transduites avec un AAV8-luciférase puis mises en différenciation. La diminution de l'activité de la luciférase 7 jours post-transduction suggère un défaut d'expression de l'AAV8 dans les cellules DMD (entre 64% et 8%) comparées aux cellules contrôles (Figure 33A). Afin de vérifier si le vecteur a bien été internalisé dans les cellules, des immunofluorescences ont été réalisées 6h et 24h post-transduction avec un anticorps dirigé contre la capside entière de l'AAV8 (vecteur non décapsidé) puis des comptages automatisés des particules entières ont été effectués sur des images prises au microscope confocal, grâce au logiciel cellprofiler. Ces résultats suggèrent que les particules d'AAV8 sont internalisées plus rapidement dans les myoblastes DMDΔ45-

52 par rapport aux témoins avec une fraction plus élevée de virions présents dans les cellules après 6 et 24h (Figure 33B).

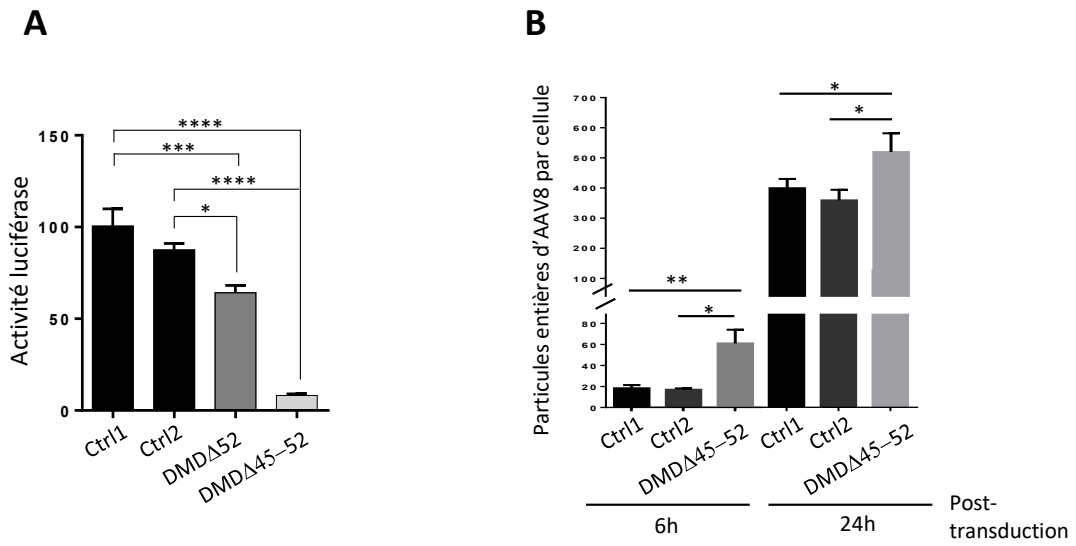


Figure 33: Efficacité de transduction de l'AAV8 et quantification des particules virales dans les cellules musculaires DMD humaines.

(A) *Les myoblastes issus de deux patients DMD (Δ52 et Δ45-52) et deux contrôles (Ctrl1 et Ctrl2) ont été transduits avec un AAV8 exprimant un gène rapporteur luciférase. L'activité de la luciférase, reflétant l'expression du transgène, a été quantifiée une semaine après la transduction dans les cellules différenciées.* ***(B)*** *Quantification des particules entières d'AAV8 pendant les temps précoces de la transduction (6h) et tardifs (24h) montrant que les particules d'AAV8 ont été internalisées plus rapidement dans les myoblastes DMDΔ45-52 par rapport aux témoins avec une fraction plus élevée de virions présents dans les cellules après 6h et 24h. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, **** p <0,0001.*

b. Analyse de la répartition de l'AAV8 dans les cellules musculaires DMD

La distribution spatiale de l'AAV8 a été analysée par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre la capside entière, dans des myoblastes DMD (Δ52, Δ45-52 et Δ48-50) et contrôles (contrôles 1, 2 et 3), 24 heures post-transduction. En accord avec les résultats du comptage (Figure 33B), j'observe qu'il y a plus de vecteurs AAV8 encapsidés dans les myoblastes DMD que dans les myoblastes contrôles, répartis dans l'ensemble de la cellule (Figure 34). De plus, on observe un nombre élevé de particules AAV8 dans les noyaux des

cellules contrôles alors que l'AAV se concentre principalement à la périphérie des noyaux dans les cellules DMD.

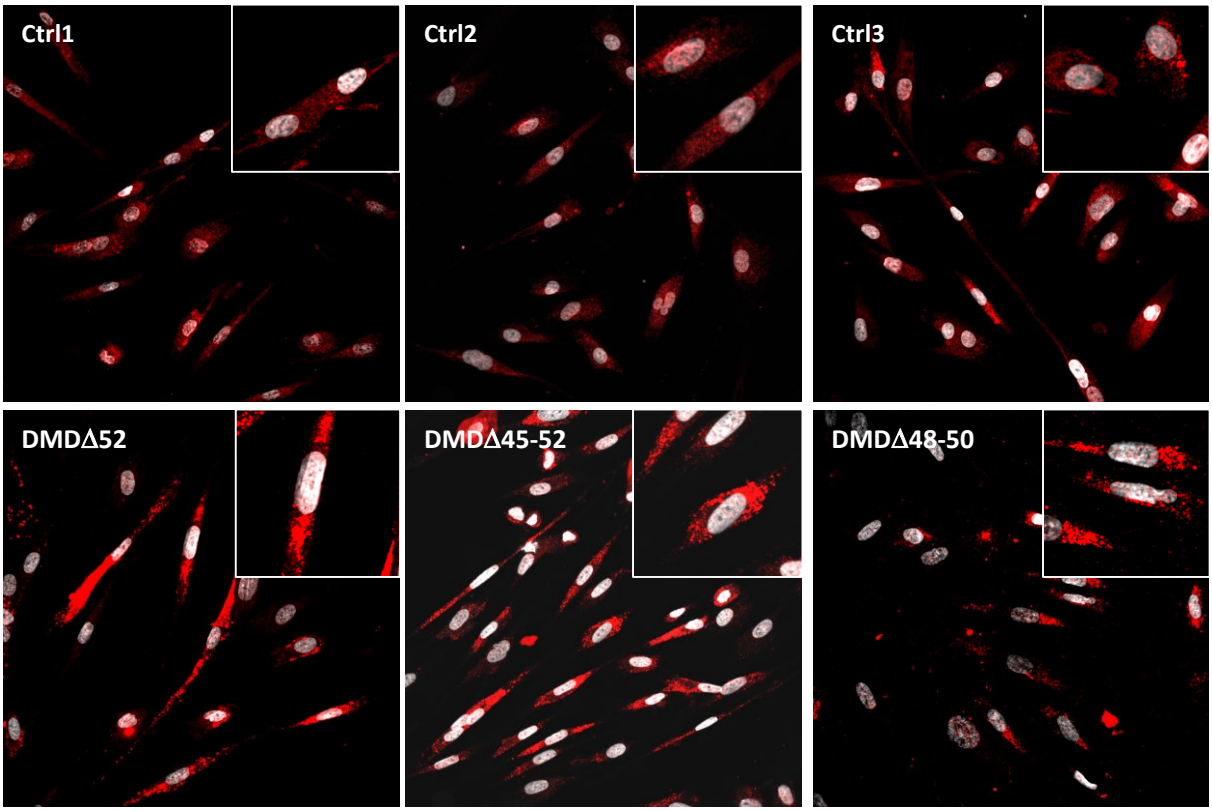


Figure 34: Analyse de la répartition de l'AAV8 dans les cellules musculaires.
Les myoblastes issus de patients DMD (Δ52 ; Δ45-52 et Δ48-50) et de contrôles sains (Ctrl1, 2 e t3) ont été transduits avec un AAV8 puis fixés 24h post-transduction. Des immunofluorescences ont été réalisées afin de marquer les particules entières d'AAV8 (en rouge) montrant que l'AAV8 est présent dans les noyaux des myoblastes contrôles à 24h post-transduction alors qu'il est majoritairement cytoplasmique dans les myoblastes DMD. Les images ont été prises au microscope confocal au grossissement 40X.

c. Analyse de la décapsidation de l'AAV8 dans les cellules musculaires DMD

Ainsi, mes résultats montrent un défaut d'expression de l'AAV8 dans les cellules DMD alors qu'il y a un nombre plus élevé de particules virales encapsidées dans ces cellules comparées aux cellules saines. Les génomes viraux décapsidés n'étant pas détectables par immunofluorescence, j'ai réalisé une quantification des génomes viraux encapsidés et décapsidés dans les cytoplasmes et noyaux des cellules DMDΔ45-52 et contrôles. Pour cela les cellules ont été transduites pendant 16h avec un AAV8 puis un fractionnement cellulaire a été réalisé afin de séparer les fractions nucléaires et cytoplasmiques. La pureté de ces fractions a

été vérifiée par Western Blot en montrant que la GAPDH est uniquement présente dans la fraction cytoplasmique et l'histone H3 uniquement dans la fraction nucléaire (Figure 35A). La moitié de chaque fraction a été traitée à la benzonase, afin d'éliminer l'ADN viral non protégé par la capside, cette partie contient alors uniquement les génomes viraux encapsidés. La deuxième moitié n'est pas traitée à la benzonase et contient donc les génomes viraux décapsidés et encapsidés. Après quantification par qPCR, le nombre de copies de génome viraux (GV) décapsidés est obtenu par soustraction du nombre de copies de GV encapsidés (partie traitée à la benzonase) au nombre de copies de GV total (partie non traitée à la benzonase). Les résultats montrent que le nombre de copies de GV total est plus élevé dans le cytoplasme et le noyau des myoblastes DMD par rapport aux contrôles (Figure 35B). Dans la fraction cytoplasmique, le pourcentage de génomes viraux décapsidés est similaire dans les myoblastes contrôles (24%) et DMD (23%). Cependant, dans la fraction nucléaire, ce pourcentage est plus faible dans les myoblastes DMD (32% du total) comparés aux myoblastes contrôles où 75% des génomes sont décapsidés.

La même expérience réalisée sur des muscles de souris WT et mdx, 72h et 2 semaines après injection intramusculaire d'un AAV8-mSEAP (Figure 35D et 35E) ne montre pas de différence significative entre les groupes de souris étudiés. Ceci est probablement dû, au moins en partie, à la grande variabilité des valeurs obtenues.

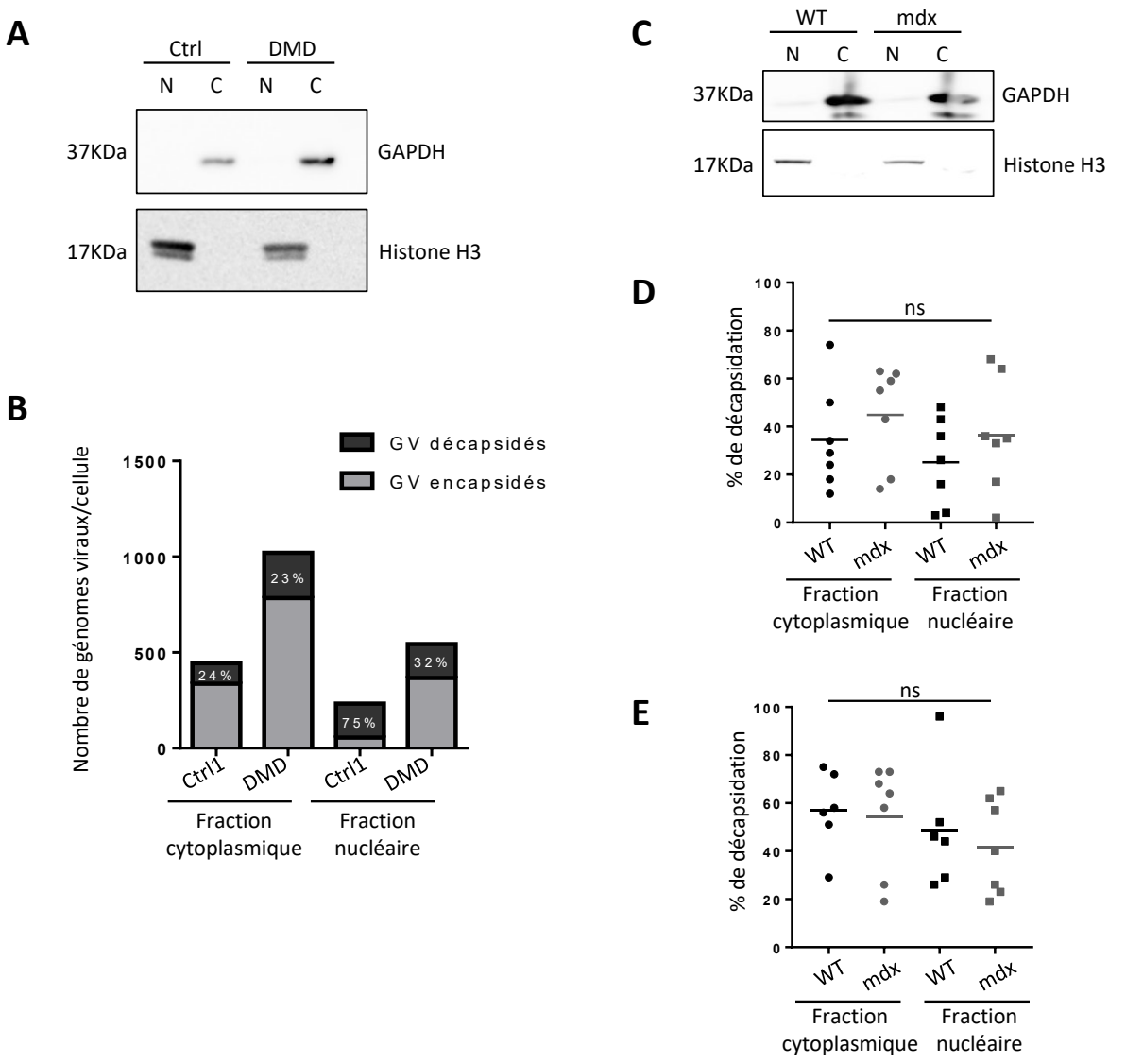


Figure 35: La décapsidation de l'AAV8 est perturbée dans les cellules musculaires DMD humaines et les souris mdx.

Les myoblastes issus de patients DMD (Δ45-52) et contrôles ont été transduits avec un AAV8 puis les extraits cellulaires ont été fractionnés en une partie cytoplasmique et une partie nucléaire. ***(A)*** *L'expression des protéines GAPDH et Histone H3 a été analysée par western blot pour vérifier la pureté des fractions cytoplasmiques (C) et nucléaire (N)****. (B)*** *Après traitement à la benzonase de la moitié de chaque échantillon, permettant d'éliminer l'ADN non encapsidés, le nombre de génomes viraux a été quantifié par qPCR dans chaque fraction, puis le pourcentage de particules décapsidées par rapport au nombre de copies de génomes viraux total a été calculé (indiqué en blanc) (n=1). Des souris WT et mdx de 3 mois ont été injectées en intramusculaire avec un AAV8 puis le muscle injecté a été prélevé après* ***(D)*** *72h ou (****E****) 2 semaines.* ***(C)*** *La pureté des fractions cytoplasmiques (C) et nucléaire (N) a été vérifiée par WB****.*** *Après fractionnement et traitement à la benzonase de la moitié des échantillons, le nombre de copies de génomes viraux a été quantifié par qPCR et le pourcentage de décapsidation a été calculé, comme cela a été décrit pour les cellules. ns, non significatif.*

d. Analyse des voies endosomales empruntées par l'AAV8 dans les cellules musculaires DMD

Nous avons ensuite voulu analyser le type d'endosomes emprunté par l'AAV8 dans ces cellules musculaires grâce à des co-immunomarquages des particules entières de l'AAV8 avec des marqueurs des endosomes précoces (EEA1) (Figure 36A) et tardifs (CI-MPR) (Figure 36B). Ces expériences montrent une co-localisation du vecteur AAV8 avec les endosomes précoces et tardifs 72h après la transduction dans des cellules contrôles saines. De plus cette co-localisation apparait de façon plus marquée dans les myotubes DMD.

Nos résultats montrent donc pour la première fois l'implication des endosomes tardifs dans le transport de l'AAV8 dans les cellules musculaires. Par ailleurs, l'ensemble de mes résultats suggèrent que le défaut de transduction de l'AAV8 dans les cellules musculaires DMD pourrait résulter de son accumulation anormale dans les endosomes précoces et tardifs. Une telle accumulation pourrait entrainer un défaut de maturation et de décapsidation du vecteur. J'ai donc voulu étudier plus en détail ce système endosomal dans les cellules DMD.

2) Étude du système endosomal dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne

Après son entrée par endocytose, le vecteur AAV est transporté de la membrane plasmique vers le noyau *via* les endosomes. La maturation et l'acidification des compartiments endosomaux permet la maturation et la décapsidation du vecteur (cf. *Introduction III) 3) b) Transport et maturation*). Sur la base des résultats présentés plus haut, nous avons émis l'hypothèse que la maturation du vecteur AAV8 est peut-être perturbée dans les cellules musculaires DMD en raison d'un défaut du système endosomal. Je me suis donc attachée à analyser les endosomes empruntés par l'AAV8 dans le muscle DMD.

Pour cela j'ai réalisé une quantification et une analyse morphométrique des endosomes précoces et tardifs *in vitro* dans les cellules musculaires immortalisées issues de patients DMD, portant des mutations différentes (Δ52, Δ45-52, Δ48-50 et Δ44-50) et *ex-vivo* dans les muscles de patients DMD, de souris mdx et de chien GRMD.

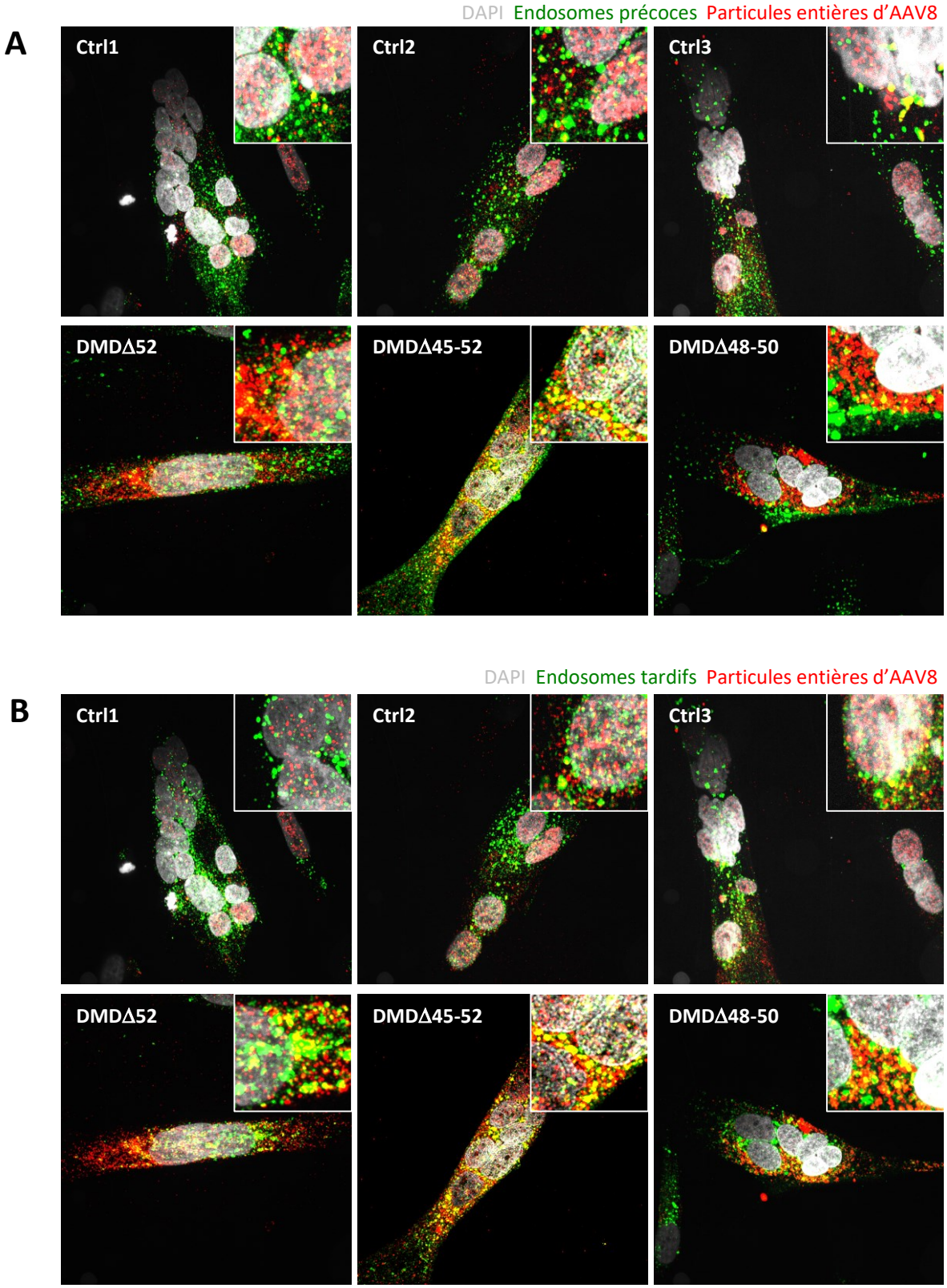


Figure 36: Analyse de la localisation endosomale de l'AAV8 dans les cellules musculaires.

*Les myotubes issus de patients DMD (Δ52 ; Δ45-52 et Δ48-50) et contrôles (Ctrl1, 2 et 3) ont été transduits avec un AAV8 puis fixés 72h après transduction. Des expériences de co-marquage des particules entières d'AAV8 (en rouge) avec **(A)** les endosomes précoces ou **(B)** les endosomes tardifs (en vert) montrent que l'AAV8 est transporté à travers les endosomes précoces et tardifs dans les cellules musculaires et qu'il s'accumule dans ces structures endosomales dans les myotubes DMD. Les images ont été prises au microscope confocal au grossissement 100X.*

a. Analyse des endosomes précoces et tardifs dans les cellules musculaires de patients DMD

- **Quantification des endosomes dans les cellules musculaires issues de biopsies humaines**

La quantification des endosomes précoces et tardifs a été réalisée par immunofluorescence en utilisant des marqueurs des endosomes précoces (EEA1) et tardifs (CI-MPR). Comme on peut le voir sur les figures 37A et 37E, on observe plus d'endosomes précoces et tardifs dans les myoblastes et myotubes DMD comparés aux cellules contrôles. La quantification des endosomes sur les images prises au microscope confocal confirme cette observation et montre un nombre plus élevé d'endosomes précoces et tardifs dans les myoblastes (Figure 37B et 37C) et myotubes (Figure 37F et 37G) DMD. Nous avons vérifié que le défaut endosomal observé n'était pas lié à l'immortalisation des cellules musculaires humaines. La même expérience réalisée dans des myoblastes primaires natifs issus de patients DMDΔ45-52, DMDΔ44-50 et DMDΔ48-50 a donné les mêmes résultats (Figure 37D). Ces résultats montrent donc que le système endosomal est perturbé dans les cellules musculaires DMD et que ce défaut est indépendant de l'immortalisation des cellules. J'ai donc poursuivi mes expériences sur les cellules musculaires immortalisées.

- **Expression de la dystrophine dans les myoblastes et myotubes humains**

Nous avons été surpris de voir que l'anomalie endosomale est observée aussi bien dans les myoblastes que les myotubes DMD. Etant donné que l'expression de la dystrophine au stade myoblaste est controversée (Wattin et al. 2018), j'ai étudié son expression dans nos myoblastes et myotubes DMD par qPCR et Western Blot (Figure 38). Comme attendu, l'ARNm ainsi que la protéine Dp427 sont exprimés dans les myotubes contrôles après 9 jours de différenciation et aucune expression n'est observée dans les myoblastes et myotubes DMDΔ52, Δ45-52 et Δ48-50. Cependant, nous observons une faible expression de la Dp427 dans les myoblastes contrôles. Bien que son expression soit faible, la dystrophine est bien présente dans les myoblastes contrôles, ce qui explique donc l'apparition possible de phénotypes dans des myoblastes DMD due à son absence comme j'ai pu le mettre en évidence dans mes expériences précédentes.

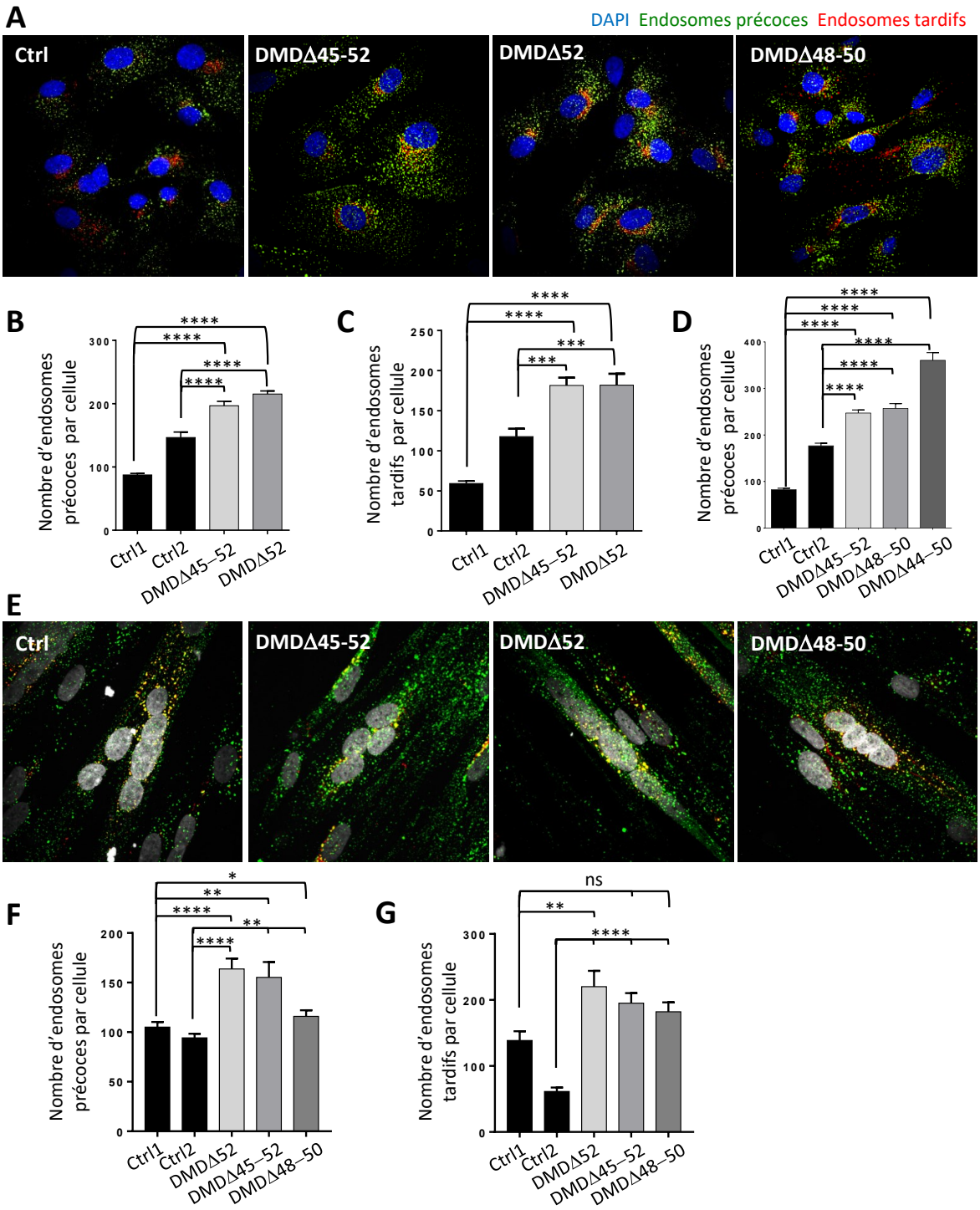


Figure 37: Le nombre d'endosomes est plus élevé dans les cellules musculaires DMD humaines.
*Immunomarquage des endosomes précoces (en vert) et tardifs (en rouge) sur **(A)** des myoblastes et **(E)** des myotubes immortalisés issus de trois patients DMD (Δ45-52, Δ52 et Δ48-50) et contrôles, montrant une différence dans le nombre **(B et F)** d'endosomes précoces et **(C et G)** tardifs. **(D)** Les endosomes précoces ont également été quantifiés sur des myoblastes primaires natifs issus de trois patients DMD (Δ45-52, Δ48-50 et Δ44-50) et contrôles (Ctrl1 et Ctrl2) montrant que la dérégulation endosomale n'est pas causée par l'immortalisation des cellules. La quantification est réalisée sur des images prises au microscope confocale (100 images par expérience, n=5 pour les myoblastes ; 45 cellules par expériences, n=3 pour les myotubes) à l'aide du logiciel Fiji. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, **** p <0,0001.*

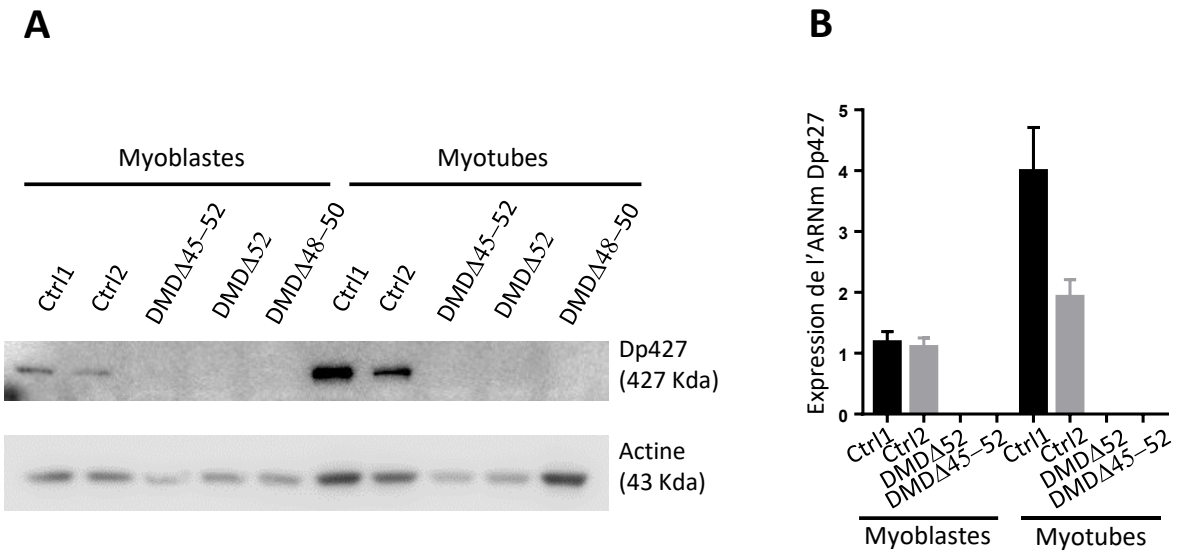


Figure 38: La dystrophine Dp427 est exprimée dans les myoblastes issus d'individus sains.
(A) *Western-Blot réalisé à partir d'extraits cellulaires de myoblastes et myotubes issus de trois patients DMD (Δ45-52, Δ52 et Δ48-50) et deux contrôles (Ctrl1 et Ctrl2) marqués avec des anticorps dirigés contre l'isoforme musculaire de la dystrophine (Dp427) et l'actine.* ***(B)*** *Analyse de l'expression de l'ARNm de la dystrophine par RT-qPCR dans les myoblastes humains, rapporté à l'expression de RPLP0 (n=3).*

- **Quantification des endosomes dans les myoblastes de deux autres myopathies**

Afin de déterminer si le défaut endosomal est un phénotype commun des différentes dystrophies musculaires, nous avons quantifié les endosomes précoces et tardifs après immunomarquage dans des myoblastes issus de biopsies musculaires de patients atteints d'autres dystrophies non liées à la dystrophine comme la LGMD2C (Limb-girdle muscular dystrophy type 2C) et la FSHD1 (Dystrophie facio-scapulo-humérale de type 1). La LGMD2C est une myopathie causée par l'absence de la protéine γ-sarcoglycane, une autre protéine du DAPC. La FSHD1 est causée par l'expression anormale du facteur de transduction DUX4, provocant la dérégulation de plusieurs gènes et conduisant à l'atrophie musculaire. Contrairement aux myoblastes issus de patients DMD, aucune différence du nombre d'endosomes précoces et tardifs n'a été observée entre les myoblastes LGMD2C, FSHD1 et contrôles (Figures 39A et 39B). L'anomalie endosomale présente dans les myoblastes DMD pourrait être spécifique de la DMD et donc liée à l'absence de dystrophine.

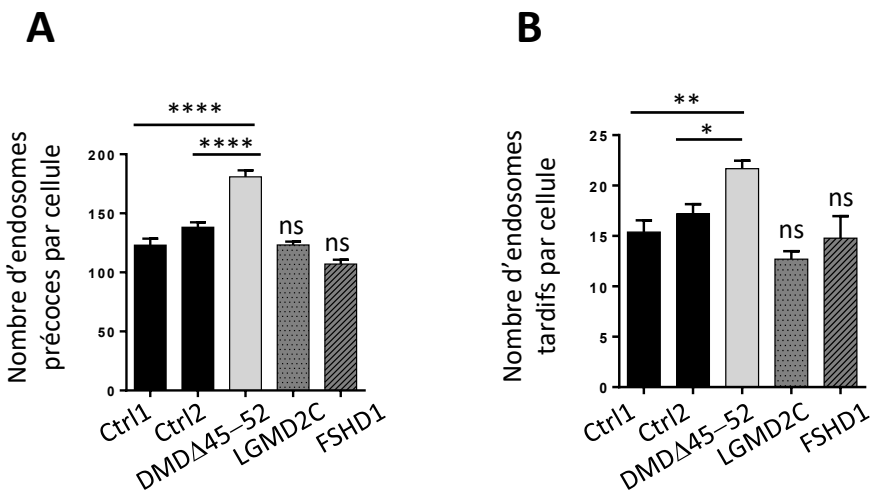


Figure 39: L'anomalie endosomale semble spécifique de la pathologie DMD.
*Les endosomes précoces et tardifs ont été analysés par immunofluorescence sur des myoblastes issus de patients DMD (Δ45-52), LGMD2C, FSHD1 et contrôles (Ctrl1 et Ctrl2), montrant qu'il n'y a pas de différence dans le nombre **(A)** d'endosomes précoces et **(B)** tardifs entre les myoblastes LGMD2C, FSHD1 et contrôles. L'analyse a été réalisée sur des images confocales (100 images par expérience, n=5) à l'aide du logiciel CellProfiler. * P<0,05, ** P<0,01, **** P <0,0001, ns : non significatif.*

- **Analyse morphométrique des endosomes dans les cellules musculaires issues de biopsies humaines**

L'observation des endosomes au microscope confocal montre aussi que les endosomes précoces ont un aspect plus large dans les myoblastes (Figure 40A) et myotubes (Figure 40C) DMD. J'ai donc mesuré la taille moyenne des endosomes et établi que la taille moyenne des endosomes précoces est plus importante dans les myoblastes (Figure 40B) et les myotubes (Figure 40D) DMD comparés aux contrôles.

b. Analyse des endosomes précoces par microscopie électronique

La résolution du microscope confocal ne permet pas de déterminer si les endosomes de plus grande taille observés dans les cellules musculaires DMD représentent des endosomes élargis ou alors des regroupements d'endosomes formant des agrégats. Afin de répondre à cette question, des myoblastes d'un individu sain et d'un patient DMD ont été analysés au microscope électronique après immunomarquage à l'or de la protéine EEA1.

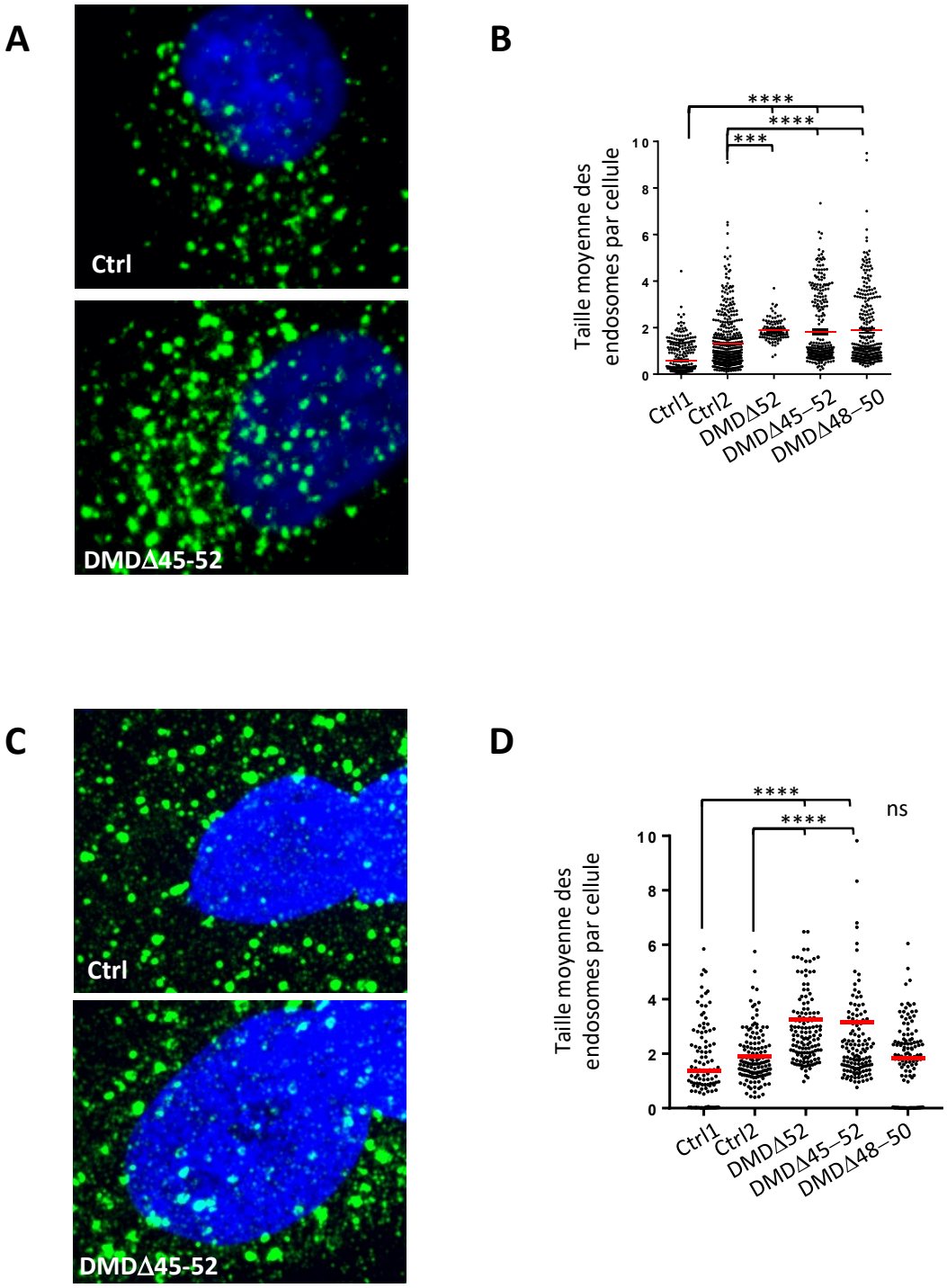


Figure 40: La taille moyenne des endosomes précoces est plus élevée dans les cellules musculaires DMD humaines.

*Après immunomarquage des endosomes précoces sur des **(A)** myoblastes et **(C)** des myotubes issus de patients DMD et contrôles, la taille moyenne des endosomes a été mesurée, montrant que les endosomes précoces sont plus larges dans les **(B)** myoblastes et **(D)** les myotubes DMD comparés aux contrôles. L'analyse a été réalisée sur des images confocales (100 images par expérience, n=5, à l'aide du logiciel CellProfiler pour les myoblastes et 45 images par expérience, n=3, à l'aide du logiciel Fiji pour les myotubes) **** P <0,0001*

L'or étant opaque aux électrons, l'immunomarquage forme de fines billes noires sur les images. Pour une meilleure visibilité, les endosomes marqués sont colorés en violet sur les images présentées (Figure 41). Les résultats de microscopie électronique confirment l'existence d'une plus grande proportion d'endosomes précoces larges dans les myoblastes DMD comparés aux contrôles. Les gros endosomes observés au microscope confocal semblent donc être des endosomes de plus grande taille issus, peut-être, d'une fusion aberrante des endosomes.

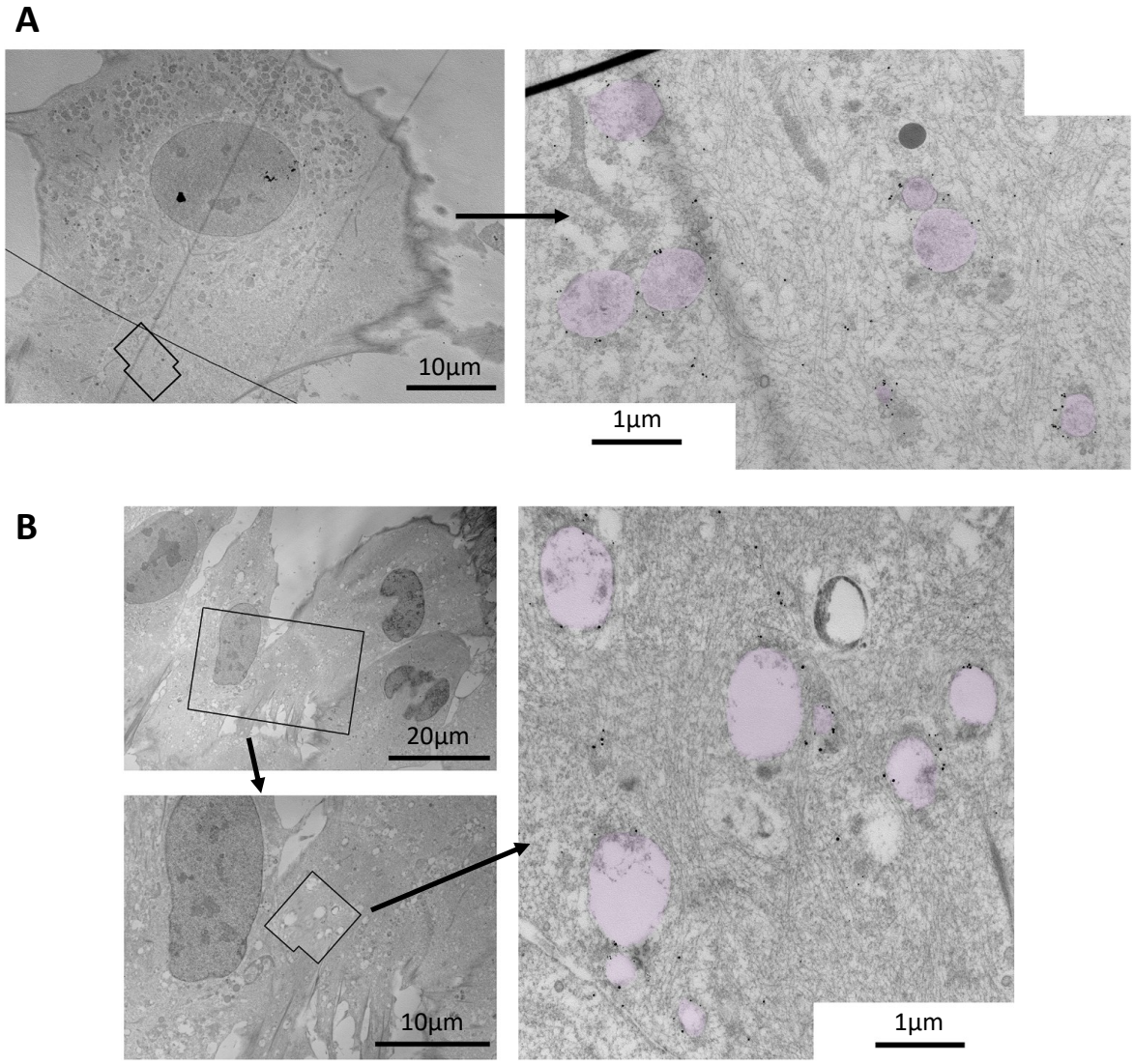


Figure 41: Les endosomes précoces sont plus larges dans les myoblastes DMD humains.
*Immunomarquage à l'or des endosomes EEA1 positifs sur (**A**) des myoblastes contrôles et (**B**) DMD (Δ45-52) montrant une différence dans la taille des endosomes précoces entre les myoblastes DMD et contrôles.*

c. Analyse des endosomes dans les fibres isolées de souris mdx

J'ai également analysé les endosomes précoces et tardifs dans des fibres isolées du muscle EDL (*extensor digitorum longus*) de souris mdx et comparées aux fibres de souris sauvages (WT). Pour déterminer si l'anomalie endosomale est due à l'absence de la dystrophine en soi ou alors causée par les cycles de nécrose et régénération, l'analyse a été réalisée chez les souris mdx jeunes de 15 jours dont les muscles n'ont pas encore subi de nécrose et des souris mdx de 3 mois, bien après la phase de nécrose et régénération (cf. *Chapitre II) 5) a) La souris mdx*). Des expériences d'immunofluorescence des endosomes précoces (EEA1), tardifs (CI-MPR) et du réseau microtubulaire (α-tubuline) ont été réalisées. Dans les fibres mdx de 15 jours, l'organisation du réseau microtubulaire et des endosomes n'est pas différente de celle observée dans les souris contrôles (Figure 42A), tandis que dans les fibres des mdx de 3 mois, on observe des noyaux centraux caractéristiques de la régénération et un réseau microtubulaire désorganisé, comme décrit dans la littérature (McGreevy et al. 2015; Percival et al. 2007) (Figure 42C). De plus, dans les fibres de souris mdx de 3 mois, les endosomes ont une organisation et une concentration différentes des souris WT. En effet, dans les fibres WT, les endosomes sont souvent localisés au niveau des pôles opposés des noyaux et répartis de façon organisée en suivant le quadrillage fibrillaire structuré du réseau microtubulaire alors que dans les fibres mdx, les endosomes ne sont pas localisés autour des noyaux centraux et sont répartis de façon irrégulière sur toute la longueur de la fibre. Il y a également des structures sphériques denses (endosomes en amas ou larges) qui sont très peu retrouvées dans les fibres WT.

Comme dans les cellules musculaires issues des biopsies humaines DMD, la quantification des endosomes précoces montre qu'il y en a plus dans les fibres des souris de 15 jours et des souris de 3 mois comparés aux fibres WT (respectivement 2 fois et 3,5 fois plus) (Figures 42B et 42D). Cependant, il y a un nombre équivalent d'endosomes tardifs dans les fibres des souris WT et mdx de 15 jours et 2 fois moins dans les fibres mdx de 3 mois comparées aux WT. Il est à noter que la résolution du microscope confocal ne permet pas de différencier les endosomes groupés ou la fusion aberrante des endosomes tardifs, ce qui rend difficile le comptage des endosomes tardifs individuels.

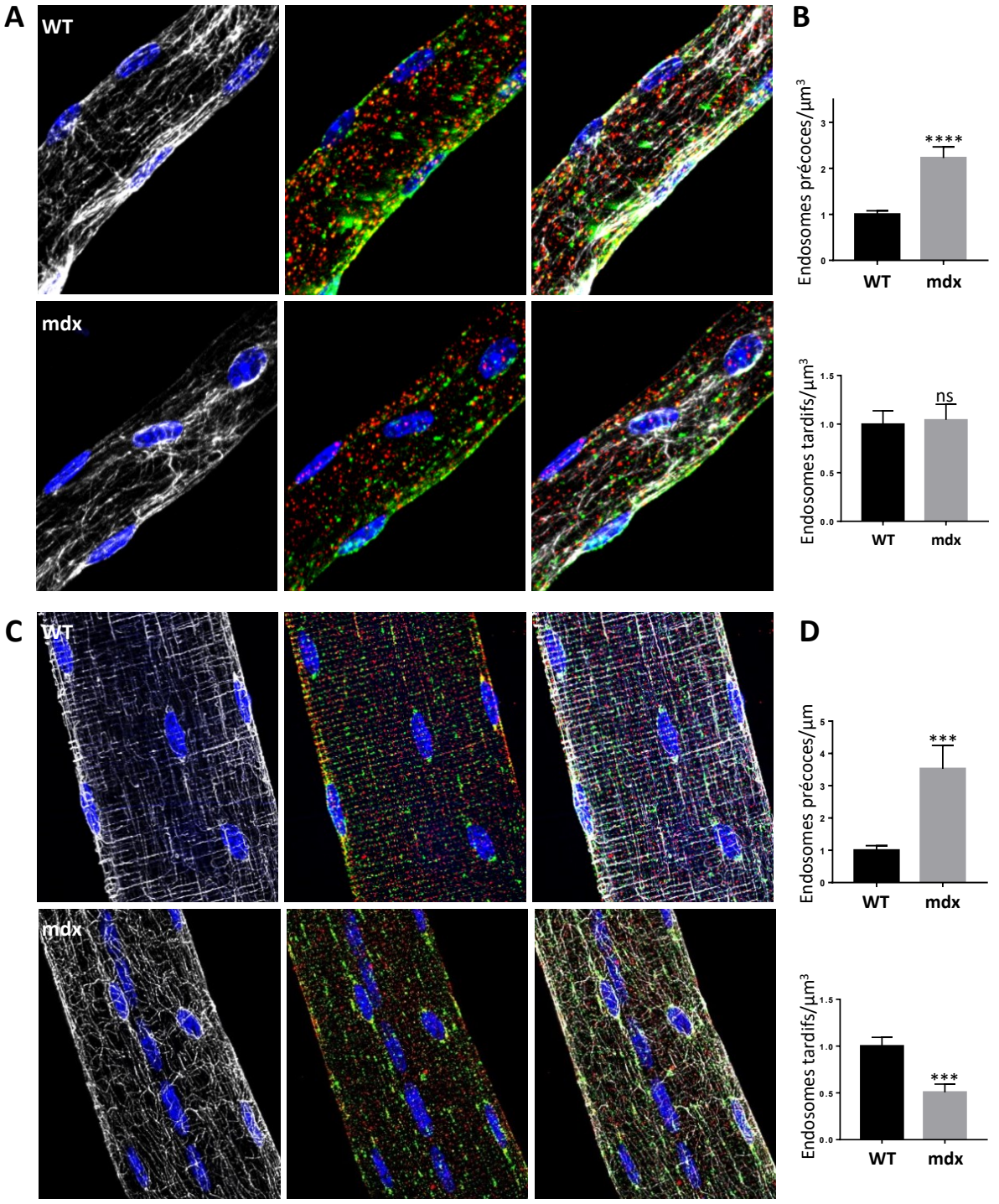


Figure 42: Le nombre d'endosomes précoces est augmenté dans les myofibres de souris mdx.

*Les myofibres isolées à partir des muscles EDL de souris WT et mdx de **(A)** 15 jours et **(C)** 3 mois ont été marquées avec le dapi pour visualiser les noyaux (bleu), les anticorps anti-tubuline pour les microtubules (blanc), anti-EEA1 pour les endosomes précoces (rouge) et anti-CI-MPR pour les endosomes tardifs (vert). Les endosomes des fibres de souris de **(B)** 15 jours et de **(D)** 3 mois ont ensuite été quantifiés. Les données représentent la moyenne ± SEM d'au moins 16 myofibres par souris (n = 3 ou 4) analysées à l'aide du logiciel Fiji, sur des images prises au microscope confocal. *** P <0,001 **** P <0,0001 ns: non significatif.*

d. Analyse des endosomes précoces dans les coupes musculaires de patients DMD

Afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro* dans les cellules issues des biopsies humaines et *ex vivo* dans la souris mdx, les endosomes ont été analysés par immunofluorescence dans des biopsies musculaires de patients DMD et d'individus sains âgés de 3, 5 et 10 ans. La figure 43A montre que les fibres des patients DMD sont de tailles hétérogènes avec de nombreuses fibres hypertrophiques. De plus, on observe que les fibres des patients DMD ne sont pas jointives contrairement aux biopsies d'individus sains. L'immunofluorescence montre une accumulation d'endosomes précoces dans les fibres musculaires des patients DMD qui sont répartis de façon très hétérogène d'une fibre à une autre. La quantification a confirmé que le nombre d'endosomes précoces est plus élevé dans les fibres musculaires de patients DMD, par rapport aux fibres d'individus sains du même âge (Figure 43B).

e. Analyse des endosomes dans les muscles de chiens GRMD après restauration de la dystrophine

Pour démontrer le lien entre l'absence de dystrophine et le défaut endosomal, nous avons voulu savoir si la restauration de la dystrophine dans le muscle DMD permettait de rétablir le défaut endosomal observé. Pour cela, grâce à une collaboration avec le Pr Stéphane Blot (Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Inserm U955-E10) et le Dr Adeline Vulin (SQY Therapeutics) nous avons pu réaliser une série d'expérience dans un autre modèle animal de la DMD, le chien GRMD qui a l'avantage de présenter un phénotype proche de celui de l'Homme. Tout d'abord, avec Nathalie Da Silva (ingénieur dans l'équipe), nous avons validé la présence de l'anomalie endosomale dans ce modèle animal. Pour cela, l'analyse des endosomes par immunofluorescence a été réalisée sur des coupes musculaires de chiens sains, GRMD affectés modérément (perte d'ambulation après 6 mois) ou sévèrement (perte d'ambulation avant 6 mois). J'ai observé que le nombre d'endosomes précoces et tardifs est plus élevé dans les fibres musculaires des chiens GRMD comparés aux chiens contrôles (Figure 44A). Les endosomes précoces et tardifs sont organisés en amas autour des noyaux dans les coupes musculaires de chiens GRMD modérés et sévères. La quantification des endosomes dans les fibres confirme cette observation et montre que le nombre d'endosomes est d'autant plus important que le phénotype est sévère dans le muscle GRMD (Figure 44B).

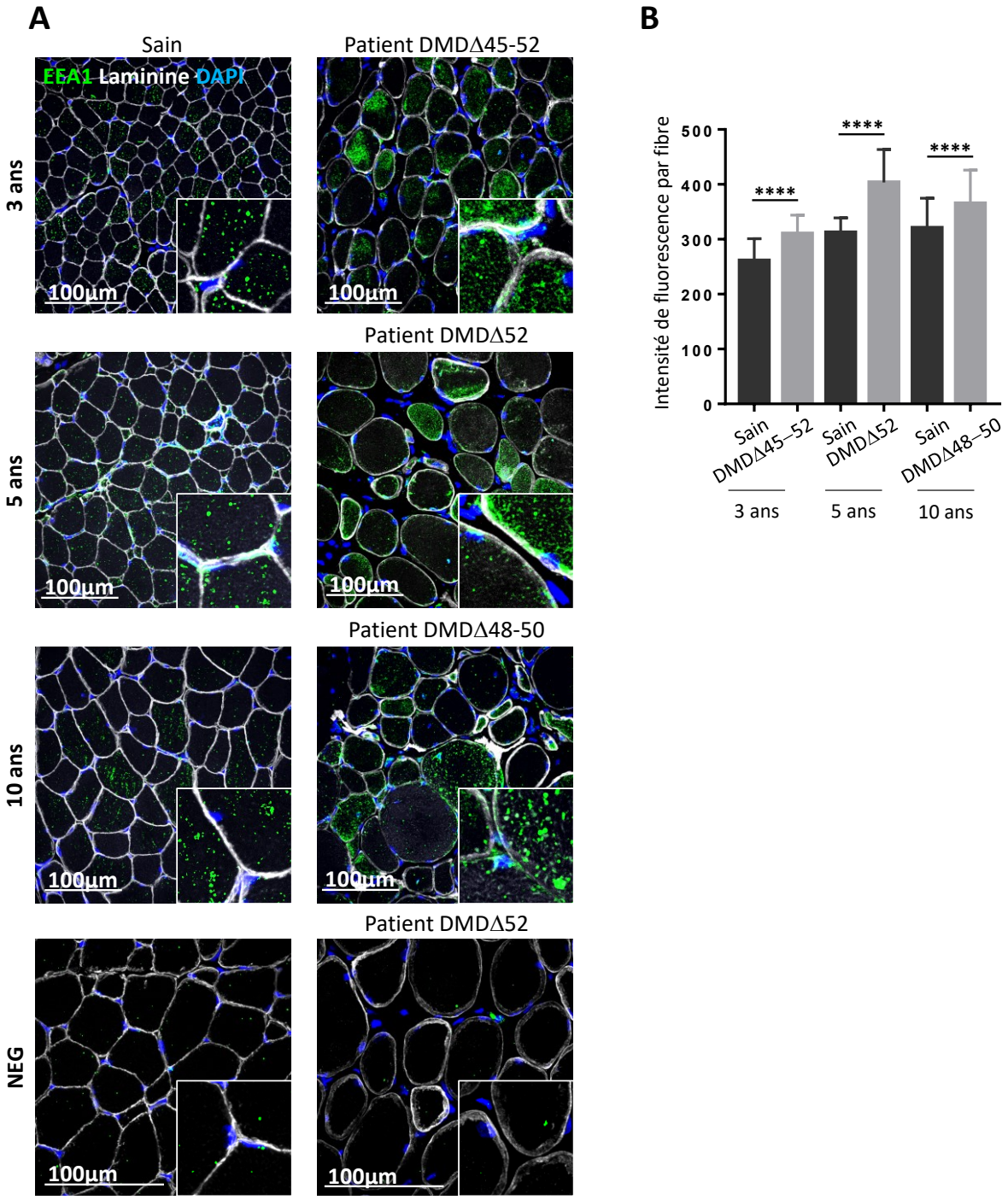


Figure 43: Le nombre d'endosomes précoces est augmenté dans les fibres de patients DMD.
(A) *Coupes musculaires représentatives de biopsies de muscles d'individus sains ou de patients DMD de 3 ans (Δ45-52), 5 ans (Δ52) et 10 ans (Δ48-50). Les coupes ont été marquées avec le dapi pour visualiser les noyaux (bleu), l'anticorps anti-laminine pour délimiter les fibres musculaires (blanc) et l'anticorps anti-EEA1 pour les endosomes précoces (vert).* ***(B)*** *La quantification des endosomes précoces montre un plus grand nombre d'endosomes précoces dans les fibres des patients DMD. L'analyse est réalisée sur des images prises au microscope confocal au 40X (130 fibres par patient au minimum ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji). **** P <0,0001.*

Nous avons ensuite réalisé cette analyse dans des muscles de chiens GRMD sévèrement atteints injectés avec un AAV-U7 permettant la restauration de la dystrophine par saut d'exon (Cf. *Introduction II) 6) d) Saut d'exon*) (Vulin et al. 2012) (Figure 44C). La dystrophine restaurée thérapeutiquement (58% de fibres exprimant la dystrophine) permet un rétablissement partiel du nombre d'endosomes précoces 6 mois post-injection (Figure 44D).

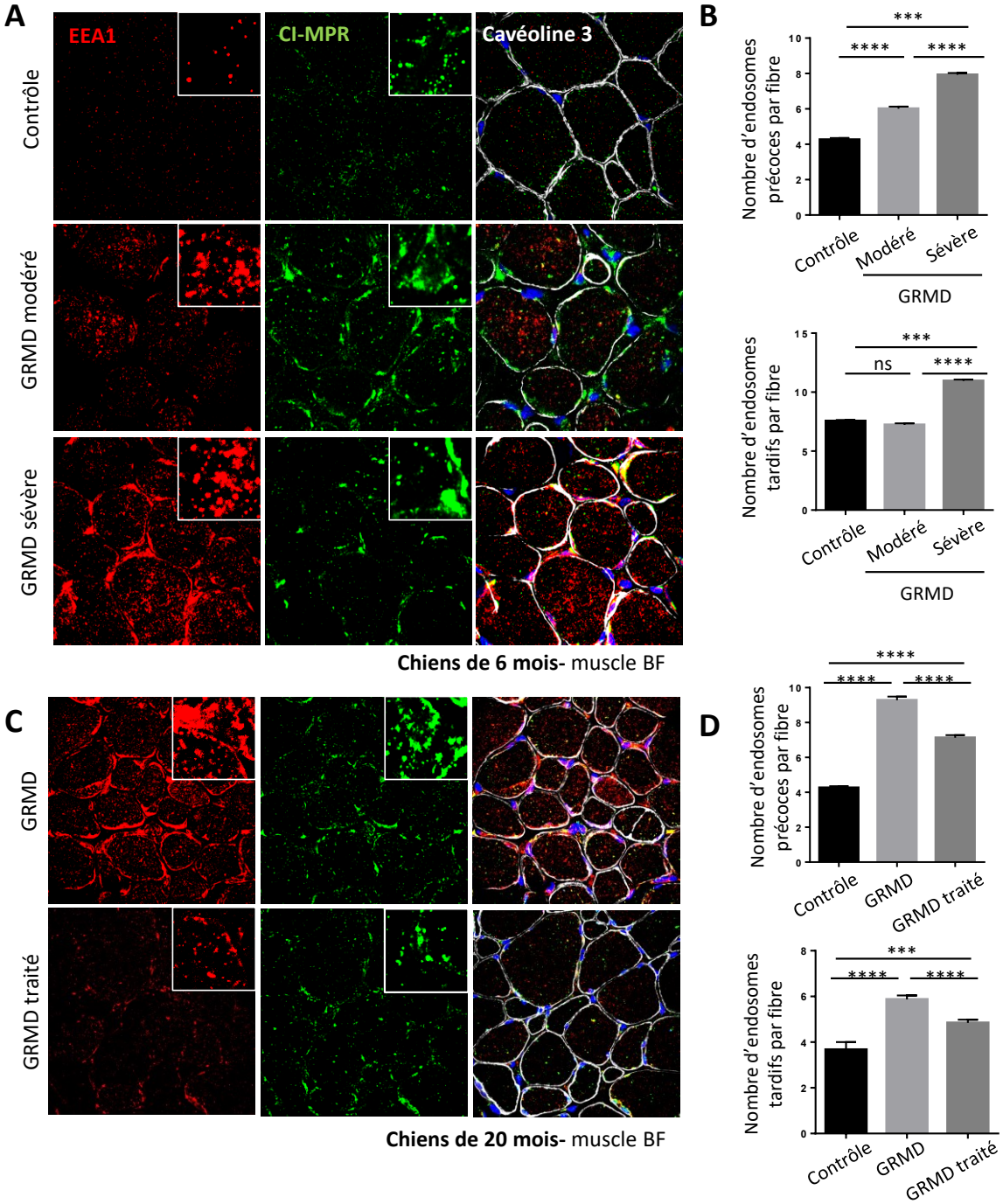


Figure 44 : légende page suivante

Figure 44: La restauration de la dystrophine chez le chien GRMD permet de diminuer le nombre d'endosomes précoces et tardifs.

*Coupes musculaires représentatives de biopsies de Biceps Femoris (BF) de chiens **(A)** contrôles, GRMD modérés et GRMD sévères ou **(C)** GRMD non traités et traités. Les coupes musculaires ont été marquées avec le dapi pour visualiser les noyaux (bleu), l'anticorps anti-cavéoline pour visualiser la membrane des fibres (blanc), l'anticorps anti-EEA1 pour les endosomes précoces (rouge) et anti-CI-MPR pour les endosomes tardifs (vert). **(B)** La quantification des endosomes montre un nombre plus élevé d'endosomes précoces et tardifs dans les fibres de chiens GRMD par rapport aux contrôles. **(D)** La quantification des endosomes dans les fibres de chiens GRMD traités et non traités montre que la restauration de la dystrophine permet de restaurer l'anomalie endosomale. (500 fibres par chiens, n=3 chiens pour (B) ; 800 fibres par chien, n=1 chien pour (D))*** P <0,001, **** P <0,0001, ns : non significatif.*

f. Implication de la protéine Rab5 dans l'anomalie endosomale du muscle DMD

La protéine Rab5 est l'un des acteurs principaux de la biogénèse et de la fusion endosomale dont la surexpression conduit à un nombre élevé d'endosomes et à l'élargissement anormal de ces vésicules (Cf. *Introduction IV) 2) b) La fusion endosomale des endosomes précoces*). Avec Nathalie Da Silva, nous avons donc analysé le niveau d'expression de Rab5 dans les cellules musculaires DMDΔ45-52 vs contrôles et dans les muscles de souris mdx par RT-QPCR et western blot. Les résultats montrent que l'ARNm ainsi que la protéine Rab5 sont surexprimés dans les myoblastes DMD et dans le muscle de souris mdx (Figure 45).

Nous avons vérifié si la réduction de la surexpression de Rab5 dans les myoblastes DMDΔ45-52 par ARN interférence (siRab5) pouvait corriger l'anomalie endosomale. L'analyse de la protéine Rab5 dans les myoblastes DMD traités avec un siRab5 montre un niveau d'expression semblable à celui des myoblastes contrôles après 24 heures (Figure 46A). Cette réduction de l'expression de Rab5 s'accompagne de la diminution du nombre et de la taille des endosomes précoces dans les myoblastes DMD jusqu'à des niveaux quasi normaux (Figure 46B et 46C). Ainsi, la diminution de la protéine Rab5 dans les myoblastes DMD permet donc de largement rétablir l'anomalie endosomale observée.

Le nombre élevé d'endosomes dans les cellules musculaires DMD peut être causé par une augmentation de l'endocytose ou par un défaut de maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs puis lysosomes. Pour discriminer entre ces deux possibilités, l'endocytose et la maturation endo-lysosomale ont été mesurées dans les myoblastes DMD et contrôles.

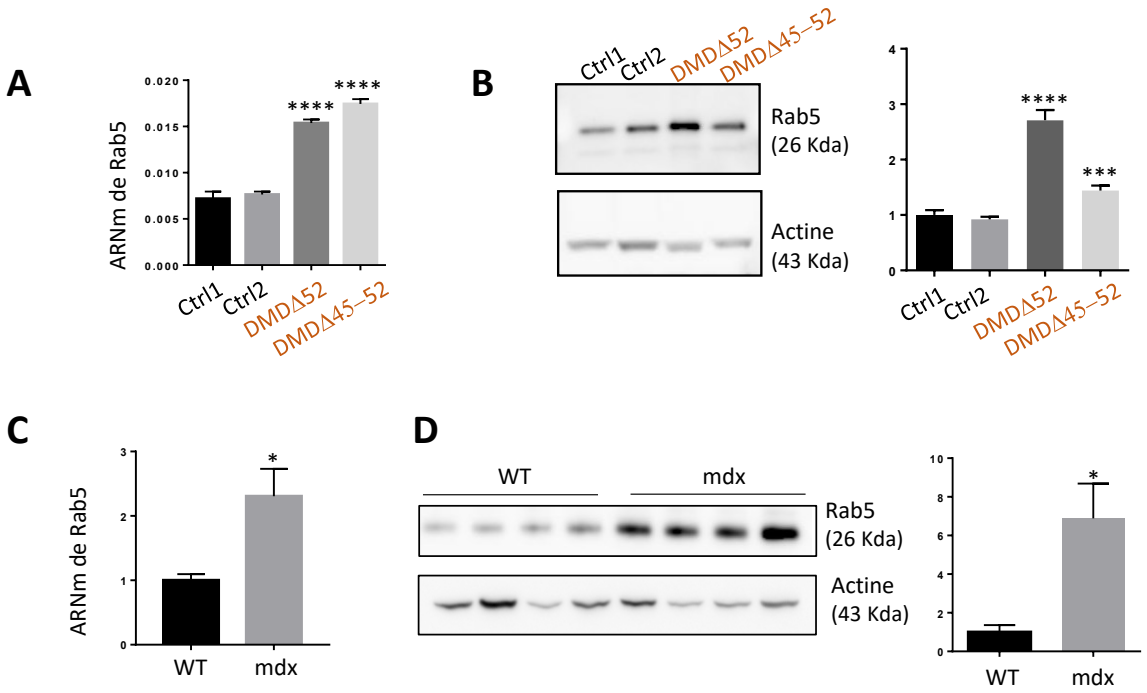


Figure 45: Rab5 est surexprimée dans les cellules musculaires DMD humaines in vitro et dans les muscles de souris mdx.

*Analyse de l'expression de l'ARNm de Rab5 par RT-qPCR dans **(A)** les myoblastes humains (n=3) et **(C)** les muscles de souris mdx comparés aux muscles de souris contrôles (n=4). L'expression de Rab5 a été rapportée à l'expression de la β-2-microglobuline pour les myoblastes humains et du Rn18s pour les muscles de souris. Analyse de l'expression de la protéine Rab5 par western blot dans **(B)** les myoblastes humains (n=3) et **(D)** les muscles de souris mdx comparés aux muscles de souris contrôles (n=4). * P<0,05, *** P<0,001 **** P <0,0001.*

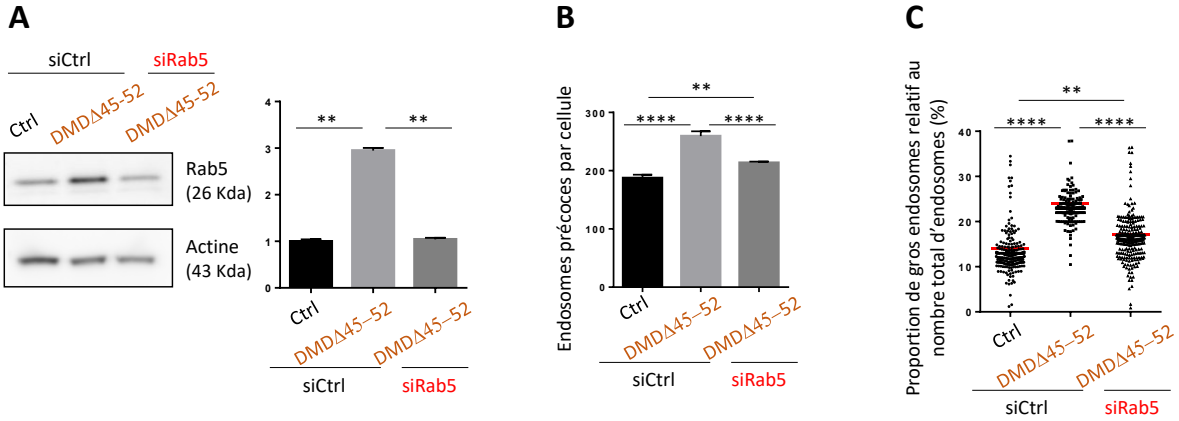


Figure 46: Le traitement des cellules DMD avec un siRNA Rab5 rétablit le nombre et la taille des endosomes à un niveau équivalent à celui des cellules contrôles.

***(A)** Analyse de l'expression de la protéine Rab5 par western blot montrant l'efficacité du siRNA Rab5 (siRab5) comparé au siRNA contrôle (siCtl) dans les myoblastes DMD (n=3). **(B)** Les myoblastes DMD montrent un nombre élevé d'endosomes précoces qui est normalisé par le siRab5. **(C)** Le pourcentage d'endosomes précoces volumineux (entre 1,10 et 6,59 µm2) relatif au nombre total d'endosomes diminue dans les myoblastes DMD traités avec le siRab5. L'analyse est réalisée sur des images confocales (100 images par expérience, n=3) à l'aide du logiciel CellProfiler). ** P<0,01, **** P <0,0001.*

g. Mesure de l'endocytose

La capacité d'internalisation par endocytose a été mesurée dans les myoblastes DMD grâce au test de capture de transferrine, une glycoprotéine qui est internalisée et rapidement dirigée vers la voie de recyclage. Pour cette mesure, j'ai incubé des myoblastes DMDΔ45-52 et contrôles avec de la transferrine couplée au fluorophore AlexaFluor-488 (Tf-488) sur glace pendant 1h puis mesuré l'intensité de fluorescence après 5, 10 et 15 minutes d'internalisation à 37°C dans du milieu sans transferrine. Dans les myoblastes contrôles, l'intensité de fluorescence diminue entre 5 et 15 minutes, dû au recyclage rapide de la transferrine. Dans les myoblastes DMD, l'intensité de fluorescence est moins importante que dans les contrôles après 5 et 10 minutes d'internalisation (Figure 47A). Aucune différence significative n'est observée après 15min. Afin de confirmer ces résultats, la même expérience a été réalisée avec de la transferrine biotinylée dont l'internalisation a été quantifiée par Western Blot (Figure 47B). Cette fois ci, l'incubation à 37°C a été réalisé avec du milieu contenant la transferrine, c'est pourquoi la quantité de transferrine présente dans les myoblastes contrôles et DMD augmente avec le temps d'incubation. Cette expérience confirme les résultats obtenus par fluorescence et montre une endocytose moins importante de la transferrine dans les cellules musculaires DMD par rapport aux contrôles.

Etant donné ces résultats, j'ai vérifié le niveau d'expression du récepteur à la transferrine (TfR) par western blot (Figure 47C). Mes résultats montrent une expression plus faible du TfR (68% du contrôle) dans les myoblastes DMD.

L'ensemble de ces résultats montre que l'endocytose de la transferrine est moins importante dans les myoblastes DMD comparé aux contrôles ce qui pourrait être lié au niveau d'expression du TfR qui est plus faible. Ainsi, l'augmentation du nombre d'endosome précoces ne semble pas être causée par une augmentation de l'endocytose.

h. Analyse de la maturation endo-lysosomale

La voie endo-lysosomale a été analysée en suivant l'entrée et le trafic de l'EGF (epidermal growth factor) qui est transporté des endosomes précoces aux lysosomes, où il est dégradé.

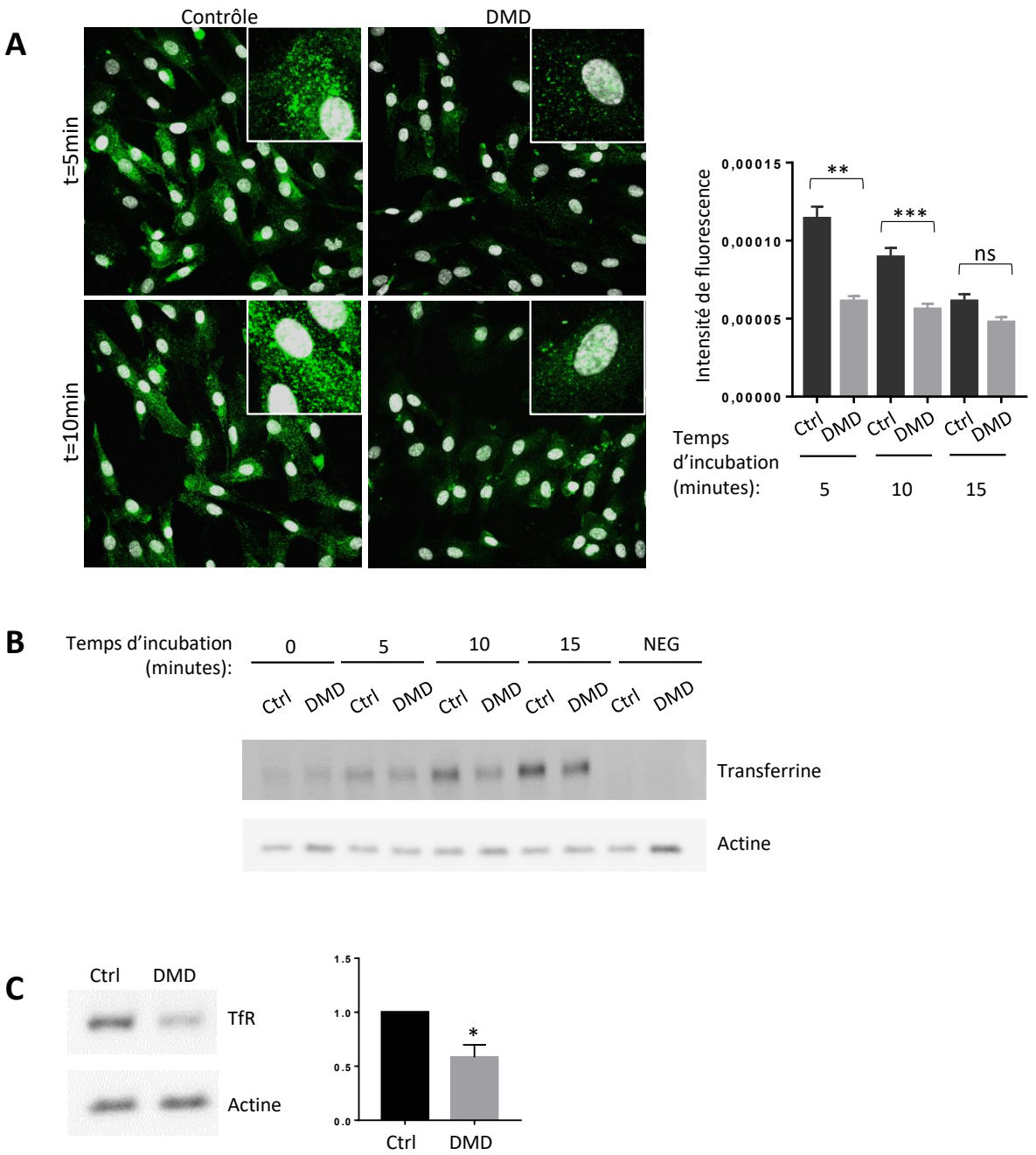


Figure 47: L'endocytose est réduite dans les myoblastes DMD humains.

*Les myoblastes issus de patients DMD (Δ45-52) et contrôles ont été incubés en présence de transferrine-alexa488 ou de transferrine biotinylée puis placée à 37°C pendant différents temps. L'analyse de la quantité de transferrine internalisée a été faite par mesure de **(A)** l'intensité de fluorescence (n=4 expériences) ou par **(B)** Western-Blot montrant que moins de transferrine est internalisée dans les myoblastes DMD (n=3). **(C)** La quantité totale de récepteur à la transferrine (TfR) a été mesurée par Western-Blot (n=4). L'analyse (A) a été réalisée sur des images confocales (50 images par expérience, n=3) à l'aide du logiciel CellProfiler. * P<0,05, ** P<0,01, *** P<0,001, ns: non significatif.*

Une analyse des endosomes hybrides (portant simultanément des marqueurs d'endosomes précoces et tardifs) et des lysosomes, témoins de la maturation endo-lysosomale a également été réalisée.

- **Analyse de la dégradation de l'EGF et de l'acidité endosomale**

J'ai incubé des myoblastes DMDΔ45-52 et contrôles avec de l'EGF couplé à l'AlexaFluor-488 (EGF-Alexa488) puis mesuré l'intensité de fluorescence à différents temps (0, 15, 30, 45 et 60 minutes) après internalisation. L'intensité de fluorescence de l'EGF est plus importante dans les myoblastes DMD par rapport aux contrôles et ceci dès 15 minutes d'incubation (Figure 48A et 48B). Ainsi, l'EGF semble être moins dégradé ou dégradé plus lentement dans les myoblastes DMD. La dégradation des protéines nécessite leur transfert dans les endosomes tardifs puis les lysosomes qui sont des structures à pH acide (pH=5,5 pour les endosomes tardifs et pH=5 pour les lysosomes). Cette acidité participe à la dégradation des molécules endocytées. J'ai donc vérifié l'acidité des endosomes en réalisant la même expérience avec un EGF couplé au pHrodo, un fluorophore dont l'intensité de fluorescence augmente avec l'acidité. Dans ce cas l'intensité de fluorescence de l'EGF-pHrodo est plus faible dans les myoblastes DMD par rapport aux contrôles et ceci dès les premières minutes après son internalisation (Figure 48C et 48D). La dégradation de l'EGF et l'acidité endosomale sont donc perturbées dans les myoblastes DMD.

- **Quantification des endosomes hybrides EEA1/CI-MPR**

La maturation des endosomes nécessite, entre autres, le remplacement des protéines membranaires spécifiques des endosomes précoces, dont EEA1, par des protéines spécifiques des endosomes tardifs, dont CI-MPR. Une augmentation de la présence du CI-MPR sur des endosomes précoces reflète en général un défaut de maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs (Vonderheit and Helenius 2005). J'ai donc mesuré le pourcentage de colocalisation d'EEA1 et CI-MPR (Figure 49). Le pourcentage de colocalisation est plus important dans les myoblastes DMD par rapport aux contrôles suggérant un plus grand pourcentage d'endosomes hybrides EEA1/CI-MPR et donc un défaut de maturation des

endosomes dans les myoblastes DMD. De plus, cette augmentation n'est pas observée dans les myoblastes de deux autres myopathies.

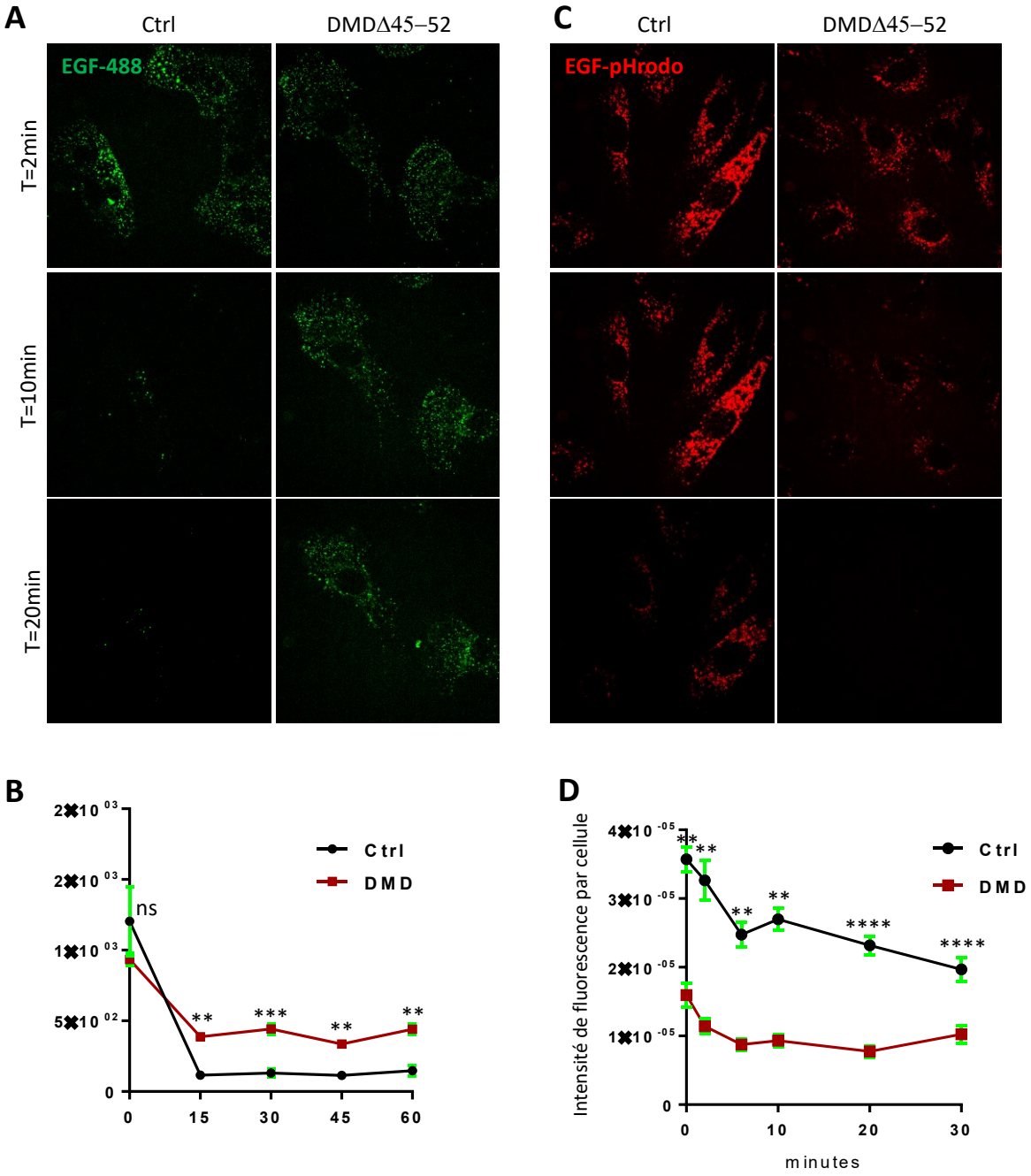


Figure 48: La dégradation de l'EGF et l'acidité endosomale sont perturbées dans les myoblastes DMD humains. *Les myoblastes issus de patients DMD (Δ45-52) et contrôles ont été incubés en présence* ***(A)*** *d'EGF-488 (en vert) ou* ***(C)*** *EGF-pHrodo (en rouge) puis placés à 37°C pendant différents temps.* ***(B)*** *La mesure de l'intensité de fluorescence par cellule de l'EGF-488 montre que l'EGF est dégradé moins rapidement dans les myoblastes DMD (n=150 cellules, à partir de 3 expériences indépendantes) tandis que* ***(D)*** *la mesure de l'intensité de fluorescence de l'EGF-pHrodo par cellule montre un défaut d'acidification endosomale dans les myoblastes DMD (n=150 cellules, à partir de 3 expériences indépendantes). L'analyse a été réalisée sur des images confocales à l'aide du logiciel CellProfiler. ** P<0,01 *** P<0,001, **** P<0,0001, ns : non significatif.*

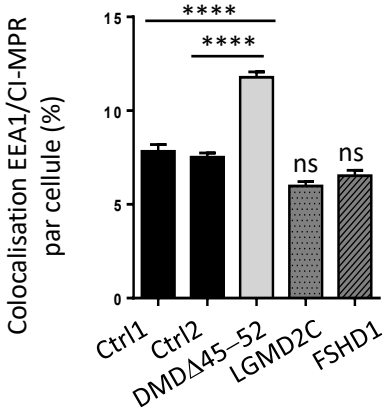


Figure 49: Le pourcentage d'endosomes hybrides EEA1/CI-MPR est plus important dans les myoblastes DMD.
*Le taux de colocalisation a été mesuré entre les marqueurs des endosomes précoces (EEA1) et tardifs (CI-MPR) montrant une augmentation de la colocalisation dans les myoblastes DMD par rapport aux contrôles, qui n'est pas retrouvée dans les myoblastes LGMD2C et FSHD1. L'analyse a été réalisée sur des images confocales (n=500 images provenant de 5 expériences indépendantes) à l'aide du logiciel CellProfiler. **** P <0,0001, ns, non significatif.*

- **Quantification de LAMP1, un marqueur des lysosomes dans les cellules musculaires de patients DMD**

L'altération de la dégradation de l'EGF dans les cellules DMD peut être liée à un défaut d'acidification endo-lysosomale ou à une quantité plus faible de lysosomes. Pour vérifier si les structures lysosomales sont présentes en même quantité dans les myoblastes DMD et contrôles, l'expression de la protéine LAMP1, un marqueur lysosomal, a été analysée par western blot. LAMP1 est moins exprimée dans les myoblastes DMD par rapport aux contrôles (Figure 50), suggérant un défaut lysosomal dans les myoblastes DMD.

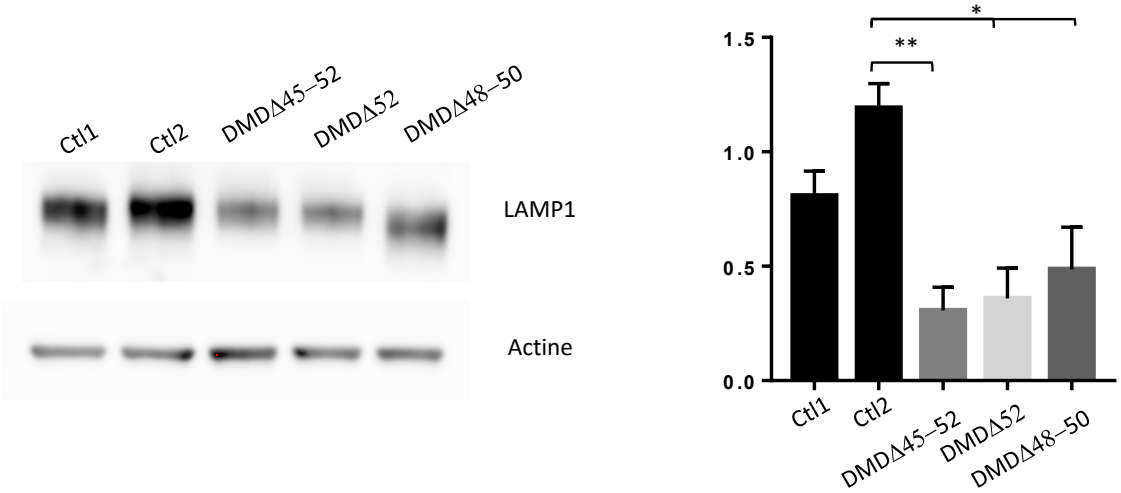


Figure 50: LAMP1, un marqueur lysosomal est moins exprimé dans les cellules musculaires DMD.
*Analyse de l'expression de la protéine LAMP1 par western blot dans les myoblastes humains. La quantification de la protéine montre que LAMP1 est moins exprimée dans les myoblastes DMD comparés aux contrôles (n=3). *P <0,05, **P <0,01.*

L'ensemble de mes résultats met donc en lumière un défaut de maturation de la voie endo-lysosomale dans les cellules musculaires DMD.

3) Matériel et méthodes

a. Matériel

- **Cellules**

Nom type cellulaire	Pathologie / mutation	Age du patient	Muscle prélevé
Ctrl1	Aucune	12 ans	Paraspinal
Ctrl2	Aucune	25 ans	Semi tendineux interne droit
Ctrl3	Aucune	19 ans	Intercostal
DMDΔ45-52	Dystrophie musculaire de Duchenne / délétion des exons 45-52 du gène DMD	23 mois	Quadriceps
DMDΔ52	Dystrophie musculaire de Duchenne / délétion de l'exon 52 du gène DMD	10 ans	Tenseur du fascia lata
DMDΔ48-50	Dystrophie musculaire de Duchenne / délétion des exons 48-50 du gène DMD	6 ans	Biceps gauche
DMDΔ44-50	Dystrophie musculaire de Duchenne / délétion des exons 44-50du gène DMD	2ans	Quadriceps gauche
LGMD2C	Myopathie des ceintures / Gamma sarcoglycane	12 ans	Fléchisseur commun des orteils
FSHD1	Myopathie facio-scapulo-humérale / facteur transcription DUX4	27 ans	Rhomboïde sous scapulaire

Ces cellules proviennent de la plateforme d'immortalisation des précurseurs musculaires de l'Institut de Myologie et sont utilisées sous protocole d'accord. Elles ont été immortalisées en bloquant le raccourcissement des télomères et en provoquant l'expression de Cyclin-dependent kinase-4 (CDK4) (Mamchaoui et al. 2011).

- **Animaux**

Les souris utilisées sont des souris C57BL6, provenant de Janvier Labs et des souris mdx, provenant de l'animalerie du laboratoire. Les muscles *extensor digitorum longus* (EDL) et

tibialis anterior (TA) ont été prélevées sur ces souris, après sacrifice, à l'âge de 15 jours et 3 mois.

Pour les coupes musculaires de chiens, une collaboration avec le Pr Stéphane Blot (Université Paris-Est, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, INSERM U955-E10) et le Dr Adeline Vulin (SQY Therapeutics) a été établie. Les coupes musculaires ont été réalisées à partir de biopsies du *Biceps Femoris* (BF) de Golden retriever sains, de GRMD de 6 mois et de GRMD de 20 mois injectés en intra-musculaire avec 10^{12} copies d'AAV1-U7-ES6-8 ou du sérum physiologique à l'âge de 14 mois.

- **Coupes musculaires de patients**

Les coupes musculaires de patients proviennent de l'unité de morphologie neuromusculaire de l'Institut de Myologie (collaboration avec Norma Romero). Ces coupes ont été réalisées sur des biopsies musculaires d'individus sains, âgés de 3, 5 et 10 ans et de patients DMD, âgés de 4, 5 et 10 ans ayant différentes mutations (DMDΔ45-52, DMDΔ52 et DMDΔ48-50). Les biopsies ont toutes été réalisées dans le muscle deltoïde, à part celle du patient DMDΔ52 qui a été réalisée dans le quadriceps.

b. Méthodes

- **Culture cellulaire**

Les myoblastes sont cultivés à 37°C en atmosphère à 5% de CO_2 dans du milieu DMEM (Gibco) additionné de 20% de sérum de veau fœtal (SVF), 16% de DMEM 199 (Gibco), gentamycine à 0,1ng/ml, Fétuine (Life Technologies) à 25µg/ml, βFGF (Life Technologies) à 0,5ng/ml, EGF (Life Technologies) à 5ng/ml, Insuline (Sigma Aldrich) à 5mg/ml et Déxamethasone (Sigma Aldrich) à 0,2mg/ml, appelé milieu KMEM. Pour la différenciation en myotubes, les cellules sont cultivées sur matrigel (Corning) et le milieu KMEM est remplacé par du milieu DMEM (Gibco) additionné de gentamycine à 0,1ng/ml et d'Insuline (Sigma Aldrich) à 10mg/ml pendant une semaine.

- **Immunofluorescence des cellules musculaires**

Les cellules sont ensemencées à 40 000 cellules dans des plaques de culture 24 puits (Dominique Dutscher) puis fixées 24h plus tard, avec du paraformaldéhyde (PFA) 4%.

Les cellules sont perméabilisées avec du Phosphate Buffered Saline 1X (PBS 1X), 0,5% Triton pendant 10 minutes puis saturées dans du PBS 1X, 4% Bovine Sérum Albumine (BSA) pendant 1h. Elles sont ensuite incubées avec les anticorps primaires anti-EEA1 (Cliniscience, ab0006-200), anti-CI-MPR (Abcam, ab32815), anti-vinculine (Santa Cruz, sc73614), anti-LAMP1 (Santa Cruz, sc20011) ou anti-AAV8 (Collaboration avec J Kleinschmidt, German Cancer Research Center, Heidelberg, Allemagne) dilués dans du PBS 1X, BSA 4%. Après 3 lavages au PBS 1X, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires Âne anti Chèvre (DAG) Alexa 488, Âne anti Lapin (DAR) Alexa 594 et Âne anti Souris (DAM) Alexa 647 dilués dans du PBS 1X, BSA 4%. Les cellules sont de nouveau lavées 3 fois puis incubées pendant 5 minutes avec du DAPI dilué dans du PBS 1X puis lavées 2 fois avant d'être montées sur lames avec du Fluoromount-G (SouthernBiotech).

- **Production de vecteurs et transduction de cellules**

Les vecteurs AAV ont été produits par tri-transfection par le plateau technique de production de vecteurs MyoVector du Centre de Recherche en Myologie. Les titres viraux ont été déterminés par PCR quantitative et exprimés en génomes viraux par millilitres (vg/ml).
Pour la transduction, les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits dans du Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10% SVF. 24h après ensemencement les cellules sont incubées dans du DMEM à 2% SVF en présence de 10^5 vg/cellules d'AAV8-luciférase.

- **Quantification des génomes viraux**

Les génomes viraux ont été extraits à partir de cellules transduites à l'aide du Puregene Blood kit (Qiagen). Le nombre de génomes viraux par noyaux ont été quantifiés à partir de 100ng d'ADN génomique par PCR quantitative absolue (qPCR) à l'aide de l'ABsolute QPCR ROX Mix (Life technologies) sur l'appareil StepOnePlusTM (Applied Biosystems). Les amorces (sens : CTCCATCACTAGGGGTTCCTTG et antisens : GTAGATAAGTAGCATGGC) et la sonde (TAGTTAATGATTAACCC) sont utilisées pour amplifier spécifiquement les génomes AAV. Les amorces (sens : AAAACGAGCAGTGACGTGAGC et antisens : TTCAGTCATGCTAGCGC) et la sonde (TGCACGGAAGCGTCTCGTCTCAGTC) sont utilisées afin d'amplifier spécifiquement le gène RPLP0. Les génomes viraux sont quantifiés à l'aide d'une gamme standard réalisée à partir de dilutions en série de plasmide pAAV.

- **Quantification luciférase**

La luminescence est mesurée dans le lysat cellulaire grâce au kit Luc Screen® system (Life Technologies) selon le protocole du fournisseur à l'aide du lecteur de plaques FlexStation3 (Molecular Devices).

- **Fractionnement cellulaire et quantification de la décapsidation**

Les cellules ont été transduites avec un AAV8-GFP à 200 000vg/cellules pendant 30min puis incubées toute la nuit dans du DMEM à 10% SVF.

Les souris ont été injectées en intramusculaire à l'âge de 4 mois avec 5.10^{10}vg d'AAV8-mSEAP dans 50µl de PBS dans le *Tibialis Anterior.*

Le fractionnement cellulaire a été fait avec le kit NE-PER (Life Technologies) selon le protocole du fournisseur à partir de culots cellulaires ou de muscle Tibialis Anterior préalablement broyés. Après fractionnement, chaque fraction est ajustée avec du benzonase buffer pour avoir une concentration finale de 10mM Tris-HCl (pH=7,5) et de 5mM MgCl2. Les fractions sont séparées en deux et 250U de benzonase sont ajoutés dans la première moitié qui est ensuite incubée 1h à 37°C. 2U de protéinase K sont ensuite ajoutés dans l'ensemble des échantillons, qui sont incubés à 95°C. L'ADN des échantillons est extrait par 3 cycles à l'alcool phenol-chloroform-isoamyl suivit d'une précipitation de l'ADN après incubation à -20°C toute la nuit dans 1/10 du volume des échantillons d'acétate de sodium (3M, pH=5,2) et 2,5 volumes d'éthanol 95%. Les génomes viraux sont quantifiés comme expliqué précédemment.

- **Western Blot**

Les cellules sont lysées avec le tampon Ripa (Sodium deoxycholate 0,5%, NaCl 150mM, Hepes 50mM pH=7,4, NP40 1%, Dodécylsulfate de Sodium (SDS) 0,1%, Éthylène Diamine Tétra-Acétique (EDTA) 1mM, Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 1mM (un inhibiteur de protéases) pendant 1h à 4°C. Après centrifugation de 20 minutes à 13 000g, le surnageant des cellules est récupéré. La concentration des protéines est évaluée par la méthode BCA selon le protocole du fournisseur (Life Technologies).

Les protéines sont séparées sur un gel de polyacrylamide 4-12% dans un tampon de migration NuPAGE MOPS SDS à 110V. Les protéines sont transférées sur une membrane Polyvinylidene Difluoride (PVDF) pendant 2h à 200mA dans du tampon de transfert (150 ml Tris- glycine 10X (Biorad), 300mL EtOH, 3,25ml SDS 10% qsp H_2O 1,5L). La membrane est ensuite saturée dans

une solution TBST (Tris-buffered saline 1X, tween 0,1%)-Lait en poudre 5%, puis la membrane est incubée toute la nuit à 4°C dans une solution TBST-Lait 5% en présence des anticorps primaires anti-Rab5 (Santa Cruz, sc46692), anti-Dystrophine (Santa Cruz, sc7461), anti-LAMP1 (Santa Cruz, sc20011) ou anti-Actine (Sigma, a2066). La membrane est ensuite lavée trois fois dans une solution de TBST pendant 10 minutes puis incubée 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à la péroxydase (Mouton anti-souris HRP ; Chèvre anti-Lapin HRP ; Âne anti-chèvre HRP) dilués dans du TBST-Lait 5%. Après 3 lavages, la révélation est réalisée grâce au kit Pierce ECL 2 Western Blotting Substrate (Thermo Scientific) avec le ChemiDoc MP Imaging System (BioRad).

- **Quantification des ARNm Rab5**

Les transcrits ont été isolés avec le kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel) et la rétrotranscription a été effectuée à partir de 200ng d'ARN avec la Superscript™ II et des amorces aléatoires (Life Technologies). Les transcrits Rab5 ont été quantifiés et normalisés avec la β-2-microglobuline (β2M) pour les ARN provenant de cellules humaines et Rn18s pour les ARN provenant de souris en utilisant les TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies) sur l'appareil StepOnePlusTM (Applied Biosystems).

- **Transfection de siARN**

24h après ensemencement, les cellules sont lavées deux fois avec de l'Opti-MEM (Life Technologies) puis incubées pendant 5h en présence des 15pmol de siARN Rab5 (Life Technologies) dans 400µl d'Opti-MEM et 2µl de lipofectamine par puits. Après 5h, les cellules sont lavées avec du PBS 1X et le milieu est remplacé par 500µl de KMEM. Après 24h de transfection, les cellules sont fixées ou les culots cellulaires sont récupérés.

- **Isolation des fibres musculaires de souris**

Après sacrifice des souris mdx ou C57BL6, les muscles EDL sont prélevés puis incubés dans 2ml de DMEM contenant 0,2% de collagénase pendant 1h30 à 37°C. Après incubation, les fibres sont dissociées mécaniquement à l'aide d'une pipette Pasteur puis fixées dans du PFA 4% pendant 10 minutes.

- **Immunofluorescence des fibres isolées de souris**

Les fibres sont perméabilisées avec un tampon composé de PBS 1X, Triton 0,7%, Tween-20 0,1%, BSA 4% toute une nuit (ON) à 4°C sous agitation. Elles sont ensuite incubées ON avec les anticorps primaires anti-EAA1 (Santa Cruz, sc6415), anti-CI-MPR (Abcam, ab32815) et anti-αtubuline (Sigma, t5168) dilués dans le tampon PBS 1X, Tween 0,1%, Triton 0,2%, BSA 4%. Les fibres sont alors rincées avec du PBS-T (PBS 1X, Tween-20 0,1%) puis elles sont incubées avec les anticorps secondaires (DAG-594, DAR-488 et DAM-647) dilués dans le tampon d'anticorps 1h à température ambiante puis pendant 5 minutes avec du DAPI dilué dans du PBS 1X . Après 3 lavages au PBS-T, elles sont montées sur des lames avec du Fluoromount-G (SouthernBiotech).

Les images sont prises au microscope confocal et le volume de la fibre ainsi que les endosomes et noyaux sont comptés avec l'aide du logiciel Fiji.

- **Immunofluorescence sur coupes musculaires de chiens et humaines**

Les coupes de biopsies musculaires sont fixées pendant 10 minutes avec de la PFA 4%. Après 3 lavages au PBS 1X, les échantillons sont perméabilisés avec du PBS 1X, 0,25% Triton puis saturés avec du PBS 1X, 10% SVF. Les coupes musculaires sont ensuite incubées ON avec les anticorps primaires anti-calvéoline 3 (Santa Cruz, sc5310), anti-EAA1 (Santa Cruz, sc6415) et anti-CI-MPR (Abcam, ab32815) dilués dans du PBS 1X, 2% SVF. Après 3 lavages au PBS 1X, les échantillons sont incubés pendant 1h avec les anticorps secondaires (DAM-488, DAG-594 et DAR-647) puis à nouveau lavés 3 fois et incubés pendant 5 minutes avec du DAPI dans du PBS 1X. Après 3 lavages au PBS 1X, les échantillons sont montés sur lames avec du Fluoromount-G (SouthernBiotech).

Les images sont prises au microscope confocal et les endosomes et noyaux sont quantifiés avec le logiciel Cell Profiler.

- **EGF-488 et EGF-pHrodo**

Les cellules sont ensemencées dans du DMEM 10% SVF. 24h après ensemencement, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS 1X puis incubées 45min dans 350µl de DMEM, 0,02M Hepes, 1% BSA. Les cellules sont ensuite placées sur de la glace et lavées deux fois avec du PBS 1X froid puis incubées 1h en présence de 2µg/ml d'EGF (ThermoFisher, P35375 ou P35375). Après 1h, les cellules sont lavées avec du PBS froid puis placées dans le microscope dans une

chambre thermostatée à 37°C dans du DMEM, 0,02M Hepes, 1% BSA. Les images sont ensuite prises en « LIVE» toutes les minutes pendant 1h au microscope confocal et l'intensité de fluorescence est mesurée pour chaque cellule grâce au logiciel Fiji.

- **Transferrine-biotinylée**

Les cellules ensemencées la veille, sont lavées 2 fois avec du PBS puis incubées 45min dans du DMEM, 0,02M Hepes, 1% BSA. Les cellules sont ensuite placées sur de la glace et lavées avec du PBS froid puis incubées 15 minutes en présence de 25µg/ml de transferrine-biotinylée. Les cellules sont ensuite placées à 37°C pendant les différents temps souhaités puis lavées successivement sur glace avec du DMEM pH=2 et du PBS 1X. La lyse des cellules se fait avec le tampon Ripa. L'extraction des protéines et le western blot sont faits comme décrit précédemment et la streptavidine-HRP est utilisée à la place des anticorps.

- **Transferrine-488**

Les cellules ensemencées la veille sont lavées 2 fois avec du PBS puis incubées 45min dans du DMEM, 0,02M Hepes, 1% BSA. Les cellules sont ensuite placées sur de la glace et lavées avec du PBS froid puis incubées en présence DMEM, 0,02M Hepes, 1% BSA, 25µg/ml Transferrine (ThermoFisher, T13342). Après 1h, les cellules sont lavées avec du LCIS (Live Cell Imaging Solution) (DMEM, 20mM Glucose, 0,14M NaCl, 2,5mM KCl, 1,8mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 20mM Hepes et 1% BSA) froid puis incubées à 37°C en présence de DMEM/Hepes/BSA à différents temps puis les cellules sont fixées à la PFA 4%. Les images sont prises au microscope confocal et l'intensité de fluorescence est mesurée pour chaque cellule grâce au logiciel Fiji.

- **Microscopie électronique**

Après avoir été ensemencées sur lamelles Thermanox, les myoblastes ont été fixés en PBS 1X, PFA 4 %, Glutaraldéhyde 0,1 %. Après plusieurs rinçages au PBS et une étape de masquage des aldéhydes avec du PBS, 0,05% glycine, les cellules ont été bloquées avec du PBS, 5% serum de chèvre puis incubées dans la solution d'anticorps primaire anti-EEA1 (Cell Signaling). Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin conjugué à l'or (Aurion). Cette étape est suivie d'une amplification à l'Argent (HQ silver, Nanoprobes). Après une post-fixation au OsO4 (2%) et une déshydratation des échantillons par une série de bains de concentrations croissantes d'acétone comprenant une étape de coloration par 1%

d'acétate d'uranyle dans l'acétone 70%, les lamelles ont été inclues en résine Epon. Les coupes ultra-fines de 70nm d'épaisseur ont été légèrement marquées au citrate de plomb et observées au microscope électronique à transmission Philips CM120 (Philips, Eindhoven, The Netherlands) à 80kV. Les images ont été acquises avec une caméra digitale Morada (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Allemagne).

- **Statistiques**

Les statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graph Pad Prism. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes ± SEM. La significativité de la différence entre les moyennes a été mesurée en utilisant un test d'analyse de variances univariées ANOVA avec un test post hoc Bonferroni, pour tous les résultats, excepté la différence du nombre d'endosomes dans les fibres isolées de souris, de l'expression de Rab5 en protéine et ARNm ainsi que l'expression du TfR qui ont été analysés avec un test de Student non apparié.

II. Les facteurs de transcription Rfx1 et Rfx3 interagissent avec la séquence D de l'AAV et sont capables de moduler son efficacité de transduction

1) Contexte

Le tropisme tissulaire et l'efficacité de transduction des vecteurs AAV sont étroitement liés à leurs interactions avec des protéines cellulaires. En effet, ces protéines sont impliquées dans chaque étape du cycle viral comme le transport des vecteurs AAV jusqu'au noyau, leur décapsidation, l'import nucléaire, la synthèse du second brin et leur expression. Plusieurs protéines cellulaires sont connues pour interagir avec la région ITR du génome viral. C'est le cas des protéines de la machinerie de réparation des cassures double brin d'ADN qui régulent la conversion du génome AAV simple brin en double brin (Zentilin et al. 2001), de la FKBP52, qui inhibe la synthèse du second brin lorsqu'elle est phosphorylée (Qing et al. 2003) mais aussi du facteur de transcription cyclic AMP response element-binding protein (CREB) qui régule l'expression du transgène. Pour rappel, les séquences ITR de l'AAV2 sont les seules séquences virales présentes dans tous les vecteurs viraux. Elles sont composées d'une séquence palindromique double brin et d'une séquence simple brin appelée séquence D. Les interactions de protéines cellulaires avec les ITR sont actuellement peu connues et une meilleure connaissance de ces interactions permettrait d'identifier d'éventuels voies d'amélioration de l'efficacité de transduction par les AAV et donc des thérapies géniques utilisant ces vecteurs. Nous avons donc étudié quelles protéines cellulaires sont capables d'interagir avec la séquence D et leur rôle sur l'efficacité de transduction des vecteurs AAV.

2) Résumé

Afin d'analyser les facteurs cellulaires capables d'interagir avec la séquence D de l'AAV2, des expériences de retard sur gel ont été réalisées à partir d'extraits nucléaires de cellules HEK293 (Figure 1 de l'article). Cette expérience a montré la fixation de deux complexes, appelés C1 et C2, à la séquence D double brin de l'AAV2 appelée D2. La formation des complexes C1 et C2 à la séquence D double brin a également été analysée pour les séquences D des AAV de

sérotypes 1 à 5 (Figure 2, A) par retard sur gel, ce qui a montré que C1 et C2 interagissent avec les séquences D double brin des AAV1 et 2 (D1 et D2) mais pas avec les celles de D3, D4 et D5. L'analyse des séquences D des différents sérotypes par alignement de séquence a montré qu'un nucléotide C à la position 8 est essentiel à la fixation des complexes (Figure 2, B). Pour vérifier cette hypothèse, une séquence D2 comportant une substitution C par T à la position 8, appelée Dmut, a été synthétisée et analysée par retard sur gel, montrant, comme attendu, que la séquence Dmut n'est plus capable d'interagir avec C1 et C2 (Figure 2, C). Une recherche d'homologie avec des séquences connues a montré une similarité de séquence entre la séquence D, la séquence consensuelle de fixation des protéines RFX et la X-box (Figure 3, A). La X-box est un motif retrouvé dans les promoteurs des gènes HLA de classe II et est efficacement reconnue par les protéines de la famille RFX. Ces protéines sont des facteurs de transcription capables de réguler l'expression de gènes cellulaires et viraux. La présence de protéines RFX dans les complexes C1 et C2 a été évaluée par retard sur gel sur les extraits nucléaires en utilisant des anticorps dirigés contre différentes protéines de la famille RFX (Figure 3, C) puis à partir de protéines RFX1 et RFX3 synthétisées *in vitro* (Figure 4). Ces expériences ont montré que le complexe C1 est composé d'un homodimère RFX1/RFX1 tandis que le complexe C2 est composé d'un hétérodimère RFX1/RFX3.

Afin d'évaluer le rôle des protéines RFX1 et RFX3 sur la transduction des vecteurs AAV, des cellules HEK-293 ont été transfectées avec des siRNA dirigés contre RFX1 ou RFX3 puis transduites avec un AAV1 contenant le gène rapporteur murine secreted alkaline phosphatase (mSEAP) (Figure 5). L'inhibition de RFX1 montre une diminution de l'expression du transgène, suggérant que RFX1 joue un rôle dans l'efficacité de transduction de l'AAV. Au contraire, l'inhibition de RFX3 n'engendre pas de modification d'expression du transgène, suggérant que RFX3 n'impacte pas l'efficacité d'expression de l'AAV. Pour évaluer si la substitution C par T dans la séquence D2 impacte la transduction, un vecteur AAV1-mSEAP comportant la séquence D2 mutée, appelé mutAAV1-mSEAP, a été produit. Les cellules ont ensuite été transduites avec cet AAV muté, ou l'AAV1-mSEAP sauvage puis l'efficacité de transduction a été mesurée (Figure 6, A). En adéquation avec les expériences réalisées avec les siRNA, une diminution significative de la transduction est observée lorsque les cellules sont transduites avec le mutAAV1-mSEAP, comparé à l'AAV1-mSEAP. La mutation ponctuelle de la séquence D à la position 8 semble donc affecter l'efficacité de transduction de l'AAV. Enfin, la fixation des protéines RFX à la séquence D2 a été vérifiée dans un contexte viral, par des expériences

d'immunoprécipitation. Ces expériences ont montré que l'AAV1-mSEAP interagit avec les protéines RFX1 et RFX3, contrairement au mutAAV1-mSEAP qui n'interagit ni avec RFX1, ni avec RFX3. La séquence D2 est donc capable d'interagir avec RFX1 et RFX3 dans un contexte viral.

Cette étude montre que les facteurs de transcription RFX1 et RFX3 sont capables d'interagir avec la séquence D du génome AAV. De plus, RFX1 est capable de moduler l'efficacité d'expression des vecteurs AAV. Cependant, le mécanisme d'action permettant à RFX1 de moduler l'expression de l'AAV n'est pour le moment pas connue et devra faire l'objet d'études futures.

3) Contribution au projet

Ma contribution dans ce projet a été l'évaluation du rôle des protéines RFX1 et RFX3 sur l'efficacité de transduction des vecteurs AAV. Pour cela, j'ai participé aux expériences utilisant les siARN dirigés contre RFX1 ou RFX3 en mesurant le niveau d'expression de RFX1 et RFX3 en ARNm et protéines (Figure 5, A) puis en analysant l'expression en ARNm du transgène muSEAP ainsi que l'activité de la muSEAP dans le surnageant (Figure 5, B). De la même façon, j'ai participé à l'évaluation de l'efficacité de transduction des vecteurs AAV1-mSEAP et mutAAV1-mSEAP (Figure 6, A). L'impact de l'inhibition de RFX1 et RFX3 a également été mesurée sur des cellules transduites avec le vecteur mutAAV1-mSEAP, pour lequel j'ai évalué l'efficacité de transduction de l'AAV (Figure supplémentaire S4). J'ai également vérifié l'intégrité des génomes viraux de ces deux vecteurs, par migration sur gel d'agarose dans des conditions dénaturantes et non dénaturantes (Figure supplémentaire S3). Enfin, j'ai mis au point et réalisé les expériences d'immunoprécipitation permettant de conclure à une interaction entre la séquence D2 et RFX1 et RFX3 dans un contexte viral (Figure 6, B).

4) Article

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

RFX1 and RFX3 Transcription Factors Interact with the D Sequence of Adeno-Associated Virus Inverted Terminal Repeat and Regulate AAV Transduction

Received: 7 July 2017
Accepted: 13 December 2017
Published online: 09 January 2018

Laura Julien[1], Julie Chassagne[1], Cécile Peccate[1], Stéphanie Lorain[1], France Piétri-Rouxel[1], Olivier Danos[2] & Sofia Benkhelifa-Ziyyat[1]

Adeno-associated virus (AAV) transduction efficiency depends on the way in which cellular proteins process viral genomes in the nucleus. In this study, we have investigated the binding of nuclear proteins to the double stranded D (dsD) sequence of the AAV inverted terminal repeat (ITRs) by electromobility shift assay. We present here several lines of evidence that transcription factors belonging to the RFX protein family bind specifically and selectively to AAV2 and AAV1 dsD sequences. Using supershift experiments, we characterize complexes containing RFX1 homodimers and RFX1/RFX3 heterodimers. Following transduction of HEK-293 cells, the AAV genome can be pulled-down by RFX1 and RFX3 antibodies. Moreover, our data suggest that RFX proteins which interact with transcriptional enhancers of several mammalian DNA viruses, can act as regulators of AAV mediated transgene expression.

Adeno-associated virus (AAV) is a helper-dependent parvovirus with a small single-stranded (ss) DNA genome. Its replication depends on the activity of cellular factors which are triggered by co-infecting helper viruses or, albeit with a lower efficiency, by a variety of genotoxic stresses[1,2]. These factors are involved in every step of the viral life cycle, including the conversion of the ssDNA into a double-stranded (ds) transcription template, the production of viral transcripts, and the assembly of capsids. A number of cellular proteins interact with the palindromic Inverted Terminal Repeat (ITR), a 145 nucleotides element which folds into a T-shaped duplex structure (A′-B′-B-C′-C-A) at both extremities of the viral genome[2,3]. ITRs are required for replication, packaging, integration into the host cell DNA and proviral rescue, and they also contain promoter elements[4,5]. This short sequence is the only viral information present in gene transfer vectors derived from AAV. Recombinant AAV vectors (rAAV) are remarkably efficient for the transduction of certain cells and tissues, especially in the neuromuscular system, whereas some cellular targets appear to be much less permissive[6-8]. Although receptor attachment determines AAV vector tropism, several steps after internalisation including viral trafficking, nuclear entry, uncoating, and second-strand synthesis pose significant barriers to functional transduction[8]. Cell permissivity and transduction efficiency also relie on still poorly characterized interactions of cellular factors with the ITRs. Proteins active in double strand break repair recognize the ITRs and regulate the conversion of ssDNA into transcriptionally active dsDNA[9,10]. They are also involved in the formation of large concatemers of vector genomes[11-14] and in the stabilization of transcriptionally active transgene expression cassettes[15]. FKBP52, a steroid receptor-associated immunophilin, also binds the ITR in a phosphorylation dependent manner and has been associated with cell permissivity to AAV vectors[16-18]. Multiple transcription factors binding sites are present in the ITR sequence[19,20] and binding has been documented for the C-AMP response element-binding protein (CREB) and the NF-κB-repressing factor (NRF)[19,21].

[1]Sorbonne Universités UPMC Univ Paris 06, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie (CRM), GH Pitié Salpêtrière, 105 bd de l'Hôpital, Paris, 13, France. [2]REGENXBIO, 9600 Blackwell Rd, Rockville, MD, 20850, USA. Laura Julien and Julie Chassagne contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.B.-Z. (email: s.benkhelifa@institut-myologie.org)

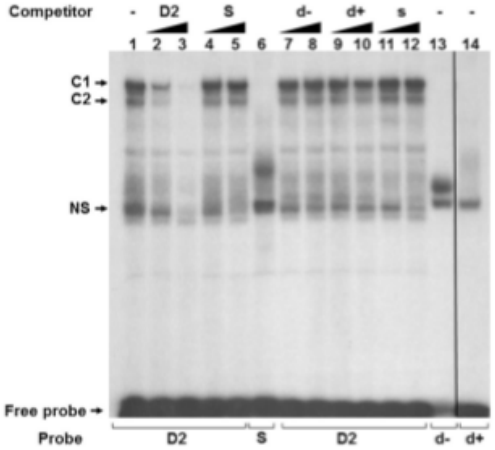


Figure 1. Binding of nuclear factors to the double stranded (ds) D sequence of AAV2 (D2) analysed by EMSA using HEK-293 cells nuclear extracts. The binding reaction was performed in absence of competitor DNA (lane 1) or in presence of increasing concentration of ds competitors, D2 (lanes 2 and 3) or S (lane 4 and 5) or unlabeled ssDNA of these sequences (d−, d+ and s) (lanes 7 to 12). The binding reaction was also performes with d− and d+ probes (lanes 13 and 14). C1 and C2 complexes were formed specifically with D2. Unknown shifted complexes were observed with S, d− and d+ probes (lanes 6, 13 and 14). NS indicate non-specific protein(s) binding to the oligonucleotides used.

In this study, we have further investigated the nature of nuclear proteins able to bind the double stranded D sequence of the AAV2 ITR (D2) using electromobility shift assays (EMSA). We report that transcription factors from the RFX family bind the D2 sequence and regulate AAV transduction. RFX (Regulatory factor X) proteins are transcription factors with a highly conserved DNA-binding domain that recognizes the X-box motif in several promoters[22–24]. Eight mammalian RFX factors (RFX1-8) have been identified, RFX1-3 being the most studied[25]. RFX1, RFX2, and RFX3 bind their target sites as monomers, homodimers and heterodimers and are involved in the regulation of viral and cellular genes[26–33]. Here, we demonstrate that RFX1 homodimer and RFX1/RFX3 heterodimer form specific complexes with D2. We also showed that RFX1 and RFX3 interact specifically with D2 in rAAV transduced HEK-293 cells and modulate AAV mediated transgene expression.

Results

Nuclear factors bind the double stranded D2 of AAV ITR. To analyse cellular factors able to bind the double stranded (ds) sequence from AAV2 (D2), we performed electrophoretic mobility shift assays (EMSA) with nuclear extracts (NE) from HEK-293 cells. As shown in Fig. 1, a D2 probe promoted the formation of two complexes, designated C1 (major) and C2 (minor) respectively (Fig. 1, lane 1). To verify the binding specificity of C1 and C2 complexes, HEK-293 NE were incubated with the D2 probe in the presence of 100-fold or 200-fold molar excess of unlabeled ds competitor oligonucleotides. The D2 sequence was able to compete efficiently for C1 and C2 complexes formation (lanes 2 and 3), whereas an excess of the unrelated ds sequence (S) was unable to do so (lanes 4 and 5). Competition experiments with these sequences as single stranded (ss) DNA (d−, s) (lanes 7-8 and 11–12) had no effect on complex formation. While d+ inhibit slithly D2 binding in competition experiments (lanes 9 and 10), no detectable C1 and C2 complexes were observed with d+ (lane 14), d− (lane 13) and S (lane 6). D2 binding was also observed using nuclear extracts from HeLa and SUP-T1 cells (Supplementary Fig. S1). Thus cellular factors present in the HEK-293 NE are able to bind specifically the ds D sequence of AAV2.

Analysis of C1 and C2 complex formation on D sequences of other AAV serotypes. The formation of complexes was also studied using D sequences from AAV serotypes 1 to 5 (D1 to D5). Figure 2A shows that C1 and C2 complexes were only detected with D1 and D2 and that the relative quantities of these two complexes were conserved. D1 and D2 sequences display differences in the first four nucleotides (boxed in Fig. 2B) suggesting that those are not necessary for C1 and C2 complex formation. Interestingly, the D3 sequence, which did not form complexes (Fig. 2A, lane 2), displays one additional change at position 8 (boxed in Fig. 2B). This nucleotide is also different in the more divergent D4 and D5 sequences which also failed to form complexes. To verify whether this nucleotide is important for C1 and C2 complex formation, a C to T substitution was introduced in D2 and the mutated D2 oligonucleotide (mutD in Fig. 2B) was analysed for its ability to form complexes (Fig. 2C). mutD was unable to compete with D2 (lanes 3) and was unable to form the C1 and C2 complexes (lane 4) indicating that C1 and C2 complex formation requires a C nucleotide at position 8 in the D sequence of AAV.

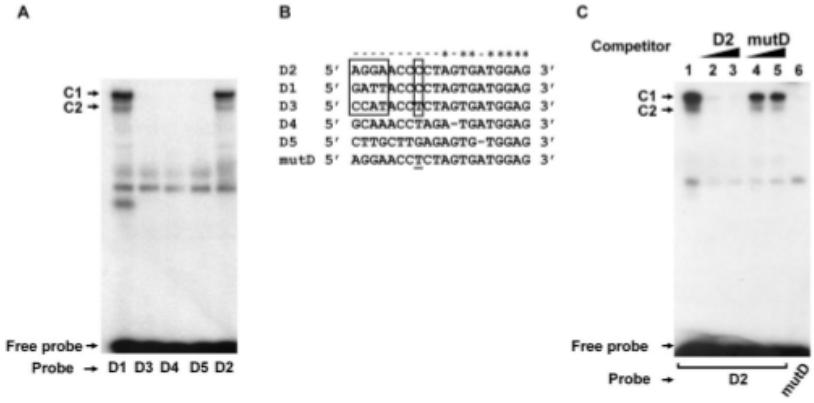


Figure 2. **(A)** Analysis of C1 and C2 complex formation on D sequences of AAV serotypes. 293 cells NE was used in EMSA with dsD sequences from AAV1 to AAV5 (D1 to D5). **(B)** Sequence alignment of D sequences of AAV serotypes. The variable sequence in D1, D2 and D3 is delineated by boxes. mutD represent the mutated D2 sequence. **(C)** Identification of nucleotide requirement of C1 and C2 complexes binding to the D2 sequence. EMSA was carried out with the D2 sequence in absence of competitor DNA (lane 1) or in presence of 200-fold molar excess of unlabeled D2 (lanes 2) or mutD (lane 3) competitors. mutD oligonucleotide was also used as a probe (lane 4). The Black line delineate the boundary between not contiguous lanes of the same gel. (.) Identical nucleotides and (−) differents nucleotides in D1–D5 sequences.

RFX proteins bind specifically to the D2 sequence. The DNA sequence alignment shown in Fig. 3A reveals homologies between the D2 sequence, the consensus binding motif for the RFX family of transcription factors and the X-DRA sequence (X-box). The X-box found in the promoter of HLA class II genes is efficiently recognized by all members of the RFX family including RFX1, RFX2, RFX3 and RFX5[28,34]. RFX5 has a different structure and associates with the HLA class II promoter in combination with two other factors, RFXAP and RFXANK/RFXB[35]. To test the possibility that proteins related to the RFX family form complexes with the D sequence, a radiolabeled D2 probe was incubated with HEK-293 NE in the presence of unlabeled X-box. Figure 3B shows that X-box was competing for complexes formation (lane 3) as efficiently as D2 itself (lane 2). Additionnaly, complexes with the same mobility as C1 and C2 were obtained using X-box as a probe (lane 5) suggesting that common proteins bind to both motifs.

The presence of RFX proteins in C1 and C2 was assessed using antisera against human RFX1, RFX2, RFX3 or RFXANK. Figure 3C indicates that the RFX1 antiserum supershifted both C1 and C2 complexes. The RFX3 antiserum supershifted the C2 complex but did not affect C1. In contrast, C1 and C2 complexes mobility was not affected by RFX2 or RFXANK antisera. These findings indicate that both complexes contain the RFX1 protein and that the C2 complex contains also RFX3.

***In vitro* synthesized RFX1 and RFX3 bind specifically to the D2 sequence.** To confirm the hypothesis that RFX1 and RFX3 bind to the D2 sequence, we examined the ability of D2 and X-box to bind mono- and homodimer of RFX1 or RFX3 as well as the RFX1/RFX3 heterodimer using *in vitro* translated proteins. Homogeneity of *in vitro* translated protein was verified by parallel transcription/translation reactions in presence of 35S-labeled methionine (Supplementary Fig. S2). As previously reported[28], RFX1 or RFX3, translated alone, generated distinguishable patterns of retarded bands with X-box (Fig. 4A, lane 2 and 3 respectively) corresponding to monomeric (1 or 3) and homodimeric (1/1 or 3/3) forms of RFX1 or RFX3. Cotranslation products generated an additional complex with an intermediate electrophoretic mobility, corresponding to RFX1/RFX3 heterodimers (Fig. 4A, lane 4). When the D2 sequence was used as a probe, only a weak binding activity was observed for monomeric and dimeric RFX3 (Fig. 4B, lane 3). In contrast, complexes were readily formed with RFX1 monomers and homodimers, as well as with RFX1/RFX3 heterodimers (Fig. 4B, lane 2 and 4). These complexes comigrated with the C1 and C2 complexes detected using HEK-293 NE (lane 5). We therefore concluded that the major C1 complex corresponds to an RFX1 homodimer and that the minor complex C2 corresponds to an RFX1/RFX3 heterodimer.

RFX1 downregulation impacts AAV mediated transgene expression. To explore the possible involvement of RFX1 and RFX3 in AAV transduction efficiency, HEK-293 cells transfected with siRNAs against either RFX1, RFX3 (respectively siRFX1, siRFX3) or both (siRFX1/RFX3) as well as control (siCtl) (Fig. 5A) were transduced with an AAV vector encoding the murine secreted alkaline phosphatase (AAV-mSEAP) reporter gene. The transduction efficiency was assessed by quantifying the mSEAP activity in cell supernatants and mSEAP mRNA expression levels. RFX1 mRNA levels were decreased in siRFX1 and siRFX1/RFX3 transfected cells by 64% and 42% respectively and unmodified in siRFX3 transfected cells (Fig. 5A). RFX3 mRNA was specifically

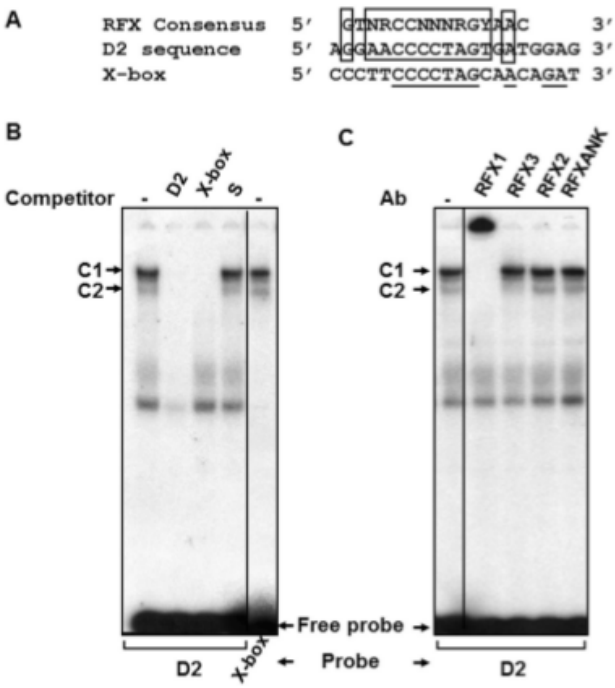


Figure 3. Specific binding of RFX proteins to the D2 sequence in HEK-293 NE. **(A)** Alignment of D2 sequence with the RFX binding consensus sequence and the MHC class II X-box site in the HLA-DRA (X-box). Boxes indicate positions that match the consensus sequence and identities between the X-box and the D2 sequence are underlined. R, Y and N represent a purine, a pyrimidine, and any nucleotide, respectively. **(B)** EMSA was performed with the D2 sequence in absence of competitor DNA (lane 1), in the presence of the unlabeled D2 (lane 2), unlabeled X-box (lane 3) or unlabeled S oligonucleotides (lane 4). X-box was also used as a probe (lane 5). **(C)** C1 and C2 complexes were formed by using the D2 probe and HEK-293 NE in EMSA. Antibodies against human RFX1, RFX2, RFX3 and RFXANK were added to the reaction as described in the text (n = 3 experiments). Black lines delineate the boundary between not contiguous lanes of the same gel.

reduced by 79% and 64% respectively in siRFX3 and siRFX1/RFX3 transfected cells compared to siCtl transfected cells. Of note, in siRFX1 transfected cells, the RFX3 mRNA level was upregulated by 47% compared to siCtl cells, showing that RFX1 could negatively regulate RFX3 transcription. In accordance with the RT-PCR results, western blotting showed that RFX1 and RFX3 proteins levels were reduced respectively in siRFX1 and siRFX3 transfected cells and that RFX3 was upregulated in siRFX1 treated cells. Accordingly, it has previously shown that RFX1 represses the activity of RFX3 promoter as well as its own promoter[36,37]. RFX1 knock down was associated with reduced AAV transgene expression following cell transduction. Compared to control, mSEAP mRNA levels and mSEAP activity were decreased by 54% and 38% respectively indicating that RFX1 plays a role in AAV mediated transgene expression (Fig. 5B). In siRFX3 transfected cells, no statistical difference of mSEAP expression levels was observed between siRFX3 and siCtl transfected cells (Fig. 5B) suggesting that, unlike RFX1, RFX3 does not affect AAV transgene expression. Thus, the AAV expression defect observed in siRFX1/RFX3 transfected cells seems to be exclusively due to RFX1 downregulation.

A single mutation in D2 sequence influences AAV transduction efficiency. To evaluate whether the C to T substitution in the D2 sequence affects viral transduction, a pseudotyped AAV1/2 vector carrying the mutated D2 sequence and encoding the mSEAP (mutAAV-mSEAP) was produced and titered side by side with the unmodified vector (AAV-mSEAP). mutAAV and AAV showed equal titers indicating that the mutation did not affect vector production (Supplementary Fig. S3). Moreover, AAV genomes analyzed by denaturating agarose gel electrophoresis showed that the single-stranded full-length DNAs of either mutAAV-mSEAP or AAV-mSEAP are equally packaged in particles (Supplementary S3). HEK-293 T cells were transduced and analysed for transgene expression by quantifying mSEAP activity in cell supernatants. Consistent with our siRNA experiments, our results showed a slight but significant decrease of mSEAP transcripts (30%) and activity levels (20%) (Fig. 6A). It is noteworthy that mutAAV-mSEAP expression was not affected by the knock down of RFX1

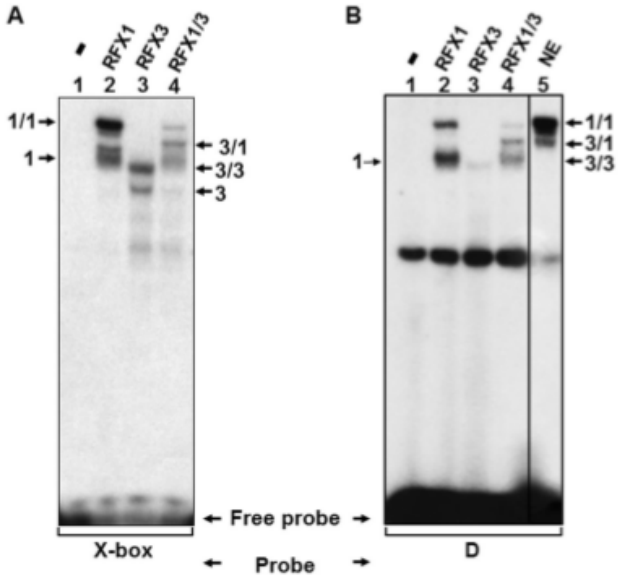


Figure 4. Binding of *in vitro* synthesized RFX1 and RFX3 to the D2 sequence. (**A**) Binding reaction was preformed with a X-box oligonucleotide in the presence of human RFX1 (lane 2) or RFX3 (lane 3) individually synthesized *in vitro* or the presence of cosynthesized RFX1 and RFX3 (lane 4). A control translation product (pSG5 vector alone) was incubated with the X-box probe (lane1). Complexes formed by RFX1 or RFX3 monomers (1 or 3), RFX1 or RFX3 homodimers (1/1 or 3/3) or RFX1/RFX3 heterodimers (3/1) are indicated. (**B**) Same experiment as for panel A with the D2 oligonucleotide. For comparison C1 and C2 complexes formed with HEK-293 NE and the D2 oligonucleotide were loaded in lane 5. The Black line delineate the boundary between not contiguous lanes of the same gel.

and RFX3 (Supplementary Fig. S4). Our results showed that AAV vector containing the single point mutation in the D sequence exhibits a slight decreased transduction efficiency.

Efficient pull down of AAV genome from RFX immunoprecipitations. To confirm the binding of RFX protein to D2 sequence in the viral context, we examined the ability of RFX proteins to bind the AAV vector genome in pull down experiments. HEK-293 cells were mock-transduced or transduced with either AAV or mutAAV vectors. Whole cell extracts were prepared and the presence of either RFX proteins or AAV genomes were analyzed respectively by western blotting (WB) and by PCR on the pulled down material from same anti-RFX1 and -RFX3 immunoprecipitations samples. As expected, WB showed that RFX1 and RFX3 proteins were readily detected in mock, AAV and mutAAV transduced cells (Fig. 6B, lanes 1–6). PCR analysis on the pulled down material from anti-RFX proteins shown in Fig. 6B indicated that the AAV viral DNA was associated with RFX1 and RFX3 (lanes 2 and 5) while AAVmut genome was not (lanes 3 and 6). Immunoprecipitations with an Early Endosome Antigen 1 antibody (anti-EEA1) which does not precipitate RFX proteins (Fig. 6B lane 7, 8 and 9 and Fig. S5) as well as with protein A beads alone (Fig. S5, negative PCR not shown) were included as a negative PCR control. The pAAV plasmid was used as positive control (lane 10). Altogether, our data indicate that D2 sequence obviously binds RFX proteins in AAV vector context.

Discussion

There is increasing evidence that, among cellular proteins, transcription factors might be involved in AAV transduction efficiency by interacting with AAV genomes[19,21,38,39]. In this study, we have investigated the nature of the nuclear proteins able to bind the ds D sequence of AAV2 (D2) using HEK-293 nuclear extracts in EMSA. We show, for the first time, that a major C1 complex corresponding to an RFX1 homodimer and a minor one C2, corresponding to an RFX1/RFX3 heterodimer, physically bind D2. These two complexes were also detected in nuclear extracts from HeLa and SUP-T1 cells (Supplementary Fig. S1) consistent with the previous observation that whole cell extracts from HeLa cells contain unidentified protein(s) which bind specifically to D2[40]. We demonstrated that the binding of RFX1 homodimer and RFX1/RFX3 heterodimer to D2 requires a C nucleotide at position 8 which is conserved in D sequences of AAV1 (D1), AAV6, AAV7 and AAV8 but, different in other serotypes as AAV3 (D3), AAV4 (D4) and AAV5 (D5)[41]. Indeed, D1, but not D3, D4 nor D5, have formed RFX complexes in our EMSA experiments. These results suggest a role of RFX proteins in the wild-type AAV life

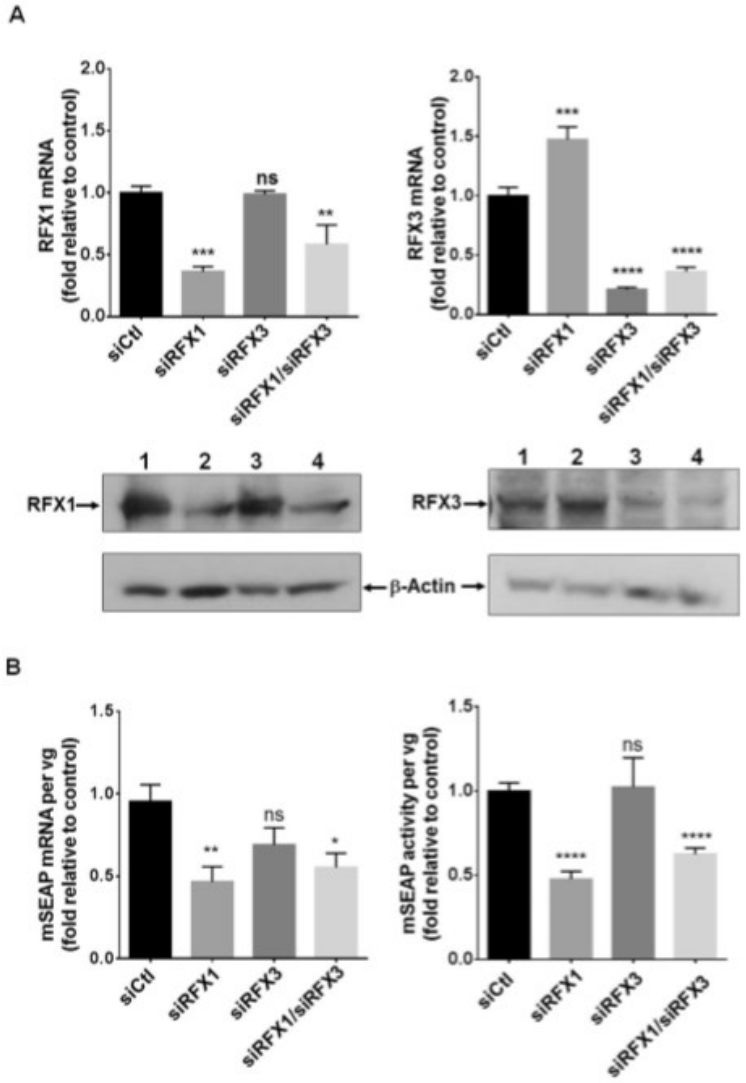


Figure 5. siRNA-mediated knockdown of RFX proteins impacts AAV mediated transgene expression in HEK-293 cells. **(A)** Real time RT-PCR and western bloting analysis of RFX expression showing the efficacy of RFX siRNA silencing in HEK-293 cells transfected with control (lane1) siRNA (siCtl), siRNAs against either (lane2) RFX1, (lane 3) RFX3 or (lane4) both (respectively siRFX1, siRFX3, siRFX1/RFX3) (n = 3 independent experiments). **(B)** siRNA-mediated knockdown of RFX proteins impacts AAV transduction in HEK-293 cells. siRFX1, siRFX3 and siRFX1/RFX3 transfected cells were transduced with an AAV encoding the murine secreted alkaline phosphatase reporter gene (AAV-mSEAP) 24 h post-transfection (n = 4 independent experiments). The AAV-mSEAP transduction efficiency was assessed in each condition by quantifying the mSEAP activity in cell supernatants and cellular mSEAP mRNA expression levels 24 h post-transduction. mSEAP activity and transcripts levels were normalized by the AAV vg copy number. The data are represented as the mean ± SEM of at least three independent experiments. Data that were statistically different from siCtl are marked $*p < 0.05$; $**p < 0.01$, $***p < 0.001$, $****p < 0.0001$. ns, non-significant.

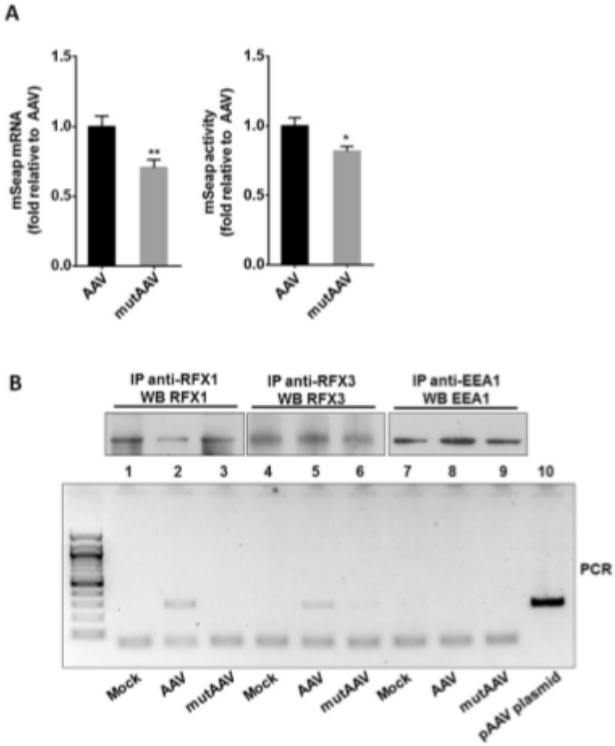


Figure 6. Mutation in D2 sequence impacts AAV transduction efficiency and RFX proteins binding. **(A)** Transduction efficiency of an AAV vector carrying the mutated D sequence (mutAAV-mSEAP) and the unmodified vector (AAV-mSEAP) in HEK-293 cells. Transduction was assessed 24 h post-transduction in each condition, by quantifying the mSEAP activity in cell supernatants and cellular mSEAP mRNA expression levels that were normalized by the AAV vg copy number. The data are represented as the mean ± SEM of three independent experiments using three different batches of AAV-mSEAP and mutAAV-mSEAP (*$p < 0.05$; **$p < 0.01$). **(B)** Detection of AAV DNA in RFX1 and RFX3 immunoprecipitates. HEK-293 cells were mock transduced (Mock) or transduced with either AAV or mutAAV and analysed 24 h post-transduction. RFX1 and RFX3 immunoprecipitation from cell extracts were analysed by western blotting with anti-RFX1 and anti-RFX3 antibodies (Rabbit IgG). As expected RFX proteins were present in immunoprecipitates of mock transduced or transduced cells with either AAV or mutAAV vectors (lanes 1–6). AAV DNA was detected using PCR on the pulled down material. Negative PCR controls included immunoprecipitations with an anti-EEA1 antibody (rabbit IgG) which does not precipitates RFX proteins (lane 7, 8 and 9) as well as with Protein A beads alone (not shown). The pAAV plasmid was used as positive control (lane 10).

cycle and illustrate the fact that different AAV serotypes may have adapted to different cellular environment not only by selecting different receptors but also by recruiting different cellular factors for the processing of their genome[1,7,20,21,42].

We observed that AAV-mSEAP transgene expression was decreased in siRFX1 and siRFX1/RFX3 treated HEK-293 cells suggesting a role of RFX1 and RFX1/RFX3 complexes in CMV-driven transgene expression. Indeed, RFX1 and RFX3 both contain a repression and an activation domains which overlap with a dimerization domain and directly regulate transcription upon binding to inverted repeat (called EP or EF-C or MDBP sites) present in the enhancers of several viruses, including hepatitis B virus (HBV) and polyomavirus (Py)[23,28,33,43]. Interestingly, C1 and C2 complexes formed respectively by RFX1 homodimers and RFX1/RFX3 heterodimers are similar to the ones found with the EF-C site in accordance with the role of these proteins in activation of AAV transcription through the D sequence. Indeed, we observed that siRFX1 led to a significant decrease of AAV transgene expression in transduced HEK-293 cells and has no effect on AAV carrying the D2 mutation (mutAAV) (Supplementary Fig. S4) which abolished C1 and C2 formation in EMSA. As previously described[36], in siRFX1 treated cells, RFX1 knock down increased the RFX3 expression level suggesting a potential regulation of AAV transgene expression by RFX3. Since, no effect was observed in siRFX3 treated cells, RFX1 seems to be

the only protein involved in AAV transgene expression. We have demonstrated the binding capacity of RFX proteins to D2 sequence in the context of infectious vector particles. We further showed that RFX1 contained in HEK-293 nuclear extracts and *in vitro* translated RFX proteins displayed identical binding patterns on the D2 and X-box probes in EMSA, suggesting that RFX1 regulates AAV transduction through its binding to D2. It is note worthy that such a binding could be direct or indirect in a physiological context. RFX1 may regulate the promoter activity of the ITR itself[4,5] or of downstream promoters. For exemple, a zinc finger protein ZF5 that binds the ITR was shown to repress transcription of the AAV p5 promoter[38,39]. More recently, the CREB and NRF transcription factors have been reported to regulate AAV transgene expression through binding to the ITR[20,21,39]. When bound to D2, RFX1 may act alone or in association with these other factors to activate transcription. A similar situation has been described with RFX5 that binds the X-box cooperatively with CREB within the MHC class II gene promoter[44,45]. However, no specific complexes other than RFX1 homodimers and RFX1/RFX3 heterodimers could be identified in the present study. As suggested for CREB[21], concatemerization and or circularization of the AAV genome could promote the cooperation of RFX1 with other proteins by bringing the distal protein binding sites closer to the D sequence and the promoter region. Alternatively, RFX complexes could compete with other transcription regulators for a common or an overlaping binding site within the D sequence. In this respect, the D sequence was shown to share a NRE-like site[19] that was previously described as an EP-homologous element regulating the HBV promoter[46]. These hypotheses are supported by our data showing a slight decrease (20%) of transgene expression from mutAAV-mSEAP compared to AAV-mSEAP transduced cells. Indeed, in a physiological context, such a difference in mutAAV may indirectly modify the activity or the binding of other regulator factors on sites surrounding or overlapping D2, leading to a partial compensation of the RFX1 activity on mutAAV transgene expression. In addition, and as suggested for RFX/CREB complex in the context of MHCII promoter, transcription factors binding the ITR may protect AAV promoters against DNA methylation[47,48].

It will be interesting to determine whether the interaction of RFX1 and RFX3 with the ITR occurs before or after the onset of DNA replication. It is conceivable that the RFX factors bind the D sequence on the incoming genomes, prior to replication. Following particle entry and trafficking through the endosomal pathway, AAV genomes are released from the capsid before they enter the nucleus[42]. These unreplicated ssDNA genomes can adopt two isomeric forms: one with each ITR folded in a T-shaped structure and single-stranded D sequences and the other in which the ITRs, including D, pair into double-stranded DNA. This later structure, called the panhandle, may be recognized by the RFX proteins, stabilized[49], and may also be more efficiently imported into the nucleus. In this respect, it is worth noting that RFX1 translocates into the nucleus in response to protein kinase C activation[50]. Otherwise, binding of RFX proteins to the D sequence may change DNA conformation and modulate the binding of caretaker proteins and their associated factors[51] or may directly influence their activity. Indeed, RFX proteins can induce modifications of their partners in multiprotein complexes, as illustrated by the modulation of the auto-phosphorylation capacity of the c-Abl kinase after interaction with RFX1[52].

Our findings points at RFX1 and RFX3 as ITR-binding cellular factors with a potential influence on the efficacy of AAV-mediated gene transfer. Further studies establishing how these transcription factors regulate transgene expression or genome processing, may guide the design of optimized and better controlled AAV vectors.

Materials and Methods

Cells Cultures. HEK-293 cells (ATCC) were maintained at 37 °C and 5% CO2 in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco, Life Technologies) that was supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin.

***In vitro* transcription and translation.** Human RFX1 and RFX3 cDNA subcloned respectively into EcoRI and EcoRI-BamHI sites of pSG5 vector (Agilent Technologies) were transcribed and translated *in vitro* using a T7 TNT coupled reticulocyte lysate system (Promega) and used in EMSA with radiolabeled D2 or X-box oligonucleotides.

Oligonucleotides. Oligonucleotides used in EMSA representing the D sequences of AAV serotypes 1 to 5 (Fig. 2B) or the DRA-X box (X-box) of HLA class II genes (Fig. 3A) or the S sequence (5′-CCAATATTAGATCTGATATCA-3′) were generated by annealing complementary strands and labeling 5′ ends with the polynucleotide kinase and γ-^{32}P ATP. Single stranded sequences of D2, d(−) (5′-AGGAACCCCTAGTGATGGAG-3′) and d(+) (5′-CTCCATCACTAGGGGTTCCT-3′), or of S sequences (s) was also used in EMSA as probes or as competitors in experiments whose results are shown in Fig. 1.

Nuclear extracts and EMSA. Nuclear extracts (NE) were prepared from these HEK-293 cells as previously described[53]. NE or *in vitro* translated products were incubated with 0.2 to 0.5 ng (40,000 cpm) of (γ-^{32}P) ATP-labelled oligonucleotides and 2 µg of poly(dI-dC) in 20 µl of 20 mM Hepes (pH 7.9), 60 mM KCl and 4% Ficoll. The binding reaction was carried out for 30 min at 20 °C and then analysed by electrophoresis on 4% polyacrylamide gels (40:2 acrylamide/bisacrylamide) in 0.25 X Tris-Borate-EDTA buffer. For competition experiments, HEK-293 NE were incubated with the D2 or X-box probe in presence of an excess of unlabeled ds or ss oligonuleotides. In supershift experiments binding reactions mixtures were further incubated on ice for 20 mn with the appropriate antiserum before electrophoresis.

siRNA transfection. HEK-293 cells were seeded at 60,000 per well in 24 well plates. Specific knockdown of RFX1 and RFX3 transcription factors was obtained by a simple or double transfection of siRNA (siRFX1 and siRFX3) (Ambion Silencer Select siRNA, Life technologies) at a final concentration of 6 pmol, using Lipofectamine RNAiMAX (Life technologies) according to the manufacturer's protocol for adherent cells. In these experiment, Silencer Select Negative Control (Ambion) was used as a control (siCtl).

AAV transduction and alkaline phosphatase activity quantification. For viral transduction of siRNA treated cells, 24 h after siRNA transfection HEK-293 cells were transduced with AAV1-mSEAP at a multiplicity of infection (MOI) of 5,000 viral genomes per cell. The medium was replaced by fresh medium after 16 hours of AAV incubation. Twenty four hours later, cell supernatants were collected for Alkaline phosphatase activity measurements and cells were harvested for quantifications of mSEAP mRNA and vector genome contents.

Quantification of alkaline phosphatase activity was performed with the Phospha-Light SEAP Reporter Gene Assay System (ThermoFisher) according to manufacturer instructions. Chemiluminescence was measured in microplates in a luminometer (FlexStation 3). Raw data were analyzed through simple spreadsheet and quantified by using standard curve previously prepared by serially diluting stock enzyme.

Constructs and AAV production. The pAAV-mSEAP construct was mutated in both D sequences (mutpAAV-mSEAP). Briefly, blunt amplicons were obtained by PCR using Phusion polymerase (Thermo Scientific) with the 5′-phosphorylated mutAAV primer ccaactccatcactagAggttccttgtag (with A introducing the T mutation in the D sequence) matching on both D sequences of pAAV-mSEAP plasmid, and cloned in pAAV in MscI restriction sites.

AAV2/1 pseudotyped vectors were prepared by transfection in HEK-293 cells as described previously[54] using the pAAV-mSEAP or the mutpAAV-mSEAP plasmids with the pXX6 plasmid coding for the Ad helper genes essential for AAV production and the pRepCap plasmid (p0001) coding for AAV1 capsid. Vector particles were purified on iodixanol gradient and concentrated on Amicon Ultra-15 100 K columns (Merck-Millipore). The particle titer corresponding to the number of viral genomes per milliliter (vg/ml) was determined by quantitative real-time PCR on a StepOnePlus (Applied Biosystems), by using the following primers and probe: CTCCATCACTAGGGGTTCCTTG (forward), GTAGATAAGTAGCATGGC (reverse) and TAGTTAATGATTAACCC (Taqman MGB probe, Life Technologies). The pAAV plasmid was used as a control to establish the standard curve for absolute quantification.

Transcripts and vector genome quantification. Real-time PCRs were performed on a StepOnePlus (Applied Biosystems) using the Power SYBER Green PCR Master mix (Life Technologies) for mSEAP quantification and the ABsolute Qpcr Rox Mix (Life technologies) for vector genome and RFX transcript quantifications.

For vector genome quantification, genomic DNA was extracted from HEK-293 cells using the Puregene Blood kit (Qiagen). Copy number of AAV genomes were measured on 100 ng of genomic DNA using primers described in the previous section. Vector genomes were quantified by using a standard curve prepared by serially diluting the pAAV plasmid.

For transcript quantifications, total RNA was isolated from HEK-293 cells with NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel), and reverse transcription was performed on 200 ng of RNA by using the Superscript™ II and random primers (Life Technologies). RFX1 and RFX3 transcripts were quantified and normalized to beta-2-microglobulin levels using the following TaqMan Gene Expression Assays (Life Technologies): RFX1 (ID: Hs00172561_m1), RFX3 (ID: Hs00231292_m1) and beta-2-microglobulin (ID: Hs00984230_m1).

mSEAP transcripts were quantified and normalized to the ribosomal phosphoprotein (PO) using the Power SYBER Green PCR Master mix (Life Technologies) and the following primers: mSEAP (forward: 5′CCCTACACTGACTGCGGC3′ and reverse: 5′ATCTGCAGAATTCGCCCTTTC3′) and PO (forward: 5′GGCGACCTGGAAGTCCAACT3′ and reverse: 5′CCATCAGCACCACAGCCTTC3′).

Imunoprecipitation and PCR on pull-down material. For immunoprecipitations, 2.5 µg of RFX1 or RFX3 antibodies (Novus) were incubated 2 hours with 20 µl of Protein A-coated beads in 100 µl of Ripae buffer and washed three times to remove antibodies excess. 500 µg of cell lysates were incubated 2 hours with 20 µl of Protein A-coated beads pre-bound to the antibodies and the eluted material was analysed by western blotting using the appropriate antibody. For PCR on pull-down experiments, 1/10 of beads of the the RFX1 or RFX3 immunoprecipitations were diluted in 10 µl of Tris/EDTA buffer and subjected to a PCR using the forward GAGTGGCCAACTCCATCAC and reverse 5′GTTATGTAACGCGGAACTCC3′ oligonucleotides to amplify AAV DNA. The pAAV plasmid was used as a positive control.

Statistics. Statistical analysis was performed with Graph Pad Prism software (San Diego, CA). Results are expressed as means ± SEM. The significance of the difference between mean values was evaluated using one-way variance analysis (ANOVA) with a post hoc Bonferroni test in all experiments except that differences of mSEAP mRNA expression levels and activity in transduced cells with AAV and mutAAV were analysed using the unpaired Student's t-test (two tailed) with a p threshold of 0.05.

References

1. Sanlioglu, S., Monick, M. M., Luleci, G., Hunninghake, G. W. & Engelhardt, J. F. Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther* **1**, 137–147 (2001).
2. Weitzman, M. D., Carson, C. T., Schwartz, R. A. & Lilley, C. E. Interactions of viruses with the cellular DNA repair machinery. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1165–1173, https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.018 (2004).
3. Davidoff, A. M., Ng, C. Y., Zhou, J., Spence, Y. & Nathwani, A. C. Sex significantly influences transduction of murine liver by recombinant adeno-associated viral vectors through an androgen-dependent pathway. *Blood* **102**, 480–488, https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2889 (2003).
4. Haberman, R. P., McCown, T. J. & Samulski, R. J. Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. *J Virol* **74**, 8732–8739 (2000).
5. Flotte, T. R. *et al.* Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. *J Biol Chem* **268**, 3781–3790 (1993).

6. Ellis, B. L. *et al.* A survey of *ex vivo/in vitro* transduction efficiency of mammalian primary cells and cell lines with Nine natural adeno-associated virus (AAV1-9) and one engineered adeno-associated virus serotype. *Virol J* **10**, 74, https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-74 (2013).
7. Srivastava, A. *In vivo* tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. *Curr Opin Virol* **21**, 75–80, https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.08.003 (2016).
8. Balakrishnan, B. & Jayandharan, G. R. Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. *Curr Gene Ther* **14**, 86–100 (2014).
9. Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T. & Samulski, R. J. Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* **70**, 3227–3234 (1996).
10. Zentilin, L., Marcello, A. & Giacca, M. Involvement of cellular double-stranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome. *J Virol* **75**, 12279–12287, https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12279-12287.2001 (2001).
11. Inagaki, K., Ma, C., Storm, T. A., Kay, M. A. & Nakai, H. The role of DNA-PKcs and artemis in opening viral DNA hairpin termini in various tissues in mice. *J Virol* **81**, 11304–11321, https://doi.org/10.1128/JVI.01225-07 (2007).
12. Choi, V. W., McCarty, D. M. & Samulski, R. J. Host cell DNA repair pathways in adeno-associated viral genome processing. *J Virol* **80**, 10346–10356, https://doi.org/10.1128/JVI.00841-06 (2006).
13. Duan, D., Yue, Y. & Engelhardt, J. F. Consequences of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit deficiency on recombinant adeno-associated virus genome circularization and heterodimerization in muscle tissue. *J Virol* **77**, 4751–4759 (2003).
14. Song, S., Laipis, P. J., Berns, K. I. & Flotte, T. R. Effect of DNA-dependent protein kinase on the molecular fate of the rAAV2 genome in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4084–4088, https://doi.org/10.1073/pnas.061014598 (2001).
15. Cataldi, M. P. & McCarty, D. M. Differential effects of DNA double-strand break repair pathways on single-strand and self-complementary adeno-associated virus vector genomes. *J Virol* **84**, 8673–8682, https://doi.org/10.1128/JVI.00641-10 (2010).
16. Qing, K. *et al.* Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular FKBP52 protein in transgene expression. *J Virol* **75**, 8968–8976, https://doi.org/10.1128/JVI.75.19.8968-8976.2001 (2001).
17. Qing, K. *et al.* Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines *in vitro* and transgenic mice *in vivo*. *J Virol* **77**, 2741–2746 (2003).
18. Jayandharan, G. R. *et al.* Optimized adeno-associated virus (AAV)-protein phosphatase-5 helper viruses for efficient liver transduction by single-stranded AAV vectors: therapeutic expression of factor IX at reduced vector doses. *Hum Gene Ther* **21**, 271–283, https://doi.org/10.1089/hum.2009.100 (2010).
19. Ling, C. *et al.* Enhanced transgene expression from recombinant single-stranded D-sequence-substituted adeno-associated virus vectors in human cell lines *in vitro* and in murine hepatocytes *in vivo*. *J Virol* **89**, 952–961, https://doi.org/10.1128/JVI.02581-14 (2015).
20. Jayandharan, G. R. *et al.* Activation of the NF-kappaB pathway by adeno-associated virus (AAV) vectors and its implications in immune response and gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 3743–3748, https://doi.org/10.1073/pnas.1012753108 (2011).
21. Dean, J., Plante, J., Huggins, G. S., Snyder, R. O. & Atikawa, R. Role of cyclic AMP-dependent kinase response element-binding protein in recombinant adeno-associated virus-mediated transduction of heart muscle cells. *Hum Gene Ther* **20**, 1005–1012, https://doi.org/10.1089/hum.2009.054 (2009).
22. Gajiwala, K. S. *et al.* Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* **403**, 916–921, https://doi.org/10.1038/35002634 (2000).
23. Emery, P. *et al.* A consensus motif in the RFX DNA binding domain and binding domain mutants with altered specificity. *Mol Cell Biol* **16**, 4486–4494 (1996).
24. Morotomi-Yano, K. *et al.* Human regulatory factor X 4 (RFX4) is a testis-specific dimeric DNA-binding protein that cooperates with other human RFX members. *J Biol Chem* **277**, 836–842, https://doi.org/10.1074/jbc.M108638200 (2002).
25. Choksi, S. P., Lauter, G., Swoboda, P. & Roy, S. Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development* **141**, 1427–1441, https://doi.org/10.1242/dev.074666 (2014).
26. Iwama, A. *et al.* Dimeric RFX proteins contribute to the activity and lineage specificity of the interleukin-5 receptor alpha promoter through activation and repression domains. *Mol Cell Biol* **19**, 3940–3950 (1999).
27. Nakayama, A. *et al.* Role for RFX transcription factors in non-neuronal cell-specific inactivation of the microtubule-associated protein MAP1A promoter. *J Biol Chem* **278**, 233–240, https://doi.org/10.1074/jbc.M209574200 (2003).
28. Reith, W. *et al.* RFX1, a transactivator of hepatitis B virus enhancer I, belongs to a novel family of homodimeric and heterodimeric DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* **14**, 1230–1244 (1994).
29. Siegrist, C. A. & Mach, B. Antisense oligonucleotides specific for regulatory factor RFX-1 inhibit inducible but not constitutive expression of all major histocompatibility complex class II genes. *Eur J Immunol* **23**, 2903–2908, https://doi.org/10.1002/eji.1830231126 (1993).
30. Reinhold, W. *et al.* The myc intron-binding polypeptide associates with RFX1 *in vivo* and binds to the major histocompatibility complex class II promoter region, to the hepatitis B virus enhancer, and to regulatory regions of several distinct viral genes. *Mol Cell Biol* **15**, 3041–3048 (1995).
31. Sáfrány, G. & Perry, R. P. Transcription factor RFX1 helps control the promoter of the mouse ribosomal protein-encoding gene rpL30 by binding to its alpha element. *Gene* **132**, 279–283 (1993).
32. Liu, M., Lee, B. H. & Mathews, M. B. Involvement of RFX1 protein in the regulation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter. *J Biol Chem* **274**, 15433–15439 (1999).
33. David, E., Garcia, A. D. & Hearing, P. Interaction of EF-C/RFX-1 with the inverted repeat of viral enhancer regions is required for transactivation. *J Biol Chem* **270**, 8353–8360 (1995).
34. Kobr, M., Reith, W., Herrero-Sanchez, C. & Mach, B. Two DNA-binding proteins discriminate between the promoters of different members of the major histocompatibility complex class II multigene family. *Mol Cell Biol* **10**, 965–971 (1990).
35. Masternak, K., Muhlethaler-Mottet, A., Villard, J., Peretti, M. & Reith, W. Molecular genetics of the Bare lymphocyte syndrome. *Rev Immunogenet* **2**, 267–282 (2000).
36. Tammimies, K. *et al.* Ciliary dyslexia candidate genes DYX1C1 and DCDC2 are regulated by Regulatory Factor X (RFX) transcription factors through X-box promoter motifs. *FASEB J* **30**, 3578–3587, https://doi.org/10.1096/fj.201500124RR (2016).
37. Lubelsky, Y., Reuven, N. & Shaul, Y. Autorepression of rfx1 gene expression: functional conservation from yeast to humans in response to DNA replication arrest. *Mol Cell Biol* **25**, 10665–10673, https://doi.org/10.1128/MCB.25.23.10665-10673.2005 (2005).
38. Cathomen, T., Stracker, T. H., Gilbert, L. B. & Weitzman, M. D. A genetic screen identifies a cellular regulator of adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 14991–14996, https://doi.org/10.1073/pnas.261567198 (2001).
39. Yan, Z. *et al.* Optimization of Recombinant Adeno-Associated Virus-Mediated Expression for Large Transgenes, Using a Synthetic Promoter and Tandem Array Enhancers. *Hum Gene Ther* **26**, 334–346, https://doi.org/10.1089/hum.2015.001 (2015).
40. Wang, X. S., Ponnazhagan, S. & Srivastava, A. Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J Virol* **70**, 1668–1677 (1996).
41. Gao, G. P. *et al.* Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 11854–11859, https://doi.org/10.1073/pnas.182412299 (2002).
42. Nonnenmacher, M. & Weber, T. Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* **19**, 649–658, https://doi.org/10.1038/gt.2012.6 (2012).

43. Siegrist, C. A. *et al.* RFX1 is identical to enhancer factor C and functions as a transactivator of the hepatitis B virus enhancer. *Mol Cell Biol* **13**, 6375–6384 (1993).
44. Moreno, C. S., Beresford, G. W., Louis-Plence, P., Morris, A. C. & Boss, J. M. CREB regulates MHC class II expression in a CIITA-dependent manner. *Immunity* **10**, 143–151 (1999).
45. Zhu, X. S. *et al.* Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF-Y, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol Cell Biol* **20**, 6051–6061 (2000).
46. Buckwold, V. E., Chen, M. & Ou, J. H. Interaction of transcription factors RFX1 and MIBP1 with the gamma motif of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter. *Virology* **227**, 515–518, https://doi.org/10.1006/viro.1996.8360 (1997).
47. Seguin-Estévez, Q. *et al.* The transcription factor RFX protects MHC class II genes against epigenetic silencing by DNA methylation. *J Immunol* **183**, 2545–2553, https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900376 (2009).
48. Léger, A. *et al.* Adeno-associated viral vector-mediated transgene expression is independent of DNA methylation in primate liver and skeletal muscle. *PLoS One* **6**, e20881, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020881 (2011).
49. Cornille, F. *et al.* DNA binding properties of a chemically synthesized DNA binding domain of hRFX1. *Nucleic Acids Res* **26**, 2143–2149 (1998).
50. Agami, R. & Shaul, Y. The kinase activity of c-Abl but not v-Abl is potentiated by direct interaction with RFXI, a protein that binds the enhancers of several viruses and cell-cycle regulated genes. *Oncogene* **16**, 1779–1788, https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201708 (1998).
51. Smeenk, G. & Mailand, N. Writers, Readers, and Erasers of Histone Ubiquitylation in DNA Double-Strand Break Repair. *Front Genet* **7**, 122, https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00122 (2016).
52. Chen, L. *et al.* Activation of protein kinase C induces nuclear translocation of RFX1 and down-regulates c-myc via an intron 1 X box in undifferentiated leukemia HL-60 cells. *J Biol Chem* **275**, 32227–32233, https://doi.org/10.1074/jbc.M002645200 (2000).
53. Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**, 1475–1489 (1983).
54. Grieger, J. C., Choi, V. W. & Samulski, R. J. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protoc* **1**, 1412–1428, https://doi.org/10.1038/nprot.2006.207 (2006).

Acknowledgements

We thank Professor Walter Reith (University of Geneva Medical School, CH-1211 Geneva, Switzerland) for the generous gift of RFX antibodies. We thank the Penn Vector Core, Gene Therapy Program (University of Pennsylvania, Philadelphia, US) for providing the pAAV-1 plasmid (p0001) and the vectorology platform of the Centre of Research in Myology-UMRS974 (Paris, France) for AAV production. This work was supported by the Association Française contre les Myopathies, the Université Pierre et Marie Curie (UPMC), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and the Association Institut de Myologie (AIM).

Author Contributions

S.B.Z. and O.D. conceived the project. S.B.Z. designed the experiments and supervised the study. O.D., S.L. and F.P.R. helped supervise the study. L.J., J.C. and C.P. performed experiments. L.J., J.C. and S.B.Z. analysed the data. S.B.Z. and O.D. wrote the manuscript with input from S.L. and F.P.R. L.J., J.C., C.P., S.L., F.P.R., O.D. and S.B.Z. read and approved the final version of the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at https://doi.org/10.1038/s41598-017-18604-3.

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

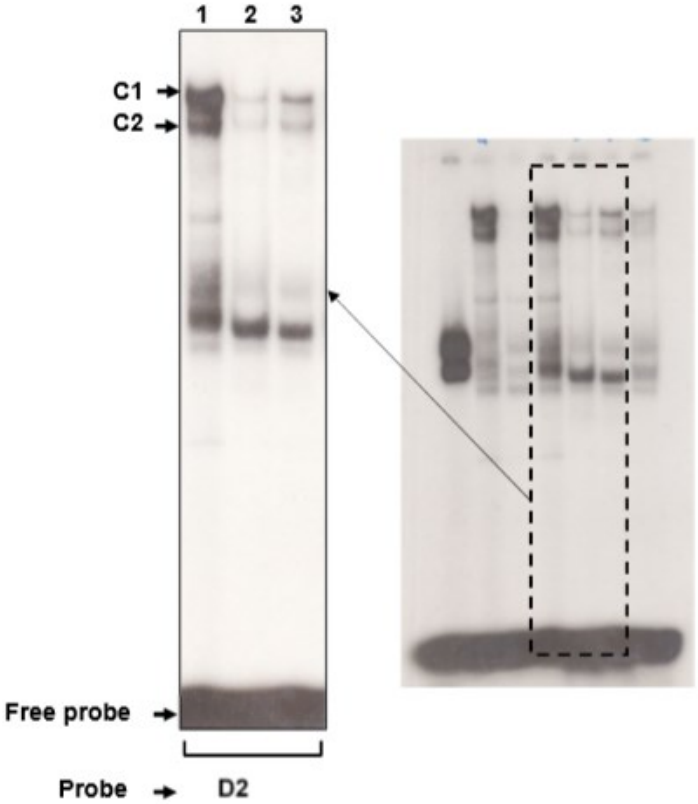
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

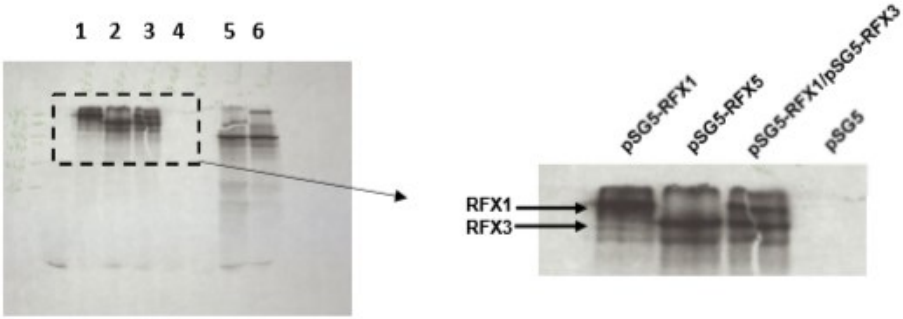
Supplementary Information

RFX1 and RFX3 Transcription Factors Interact with the D sequence of Adeno-Associated Virus Inverted Terminal Repeat and Regulate AAV Transduction

Laura Julien*[1], Julie Chassagne*[1], Cécile Peccate[1], Stéphanie Lorain[1], France Piétri-Rouxel[1], Olivier Danos[2] and Sofia Benkhelifa-Ziyyat#[1]



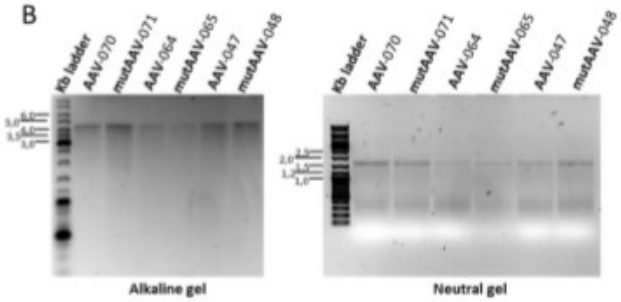
Supplementary figure S1: C1 and C2 complexes were also detected in nuclear extracts from HeLa and SUP-T1 cells. Lane 1: HEK-293, Lane 2: Supt1, Lane 3 : HeLa



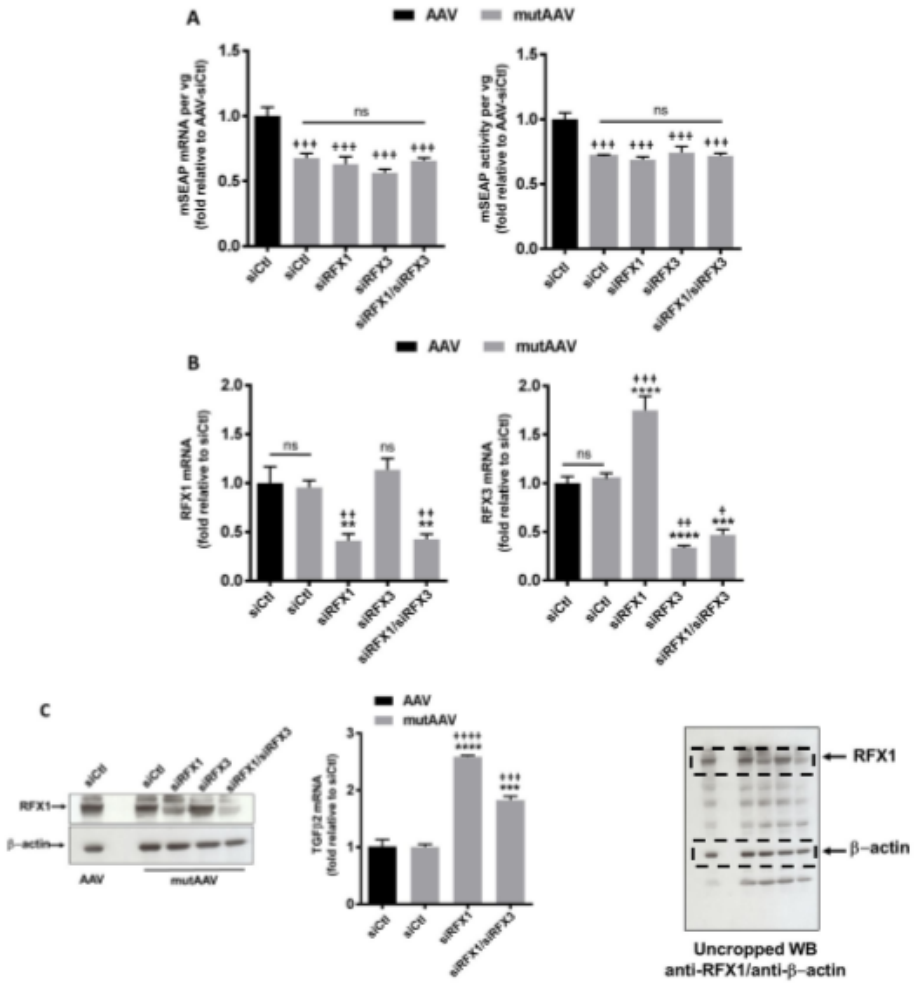
Supplementary figure S2: Human RFX1 and RFX3 cDNA subcloned in pSG5 vector were transcribed and translated in presence of 35S-methionine by T7 TNT coupled reticulocyte lysate system according to the manufacturer's protocol (Promega). Reaction products were resolved by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis followed by exposure to a radiographic film. Lane 1: pSG5-RFX1, lane 2: pSG5-RFX3, lane 3: pSG5-RFX1 and pSG5-RFX3, lane 4: pSG5, lanes 5 and 6 pSG5-*Renilla* luciferase.

A

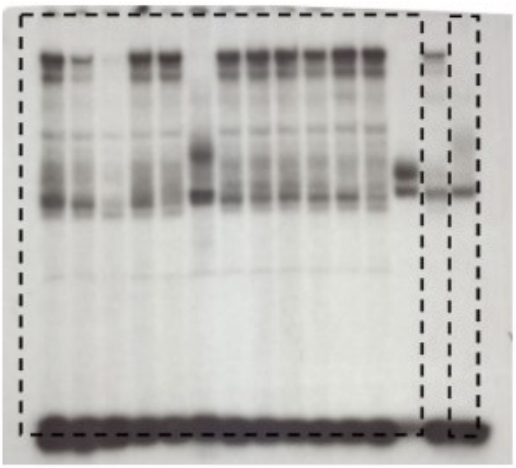
Batches	AAV-070	mutAAV-071	AAV-064	mutAAV-065	AAV-047	mutAAV-048
Titers vg/ml	3,20E+12	2,90E+12	1,10E+12	9,70E+11	1,30E+12	1,70E+12
	Production 1		Production 2		Production 3	



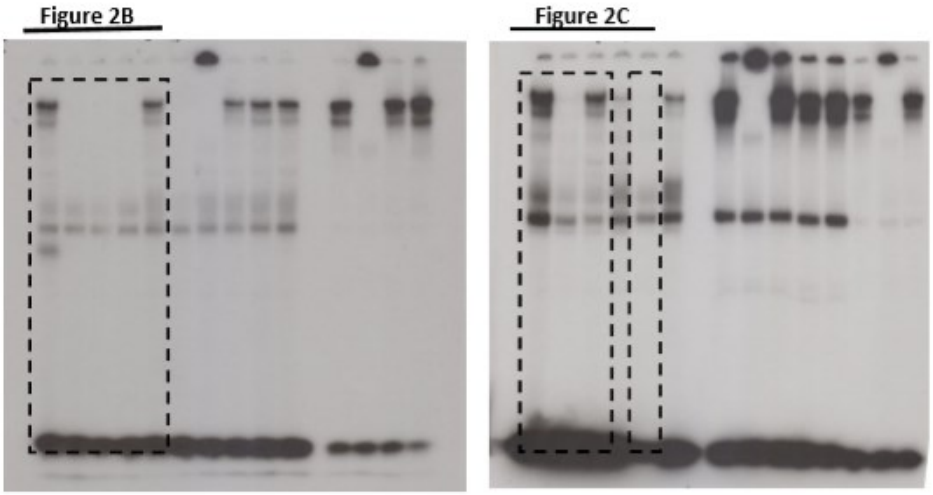
Supplementary figure S3: (A) **D2 mutation did not affect vector titers**. AAV-muSEAP (AAV-070, AAV-064 and AAV-047) and mutAAVmSEAP (mutAAV-071, mutAAV-065 and mutAAV-048) were produced and titered side by side (n=3: production 1, production 2 and production 3) as described in materials and methods section. (**B) Full length DNAs of mutAAV-mSEAP and AAV-mSEAP are equally packaged in particles.** The purified vector DNAs from the three different productions of either AAV-mSEAP or mutAAV-mSEAP used in this study were analyzed by alkaline and neutral agarose gel electrophoresis as described previously (Wang *et al.*, gene therapy, 2003). The single stranded AAV DNA of both AAVmSEAP and mutAAVmSEAP migrated in the alkaline agarose gel (denaturing-conditions) as a denatured single-stranded molecule of a 4.2 kilobase (Kb). As expected, in neutral agarose gel (non-denaturing conditions), the single stranded molecules of 4.2 Kb migrate faster next to the 2 kb dsDNA marker (undenatured).



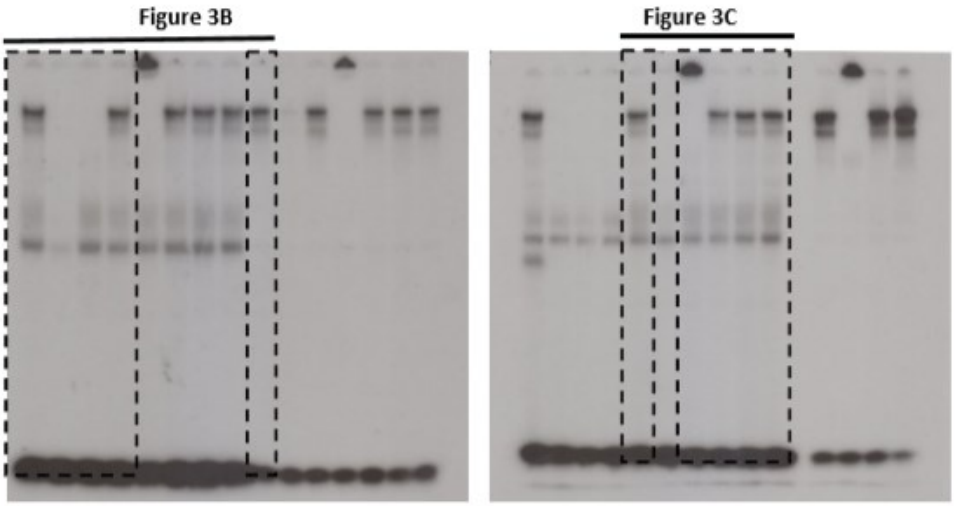
Supplementary figure S4: siRNA-mediated knockdown of RFX proteins did not impact mutAAV mediated transgene expression in HEK-293 cells. (A) Transduction efficiency of mutAAV-mSEAP (gray bars) in siCtl (control), siRFX1, siRFX3 and siRFX1/siRFX3 transfected cells compared to transduction efficiency of AAV-mSEAP in siCtl treated cells (Black bars). The AAV-mSEAP and mutAAV-mSEAP transduction efficiencies was assessed by quantifying the mSEAP mRNA expression level and activity 24h post-transduction. mSEAP activity and transcripts levels were normalized by the AAV vg copy number. **(B)** Real time RT-PCR analysis of RFX expression showing the efficacy of RFX siRNA silencing in HEK-293 cells transfected with siCtl, siRFX1, siRFX3 or both (siRFX1/RFX3). **(C)** siRNAs are functional in mutAAV transduced cells. **(Left panel)** RFX1 knock down in mutAAV transduced cells shown by western blotting led to (**Right panel**) the increase of TGFβ2 mRNA level as previously described in siRFX1 treated cells (Feng C and Zuo Z, J Biol Chem, 2012). The data are represented as the mean ± SEM of two independent experiments performed in quadruplicates. Data that were statistically different from mutAAV-siCtl and from AAV-siCtl are marked respectively *p<0.05; **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 and $^{+}$p<0.05; $^{++}$p<0.01, $^{+++}$p<0.001, $^{++++}$p<0.0001. ns, non-significant.



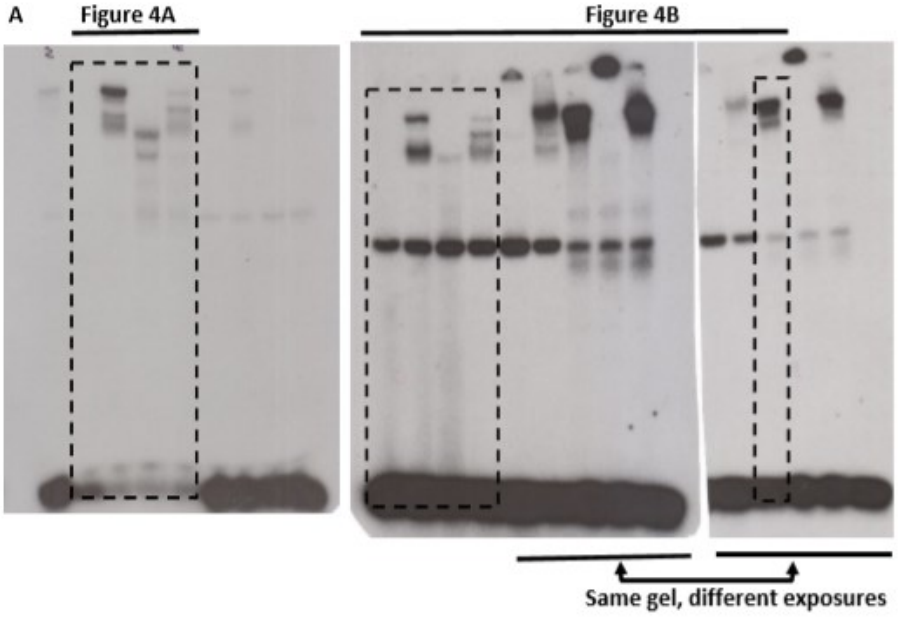
Supplementary figure S5: Uncropped image of gel presented in figure 1



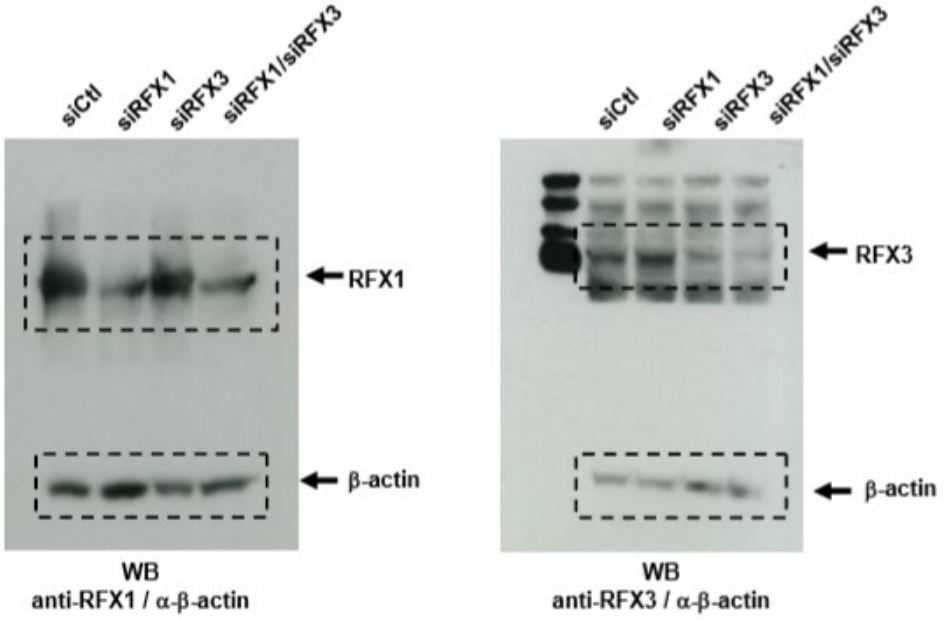
Supplementary figure S6: Uncropped image of gels presented in figure 2



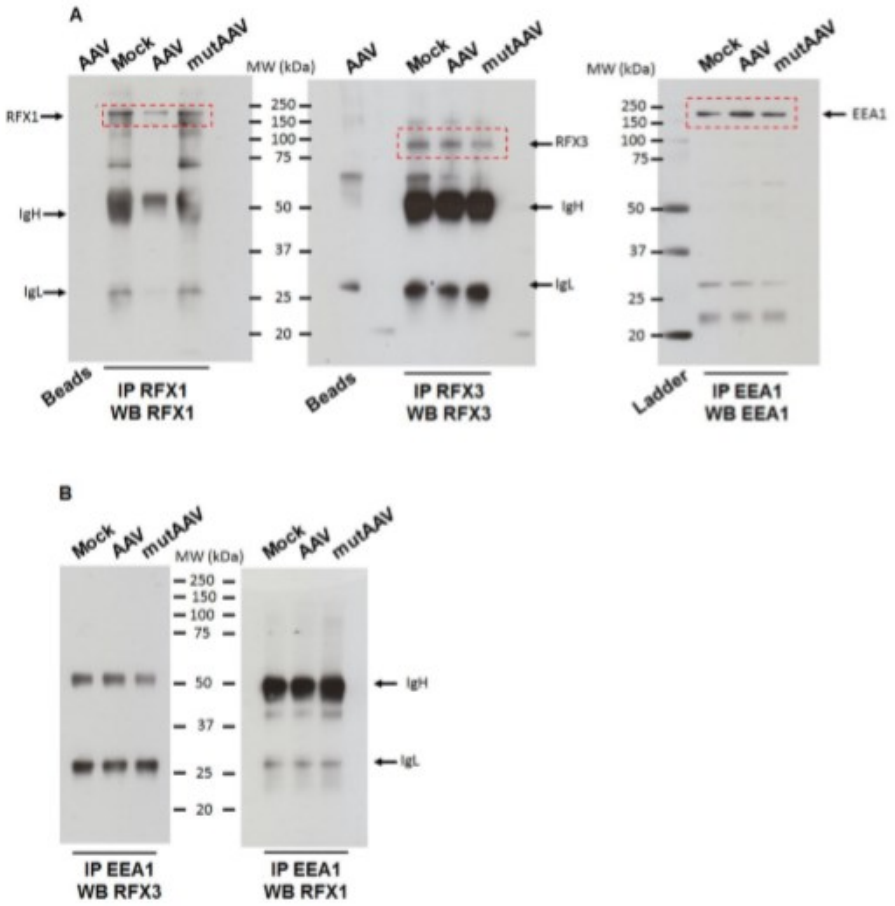
Supplementary figure S7: Uncropped image of gels presented in figure 3



Supplementary figure S8: (**A**) Uncropped image of gels presented in figure 4.



Supplementary figure S9: Uncropped image of the western blot presented in figure 5



Supplementary figure S10: **(A)** Uncropped image of gels presented in figure 6B. **(B)** Early Endosome Antigen 1 (EEA1) antibody does not precipitate RFX proteins.
IP: Immunoprecipitation, WB: Western Blott

Discussion

1) Identification des anomalies cellulaires pouvant impacter le transport du vecteur AAV8 et son expression dans le muscle DMD.

L'AAV8 est le vecteur de choix pour les thérapies géniques de la Dystrophie Musculaire de Duchenne mais malgré son efficacité, de fortes doses de vecteurs sont nécessaires dans des modèles animaux de la DMD. J'avais donc comme objectif de comprendre les mécanismes pouvant limiter cette efficacité. Mon travail de Thèse a permis de mieux caractériser le défaut de transduction de l'AAV8 dans des cellules DMD et d'identifier un défaut de la voie endosomale comme cause probable.

- **La transduction de l'AAV8 est perturbée dans les cellules musculaires DMD**

Mes travaux confirment que l'AAV8 est moins efficace à transduire des cellules DMD en dépit d'une plus grande quantité de vecteur dans ces cellules. J'ai donc étudié deux hypothèses pouvant expliquer ces résultats, l'entrée du vecteur par endocytose et sa localisation intracellulaire.

- Entrée du vecteur : Il a été montré que le niveau d'internalisation des vecteurs AAV ne corrèle pas forcement avec une l'efficacité de transduction de ces vecteurs (Keiser et al. 2011; Thomas et al. 2004). Par exemple, l'AAV2 et l'AAV8 sont internalisés efficacement dans les hépatocytes mais la décapsidation plus efficace de l'AAV8 conduit à une meilleure expression de ce sérotype dans le foie. Il était donc important d'évaluer les capacités d'internalisation des cellules DMD pour l'AAV8. J'ai montré que le défaut de transduction ne semble pas être causé par une modification des capacités d'endocytose de l'AAV8. Je me suis également intéressé à la cinétique d'entrée pouvant impacter l'efficacité de transduction. En effet, il est connu que l'AAV1 et l'AAV5 sont plus rapides que l'AAV2 à être internalisés et atteindre le noyau mais moins efficaces à exprimer leur transgène dans les cellules HeLa comparés à l'AAV2. J'ai montré que la cinétique d'entrée de l'AAV8 semble plus rapide dans les myoblastes DMD, puisqu'on observe plus de vecteurs AAV8 que dans les cellules contrôles et ceci dès 6h post-transduction. L'AAV8 se comporterait donc dans les cellules DMD comme les AAV1 et AAV5 par rapport à l'AAV2 dans les cellules HeLa. Dans cette étude, il a été montré que le défaut de décapsidation de l'AAV1 et la dégradation rapide de l'AAV5 empêchent leur

expression efficace dans ces cellules malgré leur entrée plus rapide que l'AAV2. Il semble que des mécanismes distincts de transport intracellulaire dans une même cellule déterminent le devenir de ces vecteurs. Ce qui m'a incité à explorer la deuxième hypothèse d'un défaut de transport intracellulaire.

- Localisation intracellulaire : Pour comprendre le trafic intracellulaire de l'AAV8 dans les cellules DMD, j'ai caractérisé sa localisation intracellulaire. J'ai étudié la répartition des particules virales dans les endosomes et montré que l'AAV8 empreinte les endosomes précoces et tardifs dans les cellules musculaires. Il est intéressant de noter que la présence de l'AAV8 n'a jamais été décrite dans les endosomes tardifs, ce qui suggère que ce vecteur est transporté dans les cellules musculaires par des voies différentes de celles décrites dans la lignée cellulaire permissive aux AAV, les HEK293 (Liu et al. 2013). Par ailleurs, mes expériences montrent qu'une proportion anormalement grande de particules encapsidées est accumulée dans les endosomes précoces et tardifs dans les cellules DMD. L'une des raisons de la différence dans l'efficacité de transduction des cellules HeLa par les vecteurs AAV1, AAV2 et AAV5 est l'accumulation de particules entières stables dans ces cellules (Keiser et al. 2011). Le défaut de transduction observé dans les cellules DMD pourrait donc être dû à un défaut d'import nucléaire du vecteur lié à sa séquestration dans les vésicules endosomales.

Au cours de ces expériences, j'ai par ailleurs montré qu'un plus grand nombre de génomes viraux sont présents dans la fraction nucléaire des myoblastes DMD par rapport aux cellules contrôles ce qui semble contradictoire avec une transduction réduite. J'ai d'ailleurs observé que le pourcentage de particules décapsidées était plus faible dans les noyaux des myoblastes DMD. Nous pouvons aussi imaginer qu'une autre étape de la transduction du vecteur AAV8 est perturbée dans les cellules DMD comme par exemple, la synthèse du second brin d'ADN. Cette hypothèse reste à vérifier en utilisant un vecteur AAV8 double brin. Néanmoins, l'ensemble de mes résultats pointent clairement vers un potentiel défaut de maturation du vecteur AAV8 dans le système endosomal pour expliquer le défaut de transduction observé dans les cellules musculaires DMD. Il a donc été important de caractériser plus en détails la voie endosomale dans la DMD.

- **Le nombre et la tailles des endosomes précoces sont plus élevés dans les cellules musculaires DMD**

J'ai montré que le système endosomal est dérégulé dans le muscle DMD. J'ai en effet observé un plus grand nombre d'endosomes précoces dans les cellules musculaires non différenciées (myoblastes) et différenciées (myotubes) DMD par rapport aux contrôles, mais aussi *ex vivo*, dans des fibres musculaires de patients DMD, de souris mdx et du chien GRMD. Un nombre élevé d'endosomes tardifs a également été observé *in vitro* dans les myoblastes et myotubes DMD et *ex vivo* dans les fibres musculaires de chiens GRMD. De plus, nous avons montré que les endosomes précoces sont plus larges dans les myoblastes et myotubes DMD. Une telle anomalie a déjà été démontrée dans de nombreuses pathologies comme la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al. 2000), la maladie de Niemann-Pick type C de type 2 (Jin et al. 2004) ou la trisomie 21 (Cataldo et al. 2008) mais n'a jamais été décrite dans la DMD. Des dérégulations intracellulaires ont cependant déjà été décrites dans la DMD. C'est notamment le cas de la désorganisation des microtubules et des complexes Golgiens dans les fibres musculaires de souris mdx (Khairallah et al. 2012; Percival et al. 2007). De plus, la restauration de leur organisation a été observée après l'injection d'un AAV codant une microdystrophine dans la souris mdx (Belanto et al. 2014; Nelson et al. 2018; Percival et al. 2007).
Bien que l'anomalie endosomale soit présente dans toutes les cellules DMD humaines *in vitro*, des variations dans le nombre des endosomes ont été observées entre les cellules issues de patients DMD mais aussi celles issues d'individus sains. Ces variations peuvent s'expliquer par les différences d'origines des biopsies musculaires. Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre ces variations et les mutations, le type musculaire ou l'âge des patients. Cette anomalie peut être liée à la sévérité de la maladie puisque nous avons montré que le nombre d'endosomes est d'autant plus important que le phénotype est sévère dans le muscle GRMD. Il sera donc nécessaire de compléter cette étude par l'analyse des données cliniques des patients prélevés pour étudier l'éventuelle corrélation avec la sévérité de la maladie comme suggérée par mes données obtenues chez le chien GRMD.

Le défaut endosomal ne semble pas être simplement lié à l'état pathologique du muscle, puisque nous ne l'avons pas retrouvé dans les myoblastes LGMD2C et FSHD1. Nous avons choisi d'étudier les endosomes dans ces deux myopathies puisque la LGMD2C est causée par l'absence d'une protéine du complexe DAPC (Kirschner and Lochmüller 2011) tandis que la

FSHD1 (Zernov and Skoblov 2019) est causée par un mécanisme totalement indépendant de ce complexe. Cependant, nos résultats n'excluent pas la présence d'anomalies endosomales dans d'autres myopathies. Il sera en particulier intéressant d'étudier cette anomalie des endosomes dans la dystrophie de Becker liée également au gène DMD mais avec tableau clinique moins grave (Cf. *Introduction, II) 1) Signes cliniques*). Les stratégies de sauts d'exons ont en effet pour but de transformer un phénotype DMD en un phénotype BMD et il serait donc intéressant de savoir si le défaut endosomal est conservé dans ces formes moins sévères. Cela pourrait en partie expliquer la restauration qui n'est que partielle des défauts endosomaux chez le chien GRMD traité par saut d'exon.

- **La protéine Rab5 est surexprimée dans les cellules musculaires DMD**

Une question clé a été de comprendre la cause de ce défaut endosomal dans la DMD. La protéine Rab5 représentait un candidat idéal. En effet, la surexpression de Rab5 est connue pour augmenter l'endocytose et la fusion endosomale (Stenmark et al. 1994) causant une augmentation du nombre et de la taille des endosomes précoces démontrée dans plusieurs systèmes cellulaires (Cataldo et al. 2008). En accord avec ces données, mes résultats montrent que Rab5 est aussi surexprimée dans les cellules musculaires DMD issues des biopsies de patients et dans le muscle de souris mdx. J'ai même établi la preuve de principe d'une correction des défauts des endosomes dans les cellules humaines DMD par invalidation de Rab5. Ainsi, Rab5 pourrait constituer à la fois un biomarqueur de l'anomalie endosomale dans la dystrophie et une cible d'intervention thérapeutique dont la régulation pourrait améliorer cette anomalie. Cette augmentation de Rab5 ne semble pas être liée seulement à une accumulation de la protéine Rab5 mais à une dérégulation transcriptionnelle puisque l'ARNm Rab5 est également augmenté dans les cellules DMD. L'activation de la voie de signalisation ERK (Extracellular signal-regulated kinases) pourrait être à l'origine de la surexpression de Rab5 dans les cellules DMD, comme déjà rapporté dans des macrophages traités à l'interleukine 6 (Bhattacharya et al. 2006). De façon intéressante, une activation de la voie ERK a déjà été montrée dans le muscle des souris mdx (Smythe and Forwood 2012) suggérant plus fortement son implication dans la surexpression de Rab5 dans la DMD. Une perspective directe de mon travail sera de confirmer l'activation de cette voie dans nos différents modèles et les conséquences d'une inhibition pharmacologique de la voie ERK sur les niveaux

d'expression de Rab5 et sur la voie endosomale. On doit noter cependant que l'analyse de l'expression de Rab5 chez les chiens GRMD a montré un niveau d'expression très hétérogène (résultats non présentés) qui peut s'expliquer par la sévérité du modèle et par la présence de nombreuses cellules de l'inflammation qui expriment Rab5 et qui rendent difficile l'interprétation des résultats de western blot à partir de lysat total de tissus.

- **La maturation de la voie endo-lysosomale semble altérée dans la DMD**

Il a été montré que la surexpression d'une protéine Rab5 constitutivement active provoquait l'apparition d'endosomes immatures, dit hybrides puisque possédant à la fois les marqueurs des endosomes précoces et tardifs (Hirota et al. 2007). J'ai retrouvé cette apparition d'endosomes hybrides dans les myoblastes DMD comparés aux contrôles que l'on peut supposer être due à la surexpression de Rab5. De plus, il a été montré que ces endosomes hybrides sont liés à un défaut de maturation de la voie endo-lysosomale, processus dépendent de l'acidification des endosomes, et à une diminution du transport des protéines internalisées jusqu'aux lysosomes (Hirota et al. 2007). Mes résultats sur l'internalisation et le trafic de l'EGF corroborent la présence de ce défaut dans les cellules DMD. Le défaut de dégradation de l'EGF pourrait donc être le reflet de sa séquestration dans des endosomes immatures moins fonctionnels. Le défaut d'acidification pourrait être causé par un défaut d'expression des V-ATPases qui sont des pompes à protons responsables de l'acidification endosomale (Kubisch et al. 2014). Il sera donc important d'analyser leur expression dans le muscle dystrophique.
La réduction de l'expression de LAMP1 que j'ai pu mesurer et qui suggère un nombre réduit de lysosomes montre que le tableau peut être encore plus complexe avec un impact non seulement sur les endosomes mais aussi sur les lysosomes. Cependant, une analyse des lysosomes par immunofluorescence, comme je l'ai fait pour les endosomes, est nécessaire avant de conclure sur leur nombre et leur distribution. On peut noter qu'un défaut du nombre de lysosomes a déjà été décrit dans les fibres musculaires de souris mdx. Les résultats obtenus apparaissent contradictoires puisque leur nombre a été décrit comme supérieur (Duguez et al. 2013) ou inférieur (Pal et al. 2014) dans les fibres de souris mdx comparées aux contrôles. Cette contradiction entre ces deux études peut s'expliquer par l'analyse faite sur des muscles différents prélevés sur des souris d'âges différents.

Nous pouvons tout de même conclure à un défaut de maturation de la voie endosomale et probablement aussi des lysosomes dans les cellules musculaires DMD, qui peut être responsable au moins en partie du défaut de transduction de ces cellules par l'AAV8. Une perspective intéressante à l'issue de mon travail de Thèse serait donc d'optimiser la transduction des cellules DMD par l'AAV8 en modulant la voie endo-lysosomale. Dans ce contexte, il sera important de mesurer l'efficacité de transduction des cellules DMD où l'expression de Rab5 sera réduite. Par ailleurs, mes résultats de Thèse pourraient expliquer le défaut d'autophagie rapporté dans les cellules musculaires de patients DMD mais aussi chez la souris mdx et le chien GRMD. En effet, pour leur dégradation, les autophagosomes fusionnent avec les endosomes tardifs ou les lysosomes. L'autophagie requière donc une voie endo-lysosomale fonctionnelle mais que j'ai décrit comme altérée dans la DMD. On peut noter que le défaut d'autophagie chez la souris mdx, a déjà été lié à un défaut lysosomal (Pal et al. 2014; Spaulding et al. 2018). La stimulation de l'autophagie a d'ailleurs déjà été proposée comme piste thérapeutique pour la DMD (Pal et al. 2014; Whitehead 2016).

- **Le lien entre l'anomalie endosomale observée et l'absence de dystrophine n'a pas encore été établi**

Nous avons donc mis en évidence, pour la première fois, la présence d'un défaut endosomal dans les cellules musculaires DMD. Cependant, nous n'avons pas totalement établi de lien entre le défaut endosomal observé et l'absence de la protéine dystrophine dans les cellules DMD. La surexpression anormale de Rab5 potentiellement causée par une activation de la voie des MAP kinases ERK, apparait néanmoins comme un élément pivot. Ce défaut endosomal ne semble pas être simplement lié à l'état pathologique du muscle, puisque nous ne l'avons pas retrouvé dans les myoblastes LGMD2C et FSHD1. L'anomalie endosomale observée dans la DMD ne semble pas non plus causée par les cycles de nécrose et régénération puisque nous l'avons observé dans les fibres de souris mdx, avant l'apparition de la nécrose, bien que l'anomalie endosomale soit exacerbée après. De plus, la restauration de la dystrophine chez le chien GRMD montre une restauration de l'anomalie endosomale, suggérant un lien direct entre ces deux phénomènes. Le lien entre l'anomalie endosomale et l'absence de dystrophine pourrait aussi impliquer l'altération des réseaux d'actine et de microtubules, ces composants du cytosquelette interagissant avec la dystrophine et étant

impliqués dans le transport endosomal. Un défaut de maturation des endosomes a d'ailleurs été observé après désorganisation des microtubules (Vonderheit and Helenius 2005). De plus, la Dysbindine ou dystrobrevin-binding protein 1, qui fait partie du complexe DAPC, est une sous-unité du Biogenesis of Lysosome-related Organelles Complex 1 (BLOC-1) qui régule le transport des protéines des endosomes précoces jusqu'aux lysosomes. Il a d'ailleurs été montré que la dégradation de l'EGF est ralentie dans des souris knock-out pour un autre membre du complexe BLOC-1, la protéine BLOS1 (Zhang et al. 2014). La Dysbindine pourrait avoir son expression et/ou sa localisation dérégulée en absence de dystrophine, comme c'est le cas pour d'autres protéines du DAPC, ce qui pourrait impacter la maturation endosomale. Il serait donc intéressant d'analyser cette protéine dans nos modèles.

- **Conclusion**

Le défaut endosomal est probablement responsable, au moins en partie, du défaut de transduction de l'AAV8 observé dans les cellules musculaires DMD. La maturation des vecteurs dans les endosomes consiste en un changement conformationnel de la capside permettant le relargage et la décapsidation du vecteur. Cette maturation nécessite la diminution du pH endosomal, que nous avons montré comme altérée dans les myoblastes DMD. Il a en effet été montré dans la littérature qu'une augmentation du pH endosomal diminue l'efficacité de transduction de l'AAV8 (Liu et al. 2013). De plus, la protéolyse de la capside de l'AAV8 est dépendante des protéases endosomales comme les cathepsines B et L (Akache et al. 2007). Il a d'ailleurs été montré que certaines enzymes lysosomales, dont les cathepsines, ne peuvent se détacher de leur récepteur et subir la protéolyse nécessaire à leur activité qu'en milieu acide (Kubisch et al. 2014). Pour finir, il a été montré que l'autophagie, qui est altérée dans la DMD et dont la dérégulation pourrait être causée par le défaut de maturation endo-lysosomal, joue un rôle dans l'import nucléaire du vecteur AAV8 (Hösel et al. 2017).

Le défaut endosomal s'ajoute donc aux nombreuses autres dérégulations conséquentes à l'absence de dystrophine, telles que la désorganisation des microtubules, la centronucléation des fibres régénérées ou l'organisation anormale des complexes Golgiens, qui peuvent perturber le transfert de gènes par vecteurs AAV dans le muscle dystrophique. Au vue de ces nombreuses dérégulations cellulaires, la création de nouvelles capsides optimisées pour transduire efficacement le muscle dystrophique, et pas seulement le muscle sain (comme c'est

le cas pour l'AAV2i8G9) permettrait d'augmenter significativement l'efficacité des futures thérapies AAV pour la DMD. De plus, la restauration de la dystrophine chez le chien GRMD ayant permis de rétablir l'anomalie endosomale, un pré-traitement des patients avec des oligonucléotides antisens permettant de rétablir l'expression de la dystrophine, ou une approche permettant de moduler le système endosomal (comme la modulation de Rab5 dans les muscles malades) pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des thérapies AAV pour la DMD.

2) Analyse du rôle des protéines cellulaires RFX1 et RFX3 dans la régulation de l'expression des vecteurs AAV via leur interaction avec l'ITR.

L'amélioration de l'efficacité des vecteurs AAV en thérapie génique nécessite aussi une meilleure connaissance des protéines cellulaires qui interagissent avec le génome viral et qui régulent son expression. Ainsi, un autre axe de mon travail a consisté à analyser le rôle des protéines cellulaires RFX1 et RFX3 dans la régulation de l'expression des vecteurs AAV *via* leur interaction avec l'ITR.

Dans cette étude, nous avons démontré que des facteurs de transcription de la famille RFX, et plus précisément l'homodimère RFX1/RFX1 et l'hétérodimère RFX1/RFX3, sont capables d'interagir avec la séquence D double brin du génome de l'AAV2. De plus, nous avons montré que RFX1 est capable de réguler l'expression de l'AAV. Nous n'avons cependant pas mis en évidence d'impact de l'invalidation de la protéine RFX3 sur l'efficacité de transduction de l'AAV. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que l'hétérodimère RFX1/RFX3 est minoritaire par rapport à l'homodimère RFX1/RFX1, comme observé sur les retards sur gels. L'impact de l'inhibition de RFX3 sur l'efficacité de transduction pourrait alors être trop faible pour être observé. De plus, l'inhibition de RFX1 impacte la formation des deux dimères RFX1/RFX1 et RFX1/RFX3 alors que l'inhibition de RFX3 ne modifie pas le niveau de RFX1/RFX1, qui peut suffire à moduler l'expression de l'AAV. J'ai également montré que la mutation de la séquence D2, qui abolit la fixation des protéines RFX, entraine une diminution de 20% de l'efficacité de transduction. Cette diminution est néanmoins plus faible que celle observée après l'inhibition de l'expression de RFX1. La mutation pourrait en effet créer un nouveau site de fixation

d'activateurs de la transcription, ou au contraire supprimer un site de fixation de répresseurs de transcription, ce qui pourrait contrebalancer l'effet produit par l'abolition de la fixation des protéines RFX sur la séquence D.

Cette étude a permis de mettre en évidence que les protéines cellulaires peuvent également réguler la transduction des vecteurs AAV par l'intermédiaire du génome viral et notamment des ITR et être donc aussi un levier pour optimiser l'utilisation des AAV en thérapie génique. De plus, nous avons montré dans cette étude que les sites d'interaction avec les protéines cellulaires peuvent varier d'un sérotype à un autre, le site d'interaction avec les protéines RFX n'étant pas présent dans les ITR des AAV3 à 5. Actuellement, tous les sérotypes AAV utilisés en thérapie génique comportent les ITR de l'AAV2. L'étude des interactions des protéines cellulaires avec les séquences ITR d'autres sérotypes AAV permettrait d'identifier de nouvelles interactions de protéines cellulaires avec le génome viral et de déterminer les sites de liaisons bénéfiques à l'expression du transgène, que l'on pourrait alors conserver ou ajouter à la séquence ITR d'un autre sérotype, ainsi que les sites de liaison non désirables, que l'on pourrait alors muter, afin d'augmenter l'efficacité de transduction des vecteurs AAV.

Cette étude a été réalisée sur des cellules HEK293. L'expression des protéines RFX n'a pas été analysée dans des cellules musculaires contrôles ou DMD et mériterait d'être observée. De plus, des protéines cellulaires spécifiques du muscle sain, ou dystrophique, pourraient également interagir avec le génome de l'AAV et moduler son expression.

3) Conclusion générale

Les vecteurs AAV sont des outils de choix pour la thérapie génique de nombreuses maladies, dont la DMD. Bien que très efficaces lors des tests précliniques, l'efficacité des traitements par vecteurs AAV n'est pas toujours évidente lors du passage chez l'Homme. Malgré le très grand nombre d'essais cliniques en cours utilisant des vecteurs AAV, leurs mécanismes de transduction et leurs interactions avec les protéines cellulaires restent mal compris, d'autant plus que ces mécanismes sont différents en fonction du sérotype utilisé et du type cellulaire ciblé. En effet, l'AAV2 est le sérotype AAV dont les étapes de transduction sont les mieux caractérisées, suivi par les AAV de sérotype 1, 5 et 8 pour lesquels un très faible nombre

d’étude existe. Concernant les nouvelles capsides obtenues par mutagenèse dirigée, leurs mécanismes de transduction n’ont encore jamais été étudiés. L’amélioration de l’efficacité des vecteurs AAV nécessite une meilleure connaissance des interactions entre les protéines cellulaires et la capside ou le génome viral. De plus, une bonne connaissance de l’état de la cellule cible, comme les cellules musculaires DMD pour notre étude, permettra d’adapter au mieux les thérapies afin d’utiliser le meilleur sérotype possible à la plus faible dose possible pour obtenir des traitements plus efficaces. Une combinaison de traitements, visant à rétablir les anomalies cellulaires spécifiques de chaque maladie, préalablement à l’injection des vecteurs AAV permettra certainement d’améliorer l’efficacité des traitements et de soigner dans un futur proche les maladies génétiques comme la DMD.

Références bibliographiques

Abmayr SM, Pavlath GK (2012) Myoblast fusion: lessons from flies and mice. Development 139*:*641-56
Adams V, Nehrhoff B, Späte U, Linke A, Schulze PC, Baur A, Gielen S, Hambrecht R, Schuler G (2002) Induction of iNOS expression in skeletal muscle by IL-1beta and NFkappaB activation: an in vitro and in vivo study. Cardiovasc Res 54*:*95-104
Akache B, Grimm D, Pandey K, Yant SR, Xu H, Kay MA (2006) The 37/67-kilodalton laminin receptor is a receptor for adeno-associated virus serotypes 8, 2, 3, and 9. J Virol 80*:*9831-6
Akache B, Grimm D, Shen X, Fuess S, Yant SR, Glazer DS, Park J, Kay MA (2007) A two-hybrid screen identifies cathepsins B and L as uncoating factors for adeno-associated virus 2 and 8. Mol Ther 15*:*330-9
Alfred V, Vaccari T (2016) When membranes need an ESCRT: endosomal sorting and membrane remodelling in health and disease. Swiss Med Wkly 146*:*w14347
Allen DG, Whitehead NP, Froehner SC (2016) Absence of Dystrophin Disrupts Skeletal Muscle Signaling: Roles of Ca2+, Reactive Oxygen Species, and Nitric Oxide in the Development of Muscular Dystrophy. Physiol Rev 96*:*253-305
Altamirano F, López JR, Henríquez C, Molinski T, Allen PD, Jaimovich E (2012) Increased resting intracellular calcium modulates NF-κB-dependent inducible nitric-oxide synthase gene expression in dystrophic mdx skeletal myotubes. J Biol Chem 287*:*20876-87
Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, Harron R, Stathopoulou TR, Massey C, Shelton JM, Bassel-Duby R, Piercy RJ, Olson EN (2018) Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. Science 362*:*86-91
Aponte-Ubillus JJ, Barajas D, Peltier J, Bardliving C, Shamlou P, Gold D (2018) Molecular design for recombinant adeno-associated virus (rAAV) vector production. Appl Microbiol Biotechnol 102*:*1045-1054
Aracena P, Tang W, Hamilton SL, Hidalgo C (2005) Effects of S-glutathionylation and S-nitrosylation on calmodulin binding to triads and FKBP12 binding to type 1 calcium release channels. Antioxid Redox Signal 7*:*870-81
Asokan A, Conway JC, Phillips JL, Li C, Hegge J, Sinnott R, Yadav S, DiPrimio N, Nam HJ, Agbandje-McKenna M, McPhee S, Wolff J, Samulski RJ (2010) Reengineering a receptor footprint of adeno-associated virus enables selective and systemic gene transfer to muscle. Nat Biotechnol 28*:*79-82
Ayuso E, Mingozzi F, Bosch F (2010) Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. Curr Gene Ther 10*:*423-36
Balakrishnan B, Jayandharan GR (2014) Basic biology of adeno-associated virus (AAV) vectors used in gene therapy. Curr Gene Ther 14*:*86-100
Balderhaar HJ, Ungermann C (2013) CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion. J Cell Sci 126*:*1307-16
Banihani R, Smile S, Yoon G, Dupuis A, Mosleh M, Snider A, McAdam L (2015) Cognitive and Neurobehavioral Profile in Boys With Duchenne Muscular Dystrophy. J Child Neurol 30*:*1472-82
Bantel-Schaal U, Hub B, Kartenbeck J (2002) Endocytosis of adeno-associated virus type 5 leads to accumulation of virus particles in the Golgi compartment. J Virol 76*:*2340-9
Barford K, Deppmann C, Winckler B (2017) The neurotrophin receptor signaling endosome: Where trafficking meets signaling. Dev Neurobiol 77*:*405-418
Barthélémy F, Wein N (2018) Personalized gene and cell therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. Neuromuscul Disord 28*:*803-824
Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ (2000) Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. J Virol 74*:*2777-85
Basset O, Boittin FX, Cognard C, Constantin B, Ruegg UT (2006) Bcl-2 overexpression prevents calcium overload and subsequent apoptosis in dystrophic myotubes. Biochem J 395*:*267-76
Belanto JJ, Mader TL, Eckhoff MD, Strandjord DM, Banks GB, Gardner MK, Lowe DA, Ervasti JM (2014) Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. Proc Natl Acad Sci U S A 111*:*5723-8

Bellinger AM, Reiken S, Carlson C, Mongillo M, Liu X, Rothman L, Matecki S, Lacampagne A, Marks AR (2009) Hypernitrosylated ryanodine receptor calcium release channels are leaky in dystrophic muscle. Nat Med 15*:*325-30

Berry GE, Asokan A (2016) Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol 21*:*54-60

Berthet C, Raj K, Saudan P, Beard P (2005) How adeno-associated virus Rep78 protein arrests cells completely in S phase. Proc Natl Acad Sci U S A 102*:*13634-9

Bhattacharya M, Ojha N, Solanki S, Mukhopadhyay CK, Madan R, Patel N, Krishnamurthy G, Kumar S, Basu SK, Mukhopadhyay A (2006) IL-6 and IL-12 specifically regulate the expression of Rab5 and Rab7 via distinct signaling pathways. EMBO J 25*:*2878-88

Bhosle RC, Michele DE, Campbell KP, Li Z, Robson RM (2006) Interactions of intermediate filament protein synemin with dystrophin and utrophin. Biochem Biophys Res Commun 346*:*768-77

Boucrot E, Ferreira AP, Almeida-Souza L, Debard S, Vallis Y, Howard G, Bertot L, Sauvonnet N, McMahon HT (2015) Endophilin marks and controls a clathrin-independent endocytic pathway. Nature 517*:*460-5

Boutin S, Monteilhet V, Veron P, Leborgne C, Benveniste O, Montus MF, Masurier C (2010) Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. Hum Gene Ther 21*:*704-12

Bowles DE, McPhee SW, Li C, Gray SJ, Samulski JJ, Camp AS, Li J, Wang B, Monahan PE, Rabinowitz JE, Grieger JC, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Xiao X, Samulski RJ (2012) Phase 1 gene therapy for Duchenne muscular dystrophy using a translational optimized AAV vector. Mol Ther 20*:*443-55

Bulfield G, Siller WG, Wight PA, Moore KJ (1984) X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 81*:*1189-92

Buller RM, Janik JE, Sebring ED, Rose JA (1981) Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. J Virol 40*:*241-7

Bushby K, Finkel R, Birnkrant DJ, Case LE, Clemens PR, Cripe L, Kaul A, Kinnett K, McDonald C, Pandya S, Poysky J, Shapiro F, Tomezsko J, Constantin C, Group DCCW (2010) Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. Lancet Neurol 9*:*177-89

Bushby K, Finkel R, Wong B, Barohn R, Campbell C, Comi GP, Connolly AM, Day JW, Flanigan KM, Goemans N, Jones KJ, Mercuri E, Quinlivan R, Renfroe JB, Russman B, Ryan MM, Tulinius M, Voit T, Moore SA, Lee Sweeney H, Abresch RT, Coleman KL, Eagle M, Florence J, Gappmaier E, Glanzman AM, Henricson E, Barth J, Elfring GL, Reha A, Spiegel RJ, O'donnell MW, Peltz SW, Mcdonald CM, GROUP P-G--DS (2014) Ataluren treatment of patients with nonsense mutation dystrophinopathy. Muscle Nerve 50*:*477-87

Byers TJ, Lidov HG, Kunkel LM (1993) An alternative dystrophin transcript specific to peripheral nerve. Nat Genet 4*:*77-81

Cadot B, Gache V, Gomes ER (2015) Moving and positioning the nucleus in skeletal muscle - one step at a time. Nucleus 6*:*373-81

Campa CC, Margaria JP, Derle A, Del Giudice M, De Santis MC, Gozzelino L, Copperi F, Bosia C, Hirsch E (2018) Rab11 activity and PtdIns(3)P turnover removes recycling cargo from endosomes. Nat Chem Biol 14*:*801-810

Canepari M, Pellegrino MA, D'Antona G, Bottinelli R (2010) Single muscle fiber properties in aging and disuse. Scand J Med Sci Sports 20*:*10-9

Cao H, Schroeder B, Chen J, Schott MB, McNiven MA (2016) The Endocytic Fate of the Transferrin Receptor Is Regulated by c-Abl Kinase. J Biol Chem 291*:*16424-37

Cataldo AM, Mathews PM, Boiteau AB, Hassinger LC, Peterhoff CM, Jiang Y, Mullaney K, Neve RL, Gruenberg J, Nixon RA (2008) Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. Am J Pathol 173*:*370-84

Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. Am J Pathol 157:277-86

Cathomen T, Stracker TH, Gilbert LB, Weitzman MD (2001) A genetic screen identifies a cellular regulator of adeno-associated virus. Proc Natl Acad Sci U S A 98:14991-6

Chamova T, Guergueltcheva V, Raycheva M, Todorov T, Genova J, Bichev S, Bojinova V, Mitev V, Tournev I, Todorova A (2013) Association between loss of dp140 and cognitive impairment in duchenne and becker dystrophies. Balkan J Med Genet 16:21-30

Chang LS, Shi Y, Shenk T (1989) Adeno-associated virus P5 promoter contains an adenovirus E1A-inducible element and a binding site for the major late transcription factor. J Virol 63:3479-88

Chelly J, Hamard G, Koulakoff A, Kaplan JC, Kahn A, Berwald-Netter Y (1990) Dystrophin gene transcribed from different promoters in neuronal and glial cells. Nature 344:64-5

Cheung AK, Hoggan MD, Hauswirth WW, Berns KI (1980) Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. J Virol 33:739-48

Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M (1999) Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. Nat Cell Biol 1:249-52

Colella P, Ronzitti G, Mingozzi F (2018) Emerging Issues in AAV-Mediated. Mol Ther Methods Clin Dev 8:87-104

Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ (2002) Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. Cell 109:523-35

Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. Nature 422:37-44

Cossu G, Previtali SC, Napolitano S, Cicalese MP, Tedesco FS, Nicastro F, Noviello M, Roostalu U, Natali Sora MG, Scarlato M, De Pellegrin M, Godi C, Giuliani S, Ciotti F, Tonlorenzi R, Lorenzetti I, Rivellini C, Benedetti S, Gatti R, Marktel S, Mazzi B, Tettamanti A, Ragazzi M, Imro MA, Marano G, Ambrosi A, Fiori R, Sormani MP, Bonini C, Venturini M, Politi LS, Torrente Y, Ciceri F (2015) Intra-arterial transplantation of HLA-matched donor mesoangioblasts in Duchenne muscular dystrophy. EMBO Mol Med 7:1513-28

Cotmore SF, Tattersall P (2014) Parvoviruses: Small Does Not Mean Simple. Annu Rev Virol 1:517-37

Crone M, Mah JK (2018) Current and Emerging Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy. Curr Treat Options Neurol 20:31

D'Souza VN, Nguyen TM, Morris GE, Karges W, Pillers DA, Ray PN (1995) A novel dystrophin isoform is required for normal retinal electrophysiology. Hum Mol Genet 4:837-42

Dahms NM, Olson LJ, Kim JJ (2008) Strategies for carbohydrate recognition by the mannose 6-phosphate receptors. Glycobiology 18:664-78

Dalkara D, Byrne LC, Klimczak RR, Visel M, Yin L, Merigan WH, Flannery JG, Schaffer DV (2013) In vivo-directed evolution of a new adeno-associated virus for therapeutic outer retinal gene delivery from the vitreous. Sci Transl Med 5:189ra76

Darras BT, Urion DK, Ghosh PS (2000) Dystrophinopathies.

Daya S, Berns KI (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. Clin Microbiol Rev 21:583-93

De Angelis FG, Sthandier O, Berarducci B, Toso S, Galluzzi G, Ricci E, Cossu G, Bozzoni I (2002) Chimeric snRNA molecules carrying antisense sequences against the splice junctions of exon 51 of the dystrophin pre-mRNA induce exon skipping and restoration of a dystrophin synthesis in Delta 48-50 DMD cells. Proc Natl Acad Sci U S A 99:9456-61

De Palma C, Morisi F, Cheli S, Pambianco S, Cappello V, Vezzoli M, Rovere-Querini P, Moggio M, Ripolone M, Francolini M, Sandri M, Clementi E (2012) Autophagy as a new therapeutic target in Duchenne muscular dystrophy. Cell Death Dis 3:e418

de Renzis S, Sönnichsen B, Zerial M (2002) Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. Nat Cell Biol 4:124-33

Dean J, Plante J, Huggins GS, Snyder RO, Aikawa R (2009) Role of cyclic AMP-dependent kinase response element-binding protein in recombinant adeno-associated virus-mediated transduction of heart muscle cells. Hum Gene Ther 20*:*1005-12

Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, Brown SC, Potter AC, Metzinger L, Watt DJ, Dickson JG, Tinsley JM, Davies KE (1997) Utrophin-dystrophin-deficient mice as a model for Duchenne muscular dystrophy. Cell 90*:*717-27

Ding W, Zhang LN, Yeaman C, Engelhardt JF (2006) rAAV2 traffics through both the late and the recycling endosomes in a dose-dependent fashion. Mol Ther 13*:*671-82

Doherty GJ, McMahon HT (2009) Mechanisms of endocytosis. Annu Rev Biochem 78*:*857-902

Douar AM, Poulard K, Stockholm D, Danos O (2001) Intracellular trafficking of adeno-associated virus vectors: routing to the late endosomal compartment and proteasome degradation. J Virol 75*:*1824-33

Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV (2001) Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. Science 293*:*2449-52

Drouin LM, Agbandje-McKenna M (2013) Adeno-associated virus structural biology as a tool in vector development. Future Virol 8*:*1183-1199

Duan D, Li Q, Kao AW, Yue Y, Pessin JE, Engelhardt JF (1999) Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection. J Virol 73*:*10371-6

Duan D, Sharma P, Yang J, Yue Y, Dudus L, Zhang Y, Fisher KJ, Engelhardt JF (1998) Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. J Virol 72*:*8568-77

Duan D, Yue Y, Yan Z, Yang J, Engelhardt JF (2000) Endosomal processing limits gene transfer to polarized airway epithelia by adeno-associated virus. J Clin Invest 105*:*1573-87

Duguez S, Duddy W, Johnston H, Lainé J, Le Bihan MC, Brown KJ, Bigot A, Hathout Y, Butler-Browne G, Partridge T (2013) Dystrophin deficiency leads to disturbance of LAMP1-vesicle-associated protein secretion. Cell Mol Life Sci 70*:*2159-74

Duregon E, Senetta R, Bertero L, Bussolati B, Annaratone L, Pittaro A, Papotti M, Marchiò C, Cassoni P (2017) Caveolin 1 expression favors tumor growth and is associated with poor survival in primary lung adenocarcinomas. Tumour Biol 39*:*1010428317694311

Echevarría L, Aupy P, Goyenvalle A (2018) Exon-skipping advances for Duchenne muscular dystrophy. Hum Mol Genet 27*:*R163-R172

Echigoya Y, Nakamura A, Nagata T, Urasawa N, Lim KRQ, Trieu N, Panesar D, Kuraoka M, Moulton HM, Saito T, Aoki Y, Iversen P, Sazani P, Kole R, Maruyama R, Partridge T, Takeda S, Yokota T (2017) Effects of systemic multiexon skipping with peptide-conjugated morpholinos in the heart of a dog model of Duchenne muscular dystrophy. Proc Natl Acad Sci U S A 114*:*4213-4218

Ferreira A, Boucrot E (2018) Mechanisms of Carrier Formation during Clathrin-Independent Endocytosis.

Finkel RS, Flanigan KM, Wong B, Bönnemann C, Sampson J, Sweeney HL, Reha A, Northcutt VJ, Elfring G, Barth J, Peltz SW (2013) Phase 2a study of ataluren-mediated dystrophin production in patients with nonsense mutation Duchenne muscular dystrophy. PLoS One 8*:*e81302

Flotte TR (2000) Size does matter: overcoming the adeno-associated virus packaging limit. Respir Res 1*:*16-8

Flotte TR, Afione SA, Solow R, Drumm ML, Markakis D, Guggino WB, Zeitlin PL, Carter BJ (1993) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator from a novel adeno-associated virus promoter. J Biol Chem 268*:*3781-90

Fong PY, Turner PR, Denetclaw WF, Steinhardt RA (1990) Increased activity of calcium leak channels in myotubes of Duchenne human and mdx mouse origin. Science 250*:*673-6

Ford MG, Pearse BM, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A, Hopkins CR, Evans PR, McMahon HT (2001) Simultaneous binding of PtdIns(4,5)P2 and clathrin by AP180 in the nucleation of clathrin lattices on membranes. Science 291*:*1051-5

Fort PE, Sene A, Pannicke T, Roux MJ, Forster V, Mornet D, Nudel U, Yaffe D, Reichenbach A, Sahel JA, Rendon A (2008) Kir4.1 and AQP4 associate with Dp71- and utrophin-DAPs complexes in specific and defined microdomains of Müller retinal glial cell membrane. Glia 56*:*597-610

Foster H, Sharp PS, Athanasopoulos T, Trollet C, Graham IR, Foster K, Wells DJ, Dickson G (2008) Codon and mRNA sequence optimization of microdystrophin transgenes improves expression and physiological outcome in dystrophic mdx mice following AAV2/8 gene transfer. Mol Ther 16*:*1825-32

Frick M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. Curr Biol 17*:*1151-6

Fujimoto T, Itoh K, Yaoi T, Fushiki S (2014) Somatodendritic and excitatory postsynaptic distribution of neuron-type dystrophin isoform, Dp40, in hippocampal neurons. Biochem Biophys Res Commun 452*:*79-84

Fukuda T, Ewan L, Bauer M, Mattaliano RJ, Zaal K, Ralston E, Plotz PH, Raben N (2006) Dysfunction of endocytic and autophagic pathways in a lysosomal storage disease. Ann Neurol 59*:*700-8

Gaglianone RB, Santos AT, Bloise FF, Ortiga-Carvalho TM, Costa ML, Quirico-Santos T, da Silva WS, Mermelstein C (2019) Reduced mitochondrial respiration and increased calcium deposits in the EDL muscle, but not in soleus, from 12-week-old dystrophic mdx mice. Sci Rep 9*:*1986

Gentil C, Le Guiner C, Falcone S, Hogrel JY, Peccate C, Lorain S, Benkhelifa-Ziyyat S, Guigand L, Montus M, Servais L, Voit T, Piétri-Rouxel F (2016) Dystrophin Threshold Level Necessary for Normalization of Neuronal Nitric Oxide Synthase, Inducible Nitric Oxide Synthase, and Ryanodine Receptor-Calcium Release Channel Type 1 Nitrosylation in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dystrophinopathy. Hum Gene Ther 27*:*712-26

Ghosh A, Yue Y, Duan D (2006) Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral (AAV) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle. J Gene Med 8*:*298-305

Gorman L, Suter D, Emerick V, Schümperli D, Kole R (1998) Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. Proc Natl Acad Sci U S A 95*:*4929-34

Gorospe JR, Tharp MD, Hinckley J, Kornegay JN, Hoffman EP (1994) A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. J Neurol Sci 122*:*44-56

Gorvel J, Chavrier P, Zerial M, Gruenberg J (1991) rab5 controls early endosome fusion in vitro.

Gowers WR (1879) Pseudo-hypertrophic muscular paralysis : a clinical lecture.

Goyenvalle A, Babbs A, van Ommen GJ, Garcia L, Davies KE (2009) Enhanced exon-skipping induced by U7 snRNA carrying a splicing silencer sequence: Promising tool for DMD therapy. Mol Ther 17*:*1234-40

Goyenvalle A, Griffith G, Babbs A, El Andaloussi S, Ezzat K, Avril A, Dugovic B, Chaussenot R, Ferry A, Voit T, Amthor H, Bühr C, Schürch S, Wood MJ, Davies KE, Vaillend C, Leumann C, Garcia L (2015) Functional correction in mouse models of muscular dystrophy using exon-skipping tricyclo-DNA oligomers. Nat Med 21*:*270-5

Goyenvalle A, Leumann C, Garcia L (2016) Therapeutic Potential of Tricyclo-DNA antisense oligonucleotides. J Neuromuscul Dis 3*:*157-167

Goyenvalle A, Vulin A, Fougerousse F, Leturcq F, Kaplan JC, Garcia L, Danos O (2004) Rescue of dystrophic muscle through U7 snRNA-mediated exon skipping. Science 306*:*1796-9

Guiraud S, Edwards B, Babbs A, Squire SE, Berg A, Moir L, Wood MJ, Davies KE (2019) The potential of utrophin and dystrophin combination therapies for Duchenne muscular dystrophy. Hum Mol Genet 28*:*2189-2200

Haberman RP, McCown TJ, Samulski RJ (2000) Novel transcriptional regulatory signals in the adeno-associated virus terminal repeat A/D junction element. J Virol 74*:*8732-9

Hansen J, Qing K, Srivastava A (2001) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: altered endocytic processing enhances transduction efficiency in murine fibroblasts. J Virol 75*:*4080-90

Hansen TE, Johansen T (2011) Following autophagy step by step. BMC Biol 9:39
Harper SQ, Hauser MA, DelloRusso C, Duan D, Crawford RW, Phelps SF, Harper HA, Robinson AS, Engelhardt JF, Brooks SV, Chamberlain JS (2002) Modular flexibility of dystrophin: implications for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy. Nat Med 8:253-61
Hermonat PL, Muzyczka N (1984) Use of adeno-associated virus as a mammalian DNA cloning vector: transduction of neomycin resistance into mammalian tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci U S A 81:6466-70
Herson S, Hentati F, Rigolet A, Behin A, Romero NB, Leturcq F, Laforêt P, Maisonobe T, Amouri R, Haddad H, Audit M, Montus M, Masurier C, Gjata B, Georger C, Cheraï M, Carlier P, Hogrel JY, Herson A, Allenbach Y, Lemoine FM, Klatzmann D, Sweeney HL, Mulligan RC, Eymard B, Caizergues D, Voït T, Benveniste O (2012) A phase I trial of adeno-associated virus serotype 1-γ-sarcoglycan gene therapy for limb girdle muscular dystrophy type 2C. Brain 135:483-92
Hinshaw JE (2000) Dynamin and its role in membrane fission. Annu Rev Cell Dev Biol 16:483-519
Hirota Y, Kuronita T, Fujita H, Tanaka Y (2007) A role for Rab5 activity in the biogenesis of endosomal and lysosomal compartments. Biochem Biophys Res Commun 364:40-7
Hodgetts S, Radley H, Davies M, Grounds MD (2006) Reduced necrosis of dystrophic muscle by depletion of host neutrophils, or blocking TNFalpha function with Etanercept in mdx mice. Neuromuscul Disord 16:591-602
Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM (1987) Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. Cell 51:919-28
Holder E, Maeda M, Bies RD (1996) Expression and regulation of the dystrophin Purkinje promoter in human skeletal muscle, heart, and brain. Hum Genet 97:232-9
Horiuchi H, Lippé R, McBride HM, Rubino M, Woodman P, Stenmark H, Rybin V, Wilm M, Ashman K, Mann M, Zerial M (1997) A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. Cell 90:1149-59
Horowitz ED, Rahman KS, Bower BD, Dismuke DJ, Falvo MR, Griffith JD, Harvey SC, Asokan A (2013) Biophysical and ultrastructural characterization of adeno-associated virus capsid uncoating and genome release. J Virol 87:2994-3002
Howard PL, Dally GY, Ditta SD, Austin RC, Worton RG, Klamut HJ, Ray PN (1999) Dystrophin isoforms DP71 and DP427 have distinct roles in myogenic cells. Muscle Nerve 22:16-27
Hung COY, Livesey FJ (2018) Altered γ-Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease. Cell Rep 25:3647-3660.e2
Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. EMBO J 30:3481-500
Hösel M, Huber A, Bohlen S, Lucifora J, Ronzitti G, Puzzo F, Boisgerault F, Hacker UT, Kwanten WJ, Klöting N, Blüher M, Gluschko A, Schramm M, Utermöhlen O, Bloch W, Mingozzi F, Krut O, Büning H (2017) Autophagy determines efficiency of liver-directed gene therapy with adeno-associated viral vectors. Hepatology 66:252-265
Hüser D, Gogol-Döring A, Lutter T, Weger S, Winter K, Hammer EM, Cathomen T, Reinert K, Heilbronn R (2010) Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus rep-binding sites at numerous loci in the human genome. PLoS Pathog 6:e1000985
Ishitobi M, Haginoya K, Zhao Y, Ohnuma A, Minato J, Yanagisawa T, Tanabu M, Kikuchi M, Iinuma K (2000) Elevated plasma levels of transforming growth factor beta1 in patients with muscular dystrophy. Neuroreport 11:4033-5
Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. Cell 151:1256-69
Jayandharan GR, Zhong L, Li B, Kachniarz B, Srivastava A (2008) Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. Gene Ther 15:1287-93
Jin LW, Shie FS, Maezawa I, Vincent I, Bird T (2004) Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. Am J Pathol 164:975-85

Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, Rudnicki MA, Rossi FM (2010) Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. Nat Cell Biol 12*:*153-63

Johnson JS, Samulski RJ (2009) Enhancement of adeno-associated virus infection by mobilizing capsids into and out of the nucleolus. J Virol 83*:*2632-44

Judge LM, Arnett AL, Banks GB, Chamberlain JS (2011) Expression of the dystrophin isoform Dp116 preserves functional muscle mass and extends lifespan without preventing dystrophy in severely dystrophic mice. Hum Mol Genet 20*:*4978-90

Kastenschmidt JM, Avetyan I, Villalta SA (2018) Characterization of the Inflammatory Response in Dystrophic Muscle Using Flow Cytometry. Methods Mol Biol 1687*:*43-56

Keiser NW, Yan Z, Zhang Y, Lei-Butters DC, Engelhardt JF (2011) Unique characteristics of AAV1, 2, and 5 viral entry, intracellular trafficking, and nuclear import define transduction efficiency in HeLa cells. Hum Gene Ther 22*:*1433-44

Khairallah RJ, Shi G, Sbrana F, Prosser BL, Borroto C, Mazaitis MJ, Hoffman EP, Mahurkar A, Sachs F, Sun Y, Chen YW, Raiteri R, Lederer WJ, Dorsey SG, Ward CW (2012) Microtubules underlie dysfunction in duchenne muscular dystrophy. Sci Signal 5*:*ra56

Khan N, Eliopoulos H, Han L, Kinane TB, Lowes LP, Mendell JR, Gordish-Dressman H, Henricson EK, McDonald CM (2019) Eteplirsen Treatment Attenuates Respiratory Decline in Ambulatory and Non-Ambulatory Patients with Duchenne Muscular Dystrophy.

Kienle E, Senís E, Börner K, Niopek D, Wiedtke E, Grosse S, Grimm D (2012) Engineering and evolution of synthetic adeno-associated virus (AAV) gene therapy vectors via DNA family shuffling. J Vis Exp

King JA, Dubielzig R, Grimm D, Kleinschmidt JA (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. EMBO J 20*:*3282-91

Kirschner J, Lochmüller H (2011) Sarcoglycanopathies. Handb Clin Neurol 101*:*41-6

Kobayashi YM, Rader EP, Crawford RW, Iyengar NK, Thedens DR, Faulkner JA, Parikh SV, Weiss RM, Chamberlain JS, Moore SA, Campbell KP (2008) Sarcolemma-localized nNOS is required to maintain activity after mild exercise. Nature 456*:*511-5

Kohler L, Puertollano R, Raben N (2018) Pompe Disease: From Basic Science to Therapy. Neurotherapeutics 15*:*928-942

Kronenberg S, Kleinschmidt JA, Böttcher B (2001) Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. EMBO Rep 2*:*997-1002

Kubisch R, Fröhlich T, Arnold GJ, Schreiner L, von Schwarzenberg K, Roidl A, Vollmar AM, Wagner E (2014) V-ATPase inhibition by archazolid leads to lysosomal dysfunction resulting in impaired cathepsin B activation in vivo. Int J Cancer 134*:*2478-88

Lai Y, Thomas GD, Yue Y, Yang HT, Li D, Long C, Judge L, Bostick B, Chamberlain JS, Terjung RL, Duan D (2009) Dystrophins carrying spectrin-like repeats 16 and 17 anchor nNOS to the sarcolemma and enhance exercise performance in a mouse model of muscular dystrophy. J Clin Invest 119*:*624-35

Lai Y, Yue Y, Liu M, Ghosh A, Engelhardt JF, Chamberlain JS, Duan D (2005) Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. Nat Biotechnol 23*:*1435-9

Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X (2003) Visualizing infection of individual influenza viruses. Proc Natl Acad Sci U S A 100*:*9280-5

Langemeyer L, Fröhlich F, Ungermann C (2018) Rab GTPase Function in Endosome and Lysosome Biogenesis. Trends Cell Biol 28*:*957-970

Larcher T, Lafoux A, Tesson L, Remy S, Thepenier V, François V, Le Guiner C, Goubin H, Dutilleul M, Guigand L, Toumaniantz G, De Cian A, Boix C, Renaud JB, Cherel Y, Giovannangeli C, Concordet JP, Anegon I, Huchet C (2014) Characterization of dystrophin deficient rats: a new model for Duchenne muscular dystrophy. PLoS One 9*:*e110371

Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M, Lacor P, Klein W, Bauer C, Checler F (2016) Intraneuronal aggregation of the β-CTF fragment of APP (C99) induces Aβ-independent lysosomal-autophagic pathology. Acta Neuropathol 132*:*257-76

Lawe DC, Chawla A, Merithew E, Dumas J, Carrington W, Fogarty K, Lifshitz L, Tuft R, Lambright D, Corvera S (2002) Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. J Biol Chem 277:8611-7

Le Guiner C, Montus M, Servais L, Cherel Y, Francois V, Thibaud JL, Wary C, Matot B, Larcher T, Guigand L, Dutilleul M, Domenger C, Allais M, Beuvin M, Moraux A, Le Duff J, Devaux M, Jaulin N, Guilbaud M, Latournerie V, Veron P, Boutin S, Leborgne C, Desgue D, Deschamps JY, Moullec S, Fromes Y, Vulin A, Smith RH, Laroudie N, Barnay-Toutain F, Rivière C, Bucher S, Le TH, Delaunay N, Gasmi M, Kotin RM, Bonne G, Adjali O, Masurier C, Hogrel JY, Carlier P, Moullier P, Voit T (2014) Forelimb treatment in a large cohort of dystrophic dogs supports delivery of a recombinant AAV for exon skipping in Duchenne patients. Mol Ther 22:1923-35

Le Guiner C, Servais L, Montus M, Larcher T, Fraysse B, Moullec S, Allais M, François V, Dutilleul M, Malerba A, Koo T, Thibaut JL, Matot B, Devaux M, Le Duff J, Deschamps JY, Barthelemy I, Blot S, Testault I, Wahbi K, Ederhy S, Martin S, Veron P, Georger C, Athanasopoulos T, Masurier C, Mingozzi F, Carlier P, Gjata B, Hogrel JY, Adjali O, Mavilio F, Voit T, Moullier P, Dickson G (2017) Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. Nat Commun 8:16105

Le Hir M, Goyenvalle A, Peccate C, Précigout G, Davies KE, Voit T, Garcia L, Lorain S (2013) AAV genome loss from dystrophic mouse muscles during AAV-U7 snRNA-mediated exon-skipping therapy. Mol Ther 21:1551-8

Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. Cell 141:1146-58

Legardinier S, Raguénès-Nicol C, Tascon C, Rocher C, Hardy S, Hubert JF, Le Rumeur E (2009) Mapping of the lipid-binding and stability properties of the central rod domain of human dystrophin. J Mol Biol 389:546-58

Leibovitz S, Meshorer A, Fridman Y, Wieneke S, Jockusch H, Yaffe D, Nudel U (2002) Exogenous Dp71 is a dominant negative competitor of dystrophin in skeletal muscle. Neuromuscul Disord 12:836-44

Li C, He Y, Nicolson S, Hirsch M, Weinberg MS, Zhang P, Kafri T, Samulski RJ (2013) Adeno-associated virus capsid antigen presentation is dependent on endosomal escape. J Clin Invest 123:1390-401

Li Y, Foster W, Deasy BM, Chan Y, Prisk V, Tang Y, Cummins J, Huard J (2004) Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. Am J Pathol 164:1007-19

Li ZB, Kollias HD, Wagner KR (2008) Myostatin directly regulates skeletal muscle fibrosis. J Biol Chem 283:19371-8

Lieberman AP, Puertollano R, Raben N, Slaugenhaupt S, Walkley SU, Ballabio A (2012) Autophagy in lysosomal storage disorders. Autophagy 8:719-30

Lim KR, Maruyama R, Yokota T (2017) Eteplirsen in the treatment of Duchenne muscular dystrophy. Drug Des Devel Ther 11:533-545

Lindsay AJ, Jollivet F, Horgan CP, Khan AR, Raposo G, McCaffrey MW, Goud B (2013) Identification and characterization of multiple novel Rab-myosin Va interactions. Mol Biol Cell 24:3420-34

Ling C, Wang Y, Lu Y, Wang L, Jayandharan GR, Aslanidi GV, Li B, Cheng B, Ma W, Lentz T, Xiao X, Samulski RJ, Muzyczka N, Srivastava A (2015) Enhanced transgene expression from recombinant single-stranded D-sequence-substituted adeno-associated virus vectors in human cell lines in vitro and in murine hepatocytes in vivo. J Virol 89:952-61

Lisowski L, Tay SS, Alexander IE (2015) Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics. Curr Opin Pharmacol 24:59-67

Liu Y, Joo KI, Wang P (2013) Endocytic processing of adeno-associated virus type 8 vectors for transduction of target cells. Gene Ther 20:308-17

Long C, Amoasii L, Mireault AA, McAnally JR, Li H, Sanchez-Ortiz E, Bhattacharyya S, Shelton JM, Bassel-Duby R, Olson EN (2016) Postnatal genome editing partially restores dystrophin expression in a mouse model of muscular dystrophy. Science 351*:*400-3

Long C, McAnally JR, Shelton JM, Mireault AA, Bassel-Duby R, Olson EN (2014) Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. Science 345*:*1184-1188

Lusby E, Fife KH, Berns KI (1980) Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA. J Virol 34*:*402-9

Machesky LM (2019) Rab11FIP proteins link endocytic recycling vesicles for cytoskeletal transport and tethering. Biosci Rep 39

Maersch S, Huber A, Büning H, Hallek M, Perabo L (2010) Optimization of stealth adeno-associated virus vectors by randomization of immunogenic epitopes. Virology 397*:*167-75

Mamchaoui K, Trollet C, Bigot A, Negroni E, Chaouch S, Wolff A, Kandalla PK, Marie S, Di Santo J, St Guily JL, Muntoni F, Kim J, Philippi S, Spuler S, Levy N, Blumen SC, Voit T, Wright WE, Aamiri A, Butler-Browne G, Mouly V (2011) Immortalized pathological human myoblasts: towards a universal tool for the study of neuromuscular disorders. Skelet Muscle 1*:*34

Matsuo M, Awano H, Matsumoto M, Nagai M, Kawaguchi T, Zhang Z, Nishio H (2017) Dystrophin Dp116: A yet to Be Investigated Product of the Duchenne Muscular Dystrophy Gene. Genes (Basel) 8

McCartney AJ, Zolov SN, Kauffman EJ, Zhang Y, Strunk BS, Weisman LS, Sutton MA (2014) Activity-dependent PI(3,5)P2 synthesis controls AMPA receptor trafficking during synaptic depression. Proc Natl Acad Sci U S A 111*:*E4896-905

McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, Samulski RJ (2003) Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. Gene Ther 10*:*2112-8

McFarland TJ, Zhang Y, Atchaneeyaskul LO, Francis P, Stout JT, Appukuttan B (2006) Evaluation of a novel short polyadenylation signal as an alternative to the SV40 polyadenylation signal. Plasmid 56*:*62-7

McGreevy JW, Hakim CH, McIntosh MA, Duan D (2015) Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. Dis Model Mech 8*:*195-213

McIntosh JH, Cochrane M, Cobbold S, Waldmann H, Nathwani SA, Davidoff AM, Nathwani AC (2012) Successful attenuation of humoral immunity to viral capsid and transgenic protein following AAV-mediated gene transfer with a non-depleting CD4 antibody and cyclosporine. Gene Ther 19*:*78-85

McPherson R, Rosenthal L, Rose J (1985) Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication.

Mendell JR, Chicoine LG, Al-Zaidy SA, Sahenk Z, Lehman K, Lowes L, Miller N, Alfano L, Galliers B, Lewis S, Murrey D, Peterson E, Griffin DA, Church K, Cheatham S, Cheatham J, Hogan MJ, Rodino-Klapac LR (2019) Gene Delivery for Limb-Girdle Muscular Dystrophy Type 2D by Isolated Limb Infusion. Hum Gene Ther

Mendell JR, Rodino-Klapac L, Sahenk Z, Malik V, Kaspar BK, Walker CM, Clark KR (2012) Gene therapy for muscular dystrophy: lessons learned and path forward. Neurosci Lett 527*:*90-9

Meng J (2017) Distinct functions of dynamin isoforms in tumorigenesis and their potential as therapeutic targets in cancer. Oncotarget 8*:*41701-41716

Merrifield CJ, Perrais D, Zenisek D (2005) Coupling between clathrin-coated-pit invagination, cortactin recruitment, and membrane scission observed in live cells. Cell 121*:*593-606

Millay DP, Goonasekera SA, Sargent MA, Maillet M, Aronow BJ, Molkentin JD (2009) Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. Proc Natl Acad Sci U S A 106*:*19023-8

Mingozzi F, Chen Y, Murphy SL, Edmonson SC, Tai A, Price SD, Metzger ME, Zhou S, Wright JF, Donahue RE, Dunbar CE, High KA (2012) Pharmacological modulation of humoral immunity in a nonhuman primate model of AAV gene transfer for hemophilia B. Mol Ther 20*:*1410-6

Monaco AP, Neve RL, Colletti-Feener C, Bertelson CJ, Kurnit DM, Kunkel LM (1986) Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature 323:646-50

Moore AR, Dong B, Chen L, Xiao W (2015) Vaccinia virus as a subhelper for AAV replication and packaging.

Morel E, Chamoun Z, Lasiecka ZM, Chan RB, Williamson RL, Vetanovetz C, Dall'Armi C, Simoes S, Point Du Jour KS, McCabe BD, Small SA, Di Paolo G (2013) Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. Nat Commun 4:2250

Morel E, Parton RG, Gruenberg J (2009) Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. Dev Cell 16:445-57

Morris GE, Simmons C, Nguyen TM (1995) Apo-dystrophins (Dp140 and Dp71) and dystrophin splicing isoforms in developing brain. Biochem Biophys Res Commun 215:361-7

Moxley RT, Pandya S, Ciafaloni E, Fox DJ, Campbell K (2010) Change in natural history of Duchenne muscular dystrophy with long-term corticosteroid treatment: implications for management. J Child Neurol 25:1116-29

Mueller C, Ratner D, Zhong L, Esteves-Sena M, Gao G (2012) Production and discovery of novel recombinant adeno-associated viral vectors. Curr Protoc Microbiol Chapter 14:Unit14D.1

Muriel O, Tomas A, Scott CC, Gruenberg J (2016) Moesin and cortactin control actin-dependent multivesicular endosome biogenesis. Mol Biol Cell 27:3305-3316

Murray DH, Jahnel M, Lauer J, Avellaneda MJ, Brouilly N, Cezanne A, Morales-Navarrete H, Perini ED, Ferguson C, Lupas AN, Kalaidzidis Y, Parton RG, Grill SW, Zerial M (2016) An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together. Nature 537:107-111

Müller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA, Trepel M (2003) Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors. Nat Biotechnol 21:1040-6

Nascimento Osorio A, Medina Cantillo J, Camacho Salas A, Madruga Garrido M, Vilchez Padilla JJ (2018) Consensus on the diagnosis, treatment and follow-up of patients with Duchenne muscular dystrophy. Neurologia

Nash K, Chen W, McDonald WF, Zhou X, Muzyczka N (2007) Purification of host cell enzymes involved in adeno-associated virus DNA replication. J Virol 81:5777-87

Nelson DM, Lindsay A, Judge LM, Duan D, Chamberlain JS, Lowe DA, Ervasti JM (2018) Variable rescue of microtubule and physiological phenotypes in mdx muscle expressing different miniaturized dystrophins. Hum Mol Genet 27:2090-2100

Newey SE, Benson MA, Ponting CP, Davies KE, Blake DJ (2000) Alternative splicing of dystrobrevin regulates the stoichiometry of syntrophin binding to the dystrophin protein complex. Curr Biol 10:1295-8

Nicolson SC, Samulski RJ (2014) Recombinant adeno-associated virus utilizes host cell nuclear import machinery to enter the nucleus. J Virol 88:4132-44

Nielsen E, Christoforidis S, Uttenweiler-Joseph S, Miaczynska M, Dewitte F, Wilm M, Hoflack B, Zerial M (2000) Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. J Cell Biol 151:601-12

Nonnenmacher M, Weber T (2011) Adeno-associated virus 2 infection requires endocytosis through the CLIC/GEEC pathway. Cell Host Microbe 10:563-76

Nonnenmacher M, Weber T (2012) Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. Gene Ther 19:649-58

Nonnenmacher ME, Cintrat JC, Gillet D, Weber T (2015) Syntaxin 5-dependent retrograde transport to the trans-Golgi network is required for adeno-associated virus transduction. J Virol 89:1673-87

Nordstedt C, Caporaso GL, Thyberg J, Gandy SE, Greengard P (1993) Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. J Biol Chem 268:608-12

Oddoux S, Zaal KJ, Tate V, Kenea A, Nandkeolyar SA, Reid E, Liu W, Ralston E (2013) Microtubules that form the stationary lattice of muscle fibers are dynamic and nucleated at Golgi elements. J Cell Biol 203:205-13

Ogston P, Raj K, Beard P (2000) Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. J Virol 74:3494-504

Ostedgaard LS, Rokhlina T, Karp PH, Lashmit P, Afione S, Schmidt M, Zabner J, Stinski MF, Chiorini JA, Welsh MJ (2005) A shortened adeno-associated virus expression cassette for CFTR gene transfer to cystic fibrosis airway epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 102:2952-7

Pal R, Palmieri M, Loehr JA, Li S, Abo-Zahrah R, Monroe TO, Thakur PB, Sardiello M, Rodney GG (2014) Src-dependent impairment of autophagy by oxidative stress in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Nat Commun 5:4425

Peccate C, Mollard A, Le Hir M, Julien L, McClorey G, Jarmin S, Le Heron A, Dickson G, Benkhelifa-Ziyyat S, Piétri-Rouxel F, Wood MJ, Voit T, Lorain S (2016) Antisense pre-treatment increases gene therapy efficacy in dystrophic muscles. Hum Mol Genet 25:3555-3563

Pelkmans L, Helenius A (2002) Endocytosis via caveolae .

Perabo L, Büning H, Kofler DM, Ried MU, Girod A, Wendtner CM, Enssle J, Hallek M (2003) In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. Mol Ther 8:151-7

Percival JM, Gregorevic P, Odom GL, Banks GB, Chamberlain JS, Froehner SC (2007) rAAV6-microdystrophin rescues aberrant Golgi complex organization in mdx skeletal muscles. Traffic 8:1424-39

Pfeffer S, Aivazian D (2004) Targeting Rab GTPases to distinct membrane compartments. Nat Rev Mol Cell Biol 5:886-96

Pillay S, Meyer NL, Puschnik AS, Davulcu O, Diep J, Ishikawa Y, Jae LT, Wosen JE, Nagamine CM, Chapman MS, Carette JE (2016) An essential receptor for adeno-associated virus infection. Nature 530:108-12

Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M, Spang A (2010) Identification of the switch in early-to-late endosome transition. Cell 141:497-508

Prins KW, Humston JL, Mehta A, Tate V, Ralston E, Ervasti JM (2009) Dystrophin is a microtubule-associated protein. J Cell Biol 186:363-9

Pylypenko O, Hammich H, Yu IM, Houdusse A (2018) Rab GTPases and their interacting protein partners: Structural insights into Rab functional diversity. Small GTPases 9:22-48

Qing K, Li W, Zhong L, Tan M, Hansen J, Weigel-Kelley KA, Chen L, Yoder MC, Srivastava A (2003) Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of cellular T-cell protein tyrosine phosphatase in transgene expression in established cell lines in vitro and transgenic mice in vivo. J Virol 77:2741-6

Quinn K, Quirion MR, Lo CY, Misplon JA, Epstein SL, Chiorini JA (2011) Intranasal administration of adeno-associated virus type 12 (AAV12) leads to transduction of the nasal epithelia and can initiate transgene-specific immune response. Mol Ther 19:1990-8

Randazzo D, Giacomello E, Lorenzini S, Rossi D, Pierantozzi E, Blaauw B, Reggiani C, Lange S, Peter AK, Chen J, Sorrentino V (2013) Obscurin is required for ankyrinB-dependent dystrophin localization and sarcolemma integrity. J Cell Biol 200:523-36

Reinig AM, Mirzaei S, Berlau DJ (2017) Advances in the Treatment of Duchenne Muscular Dystrophy: New and Emerging Pharmacotherapies. Pharmacotherapy 37:492-499

Rivera-Brown AM, Frontera WR (2012) Principles of exercise physiology: responses to acute exercise and long-term adaptations to training. PM R 4:797-804

Rodeheffer MS (2010) Tipping the scale: muscle versus fat. Nat Cell Biol 12:102-4

Sadoulet-Puccio HM, Rajala M, Kunkel LM (1997) Dystrobrevin and dystrophin: an interaction through coiled-coil motifs. Proc Natl Acad Sci U S A 94:12413-8

Salganik M, Venkatakrishnan B, Bennett A, Lins B, Yarbrough J, Muzyczka N, Agbandje-McKenna M, McKenna R (2012) Evidence for pH-dependent protease activity in the adeno-associated virus capsid. J Virol 86*:*11877-85

Samulski RJ, Muzyczka N (2014) AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. Annu Rev Virol 1*:*427-51

Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF (2000) Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. J Virol 74*:*9184-96

Schiaffino S (2010) Fibre types in skeletal muscle: a personal account. Acta Physiol (Oxf) 199*:*451-63

Schmidt M, Grot E, Cervenka P, Wainer S, Buck C, Chiorini JA (2006) Identification and characterization of novel adeno-associated virus isolates in ATCC virus stocks. J Virol 80*:*5082-5

Schneider A, Rajendran L, Honsho M, Gralle M, Donnert G, Wouters F, Hell SW, Simons M (2008) Flotillin-dependent clustering of the amyloid precursor protein regulates its endocytosis and amyloidogenic processing in neurons. J Neurosci 28*:*2874-82

Schnepp BC, Jensen RL, Chen CL, Johnson PR, Clark KR (2005) Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. J Virol 79*:*14793-803

Schultz BR, Chamberlain JS (2008) Recombinant adeno-associated virus transduction and integration. Mol Ther 16*:*1189-99

Seranova E, Connolly K, Zatyka M, Rosenstock T, Barrett T, Tuxworth R, Sarkar S (2017) Dysregulation of autophagy as a common mechanism in lysosomal storage diseases .

Sharp NJ, Kornegay JN, Van Camp SD, Herbstreith MH, Secore SL, Kettle S, Hung WY, Constantinou CD, Dykstra MJ, Roses AD (1992) An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. Genomics 13*:*115-21

Shen S, Horowitz ED, Troupes AN, Brown SM, Pulicherla N, Samulski RJ, Agbandje-McKenna M, Asokan A (2013) Engraftment of a galactose receptor footprint onto adeno-associated viral capsids improves transduction efficiency. J Biol Chem 288*:*28814-23

Shimizu-Motohashi Y, Komaki H, Motohashi N, Takeda S, Yokota T, Aoki Y (2019) Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status of Therapeutic Approaches. J Pers Med 9

Shin JH, Pan X, Hakim CH, Yang HT, Yue Y, Zhang K, Terjung RL, Duan D (2013) Microdystrophin ameliorates muscular dystrophy in the canine model of duchenne muscular dystrophy. Mol Ther 21*:*750-7

Sicinski P, Geng Y, Ryder-Cook A, Barnard E, Darlison M, Barnard P (1989) The molecular basis of muscular dystrophy in the mdx mouse: a point mutation. Science 244

Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S (2005) Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. Proc Natl Acad Sci U S A 102*:*2760-5

Silva P, Mendoza P, Rivas S, Díaz J, Moraga C, Quest AF, Torres VA (2016) Hypoxia promotes Rab5 activation, leading to tumor cell migration, invasion and metastasis. Oncotarget 7*:*29548-62

Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, Stan RV, Butler-Browne G, Vedie B, Johannes L, Morone N, Parton RG, Raposo G, Sens P, Lamaze C, Nassoy P (2011) Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. Cell 144*:*402-13

Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J, Jacobson-Croak K, Jewett N, Keim P, Knops J, Lieberburg I, Power M, Tan H, Tatsuno G, Tung J, Schenk D, Seubert P, Suomensaari SM, Wang S, Walker D, Zhao J, McConlogue L, John V (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. Nature 402*:*537-40

Siu JJ, Queen NJ, Huang W, Yin FQ, Liu X, Wang C, McTigue DM, Cao L (2017) Improved gene delivery to adult mouse spinal cord through the use of engineered hybrid adeno-associated viral serotypes. Gene Ther 24*:*361-369

Skuk D, Goulet M, Roy B, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, Dugré FJ, Sylvain M, Lachance JG, Deschênes L, Senay H, Tremblay JP (2006) Dystrophin expression in muscles of duchenne

muscular dystrophy patients after high-density injections of normal myogenic cells. J Neuropathol Exp Neurol 65:371-86
Skuk D, Roy B, Goulet M, Chapdelaine P, Bouchard JP, Roy R, Dugré FJ, Lachance JG, Deschênes L, Hélène S, Sylvain M, Tremblay JP (2004) Dystrophin expression in myofibers of Duchenne muscular dystrophy patients following intramuscular injections of normal myogenic cells. Mol Ther 9:475-82
Smythe GM, Forwood JK (2012) Altered mitogen-activated protein kinase signaling in dystrophic (mdx) muscle. Muscle Nerve 46:374-83
Sonntag F, Bleker S, Leuchs B, Fischer R, Kleinschmidt JA (2006) Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. J Virol 80:11040-54
Sousa LP, Lax I, Shen H, Ferguson SM, De Camilli P, Schlessinger J (2012) Suppression of EGFR endocytosis by dynamin depletion reveals that EGFR signaling occurs primarily at the plasma membrane. Proc Natl Acad Sci U S A 109:4419-24
Spaulding HR, Kelly EM, Quindry JC, Sheffield JB, Hudson MB, Selsby JT (2018) Autophagic dysfunction and autophagosome escape in the mdx mus musculus model of Duchenne muscular dystrophy. Acta Physiol (Oxf) 222
Spencer MJ, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K, Tidball JG (2001) Helper (CD4(+)) and cytotoxic (CD8(+)) T cells promote the pathology of dystrophin-deficient muscle. Clin Immunol 98:235-43
Srivastava A (2016) In vivo tissue-tropism of adeno-associated viral vectors. Curr Opin Virol 21:75-80
Srivastava A, Lusby EW, Berns KI (1983) Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. J Virol 45:555-64
Stahnke S, Lux K, Uhrig S, Kreppel F, Hösel M, Coutelle O, Ogris M, Hallek M, Büning H (2011) Intrinsic phospholipase A2 activity of adeno-associated virus is involved in endosomal escape of incoming particles. Virology 409:77-83
Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lütcke A, Gruenberg J, Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. EMBO J 13:1287-96
Stone MR, O'Neill A, Catino D, Bloch RJ (2005) Specific interaction of the actin-binding domain of dystrophin with intermediate filaments containing keratin 19. Mol Biol Cell 16:4280-93
Stoughton WB, Li J, Balog-Alvarez C, Kornegay JN (2018) Impaired autophagy correlates with golden retriever muscular dystrophy phenotype. Muscle Nerve 58:418-426
Tadayoni R, Rendon A, Soria-Jasso LE, Cisneros B (2012) Dystrophin Dp71: the smallest but multifunctional product of the Duchenne muscular dystrophy gene. Mol Neurobiol 45:43-60
Taguchi T (2013) Emerging roles of recycling endosomes. J Biochem 153:505-10
Tanaka Y, Ono N, Shima T, Tanaka G, Katoh Y, Nakayama K, Takatsu H, Shin HW (2016) The phospholipid flippase ATP9A is required for the recycling pathway from the endosomes to the plasma membrane. Mol Biol Cell 27:3883-3893
Thomas CE, Storm TA, Huang Z, Kay MA (2004) Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. J Virol 78:3110-22
Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B (2002) Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. Mol Biol Cell 13:238-50
Tidball JG, Dorshkind K, Wehling-Henricks M (2014) Shared signaling systems in myeloid cell-mediated muscle regeneration. Development 141:1184-96
Tidball JG, Villalta SA (2010) Regulatory interactions between muscle and the immune system during muscle regeneration. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 298:R1173-87
Tinsley J, Deconinck N, Fisher R, Kahn D, Phelps S, Gillis JM, Davies K (1998) Expression of full-length utrophin prevents muscular dystrophy in mdx mice. Nat Med 4:1441-4
Tokarz SA, Duncan NM, Rash SM, Sadeghi A, Dewan AK, Pillers DA (1998) Redefinition of dystrophin isoform distribution in mouse tissue by RT-PCR implies role in nonmuscle manifestations of duchenne muscular dystrophy. Mol Genet Metab 65:272-81

Tortura GJ, **Grabowski** S**R** (1994) Principes d'anatomie et de physiologie.
Tozawa T, Itoh K, Yaoi T, Tando S, Umekage M, Dai H, Hosoi H, Fushiki S (2012) The shortest isoform of dystrophin (Dp40) interacts with a group of presynaptic proteins to form a presumptive novel complex in the mouse brain. Mol Neurobiol 45*:*287-97
Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel D, Wieland F, Schwille P, Brügger B, Simons M (2008) Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. Science 319*:*1244-7
Traub LM (2009) Clathrin couture: fashioning distinctive membrane coats at the cell surface. PLoS Biol 7*:*e1000192
Tse LV, Klinc KA, Madigan VJ, Castellanos Rivera RM, Wells LF, Havlik LP, Smith JK, Agbandje-McKenna M, Asokan A (2017) Structure-guided evolution of antigenically distinct adeno-associated virus variants for immune evasion. Proc Natl Acad Sci U S A 114*:*E4812-E4821
Uhrig S, Coutelle O, Wiehe T, Perabo L, Hallek M, Büning H (2012) Successful target cell transduction of capsid-engineered rAAV vectors requires clathrin-dependent endocytosis. Gene Ther 19*:*210-8
Ullrich O, Reinsch S, Urbé S, Zerial M, Parton RG (1996) Rab11 regulates recycling through the pericentriolar recycling endosome. J Cell Biol 135*:*913-24
van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Mâle P, Goud B, Mellman I (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. Cell 70*:*729-40
Vandebrouck C, Martin D, Colson-Van Schoor M, Debaix H, Gailly P (2002) Involvement of TRPC in the abnormal calcium influx observed in dystrophic (mdx) mouse skeletal muscle fibers. J Cell Biol 158*:*1089-96
Villalta SA, Nguyen HX, Deng B, Gotoh T, Tidball JG (2009) Shifts in macrophage phenotypes and macrophage competition for arginine metabolism affect the severity of muscle pathology in muscular dystrophy. Hum Mol Genet 18*:*482-96
Villarreal-Silva M, Centeno-Cruz F, Suárez-Sánchez R, Garrido E, Cisneros B (2011) Knockdown of dystrophin Dp71 impairs PC12 cells cycle: localization in the spindle and cytokinesis structures implies a role for Dp71 in cell division. PLoS One 6*:*e23504
Vonderheit A, Helenius A (2005) Rab7 associates with early endosomes to mediate sorting and transport of Semliki forest virus to late endosomes. PLoS Biol 3*:*e233
Vulin A, Barthélémy I, Goyenvalle A, Thibaud JL, Beley C, Griffith G, Benchaouir R, le Hir M, Unterfinger Y, Lorain S, Dreyfus P, Voit T, Carlier P, Blot S, Garcia L (2012) Muscle function recovery in golden retriever muscular dystrophy after AAV1-U7 exon skipping. Mol Ther 20*:*2120-33
Wagner KR, McPherron AC, Winik N, Lee SJ (2002) Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice. Ann Neurol 52*:*832-6
Waldrop MA, Flanigan KM (2019) Update in Duchenne and Becker muscular dystrophy. Curr Opin Neurol 32*:*722-727
Wang B, Li J, Xiao X (2000) Adeno-associated virus vector carrying human minidystrophin genes effectively ameliorates muscular dystrophy in mdx mouse model. Proc Natl Acad Sci U S A 97*:*13714-9
Wang F, Wei Y, Zhu C, Huang X, Xu Y, Yu L, Yu X (2010) Novel parvovirus sublineage in the family of Parvoviridae. Virus Genes 41*:*305-8
Wang XS, Ponnazhagan S, Srivastava A (1996) Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. J Virol 70*:*1668-77
Wattin M, Gaweda L, Muller P, Baritaud M, Scholtes C, Lozano C, Gieseler K, Kretz-Remy C (2018) Modulation of Protein Quality Control and Proteasome to Autophagy Switch in Immortalized Myoblasts from Duchenne Muscular Dystrophy Patients. Int J Mol Sci 19
Way M, Pope B, Cross RA, Kendrick-Jones J, Weeds AG (1992) Expression of the N-terminal domain of dystrophin in E. coli and demonstration of binding to F-actin. FEBS Lett 301*:*243-5

Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL (2007) PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. Nature 447*:*87-91

Whitehead NP (2016) Enhanced autophagy as a potential mechanism for the improved physiological function by simvastatin in muscular dystrophy. Autophagy 12*:*705-6

Wollert T, Hurley JH (2010) Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. Nature 464*:*864-9

Wu Z, Asokan A, Samulski RJ (2006) Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. Mol Ther 14*:*316-27

Xiao PJ, Samulski RJ (2012) Cytoplasmic trafficking, endosomal escape, and perinuclear accumulation of adeno-associated virus type 2 particles are facilitated by microtubule network. J Virol 86*:*10462-73

Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J Virol 72*:*2224-32

Yamashita K, Suzuki A, Satoh Y, Ide M, Amano Y, Masuda-Hirata M, Hayashi YK, Hamada K, Ogata K, Ohno S (2010) The 8th and 9th tandem spectrin-like repeats of utrophin cooperatively form a functional unit to interact with polarity-regulating kinase PAR-1b. Biochem Biophys Res Commun 391*:*812-7

Yan Z, Zak R, Zhang Y, Ding W, Godwin S, Munson K, Peluso R, Engelhardt JF (2004) Distinct classes of proteasome-modulating agents cooperatively augment recombinant adeno-associated virus type 2 and type 5-mediated transduction from the apical surfaces of human airway epithelia. J Virol 78*:*2863-74

Yan Z, Zhang Y, Duan D, Engelhardt JF (2000) Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A 97*:*6716-21

Yiu EM, Kornberg AJ (2015) Duchenne muscular dystrophy. J Paediatr Child Health 51*:*759-64

Young SM, McCarty DM, Degtyareva N, Samulski RJ (2000) Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination. J Virol 74*:*3953-66

Yu L, Chen Y, Tooze SA (2018) Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. Autophagy 14*:*207-215

Yu X, Bao B, Echigoya Y, Yokota T (2015) Dystrophin-deficient large animal models: translational research and exon skipping. Am J Transl Res 7*:*1314-31

Zaiss AK, Muruve DA (2008) Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. Gene Ther 15*:*808-16

Zammit PS, Golding JP, Nagata Y, Hudon V, Partridge TA, Beauchamp JR (2004) Muscle satellite cells adopt divergent fates: a mechanism for self-renewal? J Cell Biol 166*:*347-57

Zanotti S, Saredi S, Ruggieri A, Fabbri M, Blasevich F, Romaggi S, Morandi L, Mora M (2007) Altered extracellular matrix transcript expression and protein modulation in primary Duchenne muscular dystrophy myotubes. Matrix Biol 26*:*615-24

Zeigerer A, Gilleron J, Bogorad RL, Marsico G, Nonaka H, Seifert S, Epstein-Barash H, Kuchimanchi S, Peng CG, Ruda VM, Del Conte-Zerial P, Hengstler JG, Kalaidzidis Y, Koteliansky V, Zerial M (2012) Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. Nature 485*:*465-70

Zentilin L, Marcello A, Giacca M (2001) Involvement of cellular double-stranded DNA break binding proteins in processing of the recombinant adeno-associated virus genome. J Virol 75*:*12279-87

Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 2*:*107-17

Zernov N, Skoblov M (2019) Genotype-phenotype correlations in FSHD. BMC Med Genomics 12*:*43

Zhang A, He X, Zhang L, Yang L, Woodman P, Li W (2014) Biogenesis of lysosome-related organelles complex-1 subunit 1 (BLOS1) interacts with sorting nexin 2 and the endosomal sorting complex

required for transport-I (ESCRT-I) component TSG101 to mediate the sorting of epidermal growth factor receptor into endosomal compartments. J Biol Chem 289:29180-94

Zhong L, Li B, Mah CS, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Cooper M, Herzog RW, Zolotukhin I, Warrington KH, Weigel-Van Aken KA, Hobbs JA, Zolotukhin S, Muzyczka N, Srivastava A (2008) Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. Proc Natl Acad Sci U S A 105:7827-32

Zhou L, Porter JD, Cheng G, Gong B, Hatala DA, Merriam AP, Zhou X, Rafael JA, Kaminski HJ (2006) Temporal and spatial mRNA expression patterns of TGF-beta1, 2, 3 and TbetaRI, II, III in skeletal muscles of mdx mice. Neuromuscul Disord 16:32-8

Résumé

Etudes des mécanismes moléculaires impliqués dans l'efficacité de transduction des vecteurs AAV dans le muscle dystrophique

La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est une maladie génétique causée par l'absence de dystrophine et provoquant une dégénérescence musculaire sévère. Aucun traitement curatif n'existe aujourd'hui mais la thérapie génique par vecteur AAV est l'une des stratégies les plus prometteuses pour traiter la DMD. Malgré l'efficacité bien établie de l'AAV de sérotype 8 (AAV8) pour le transfert de gène dans le muscle, de fortes doses de vecteurs sont nécessaires pour obtenir une efficacité thérapeutique dans des modèles animaux de la DMD. Dans ce contexte, j'ai étudié les mécanismes qui peuvent limiter l'efficacité de transduction du vecteur AAV8 dans le muscle dystrophique. Pour cela, j'ai étudié le devenir du vecteur AAV dans le muscle DMD puis caractérisé le système endosomal, essentiel au transport et la maturation des vecteurs AAV, dans différents modèles de la DMD. Mes résultats ont montré que l'efficacité de transduction de l'AAV8 est plus faible dans les cellules musculaires DMD comparées aux contrôles. De plus, la dérégulation du système endosomal dans la DMD peut impacter le transfert de gène par vecteur AAV dans ces cellules. Par ailleurs, l'amélioration de l'efficacité des vecteurs AAV en thérapie génique nécessite aussi une meilleure connaissance des protéines cellulaires qui interagissent avec le génome viral et qui régulent son expression. Dans ce contexte, nous avons montré que les facteurs de transcription RFX1 et RFX3 sont capables d'interagir avec la région ITR du génome viral et de moduler l'expression des vecteurs AAV.

Abstract

Studies of molecular mechanisms involved in the transduction efficiency of AAV vectors in dystrophic muscle

Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) is a genetic disorder caused by the absence of dystrophin and causing severe muscle degeneration. No curative treatment exists today but AAV-based gene therapy is one of the most promising strategies for treating DMD. Despite the well-established efficacy of AAV serotype 8 (AAV8) for gene transfer into muscle, high doses of vectors are required to achieve therapeutic efficacy in DMD animal models. In this context, I aimed at investigating the mechanisms that may limit the transduction efficiency of the AAV8 vector in dystrophic muscle. For this, I studied the fate of the AAV vector in the DMD muscle and then characterized the endosomal system, essential for the transport and maturation of AAV vectors, in different models of DMD. We have shown that the transduction efficiency of AAV8 is lower in DMD muscle cells compared to controls. The dysfunction of the endosomal system identified in this study may impact AAV vector gene transfer into these cells. Moreover, improving the efficiency of AAV vectors in gene therapy also requires a better understanding of cellular proteins that interact with the viral genome and regulate its expression. In this context, we have shown that the transcription factors RFX1 and RFX3 are able to interact with the ITR region of the viral genome and to modulate the expression of AAV vectors.